

LUCIANO CÉSAR PEREIRA CAMPOS LEONEL

**Produção e caracterização de biomateriais acelulares bioativos
obtidos a partir da decelularização de placentas**

São Paulo
2016

LUCIANO CÉSAR PEREIRA CAMPOS LEONEL

**Produção e caracterização de biomateriais acelulares bioativos obtidos a partir
da decelularização de placentas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Dr^a Sonja Ellen Lobo

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3273
FMVZ

Leonel, Luciano César Pereira Campos
Produção e caracterização de biomateriais acelulares bioativos obtidos a partir da decelularização de placentas / Luciano César Pereira Campos Leonel. -- 2016.
117 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Dr^a Sonja Ellen Lobo.

1. Placenta. 2. Biomaterial. 3. Engenharia de tecidos. 4. Decelularização. I. Título.



São Paulo, 26 de fevereiro de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS ACELULARES BIOATIVOS OBTIDOS A PARTIR DE DECELULARIZAÇÃO DE PLACENTAS", protocolado sob o CEUA nº 4195280115, utilizando 3 Cães (3 fêmeas), sob a responsabilidade de Drª Sonja Ellen Lobo, foi aprovado na reunião de 25/02/2015, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Production and characterization of bioactive biomaterials obtained from decellularized placentas", protocol number CEUA 4195280115, utilizing 3 Dogs (3 females), under the responsibility Drª Sonja Ellen Lobo, was approved in the meeting of day 02/25/2015, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LEONEL, Luciano César Pereira Campos

Título: Produção e caracterização de biomateriais acelulares bioativos obtidos a partir da decelularização de placentas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus** por todas oportunidades e proteção divina a mim oferecidas, mesmo sendo um pecador e não merecedor de tamanha misericórdia.

À toda minha família, **mãe, avó, irmão, tios, tias e primos**. Desde sempre foram meu porto seguro e principal razão em nunca desistir; nos momentos em que pensei cair sempre lembrei de vocês, uma das razões pela qual eu estava aqui e com isso as coisas ficaram menos difíceis e fui vencendo dia após dia. Essa vitória de hoje, sem sombra de dúvida também é de vocês.

Aos meus padrinhos na 'Anatomia Humana' **Profº Drº Zenon Silva** e sua esposa **Profª Drª Roseâmely Angélica de Carvalho-Barros** e a todos **meus colegas monitores**. Vocês foram responsáveis pelo início de minha carreira dentro da Anatomia Humana, ciência a qual logo se tornou paixão e muito em breve profissão de vida. A única forma possível que encontrei em mostrar tal gratidão foi meu empenho diário, sempre tentando fazer o meu melhor, fazendo valer a pena a confiança que em mim depositaram ao me indicarem para esta instituição.

À minha orientadora **Drª Sonja Ellen Lobo** por todos ensinamentos, paciência, companheirismo e principalmente pela confiança em mim depositada nestes dois anos para a realização desse trabalho. Agradeço pelos incontáveis momentos inoportunos (e às vezes inconvenientes) em que me atendeu e orientou mesmo por distância, mas sobretudo eu agradeço pelo exemplo de vida e profissionalismo. '**Não me diga, me mostre**'.

À **Profª Drª Maria Angélica Miglino** e ao programa de '**Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres**' por permitirem minha titulação nesta instituição de tamanho renome e respeito que é a Universidade de São Paulo.

Aos alunos de iniciação científica **Guilherme A. S. Ferreira, Rafael Rossi** e **Talya M. Coelho** pela colaboração e parceira dentro do laboratório de Histologia.

Aos meus amigos residentes no estado de Goiás: **Érica Silva Rocha, Eryelg Moura Tomé, Gabriella Cristine Guerra de Carvalho, Michelly Melo Alves, Núbia Inocêncio de Paula, Orenito Simão Borges Júnior** e **Rafaela Pereira de Lima**. Apesar da distância estiveram sempre comigo nessa longa caminhada. Obrigado por ainda serem presentes em minha vida.

Aos meus amigos de pós-graduação: **Ana Carolina Martins dos Santos, Bruna Andrade, Dailiany Orechio, Jessica Borghesi, Jodonai Barbosa, Kátia de**

Oliveira Pimenta Guimarães, Lara Carolina Mário, Marcos Vinícius Mendes Silva, Maria Angélica (M.A.), Miguel Lobo, Paulo Ramos, Rennan Olio e Rodrigo da Silva Nunes Barreto pela amizade, divertimentos, por todo carinho e respeito com que me receberam na maravilhosa cidade de São Paulo, os quais se tornaram de fato minha segunda família. Cada um à sua maneira, agora fazem parte da minha vida.

Agradeço ainda aos meus queridos e fiéis companheiros de alma, para os quais reservo lugar especial nestes agradecimentos e em meu coração por puro merecimento: **Adriana Raquel de Almeida da Anunciação, Flávio Silva Tampelini, Franceliusa Delys de Oliveira e Mychel Raony Paiva Teixeira Moraes**. Vocês foram o tipo de pessoa que realmente valeu a pena conhecer; são vocês que em um futuro não muito distante, serão responsáveis pelas melhores lembranças de minha estadia em São Paulo. Sei que muito em breve estaremos separados, seguiremos nossas vidas e é para frente que se anda (sempre). Tudo bem em relação a isso, pois cada pessoa que conhecemos na vida mesmo quando se vão, 'jamais nos deixam sós, pois deixam um pouquinho de si.... e levam um pouquinho de nós'.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha amiga e eterna companheira de trabalho **Carla Maria Figueiredo de Carvalho Miranda**. Quem não tem gratidão, não tem caráter e realmente acredito que em alguns momentos mais importante do que saber para onde você está indo, é saber que seja lá onde for você não está indo sozinho. Obrigado pela companhia nessa jornada de aprendizado e labuta minha querida amiga, obrigado por me mostrar que não se trata do 'meu' ou do 'seu' trabalho, quando acreditamos que ele é de fato 'nosso' vai-se muito mais longe e o crescimento profissional e pessoal é inegável. Obrigado por ter tido paciência!

'Estamos todos em constante aprendizado, errar faz parte do processo!!!'

*“Pensei que pertencia a uma tribo diferente;
Andava sozinho, nunca satisfeito, satisfeito;
Tentei me encaixar, mas não consegui;
Eu disse: 'Ah não, eu quero mais;
Isso não é o que eu estou procurando';*

...

*Então eu peguei a estrada menos percorrida;
E por pouco, sai dela vivo;
Em meio a escuridão, de alguma forma, eu sobrevivi;
Um amor difícil, eu sabia desde o início;
No fundo, nas profundezas;
Do meu coração rebelde;
Do meu coração rebelde.”*

Rebel Heart – Madonna

RESUMO

LEONEL, L. C. P. C. **Produção e caracterização de biomateriais acelulares bioativos obtidos a partir da decelularização de placentas.** [Production and characterization of bioactive biomaterials obtained from decellularized placentas]. 2016. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A bioengenharia de tecidos baseia-se no uso de moléculas bioativas, células-tronco e biomateriais para reparação de tecidos e/ou órgãos. Biomateriais podem ser classificados de acordo com sua origem em sintéticos ou biológicos. Biomateriais biológicos podem ser produzidos por decelularização, que visa a remoção de células da matriz extracelular (MEC), a qual deve manter sua integridade química e física. Placentas são órgãos de grande interesse na bioengenharia de tecidos visto que são descartadas após o parto e possuem grande volume de matriz extracelular. Métodos de decelularização podem ser classificados em químicos, físicos e enzimáticos. Todos conhecidos causam alterações na MEC, sendo que a associação deles é comumente utilizada. Este trabalho comparou diferentes protocolos e estabeleceu um método mais favorável para a decelularização de placentas caninas, visando a produção de um biomaterial para futuras aplicações clínicas. Inicialmente ambas as porções - materna e fetal - das placentas foram submetidas à 10 protocolos, que avaliaram variáveis como concentração e tempo de incubação em detergentes, diferentes gradientes de temperatura e a influência da perfusão versus imersão das soluções, na MEC remanescente. Com base na transparência do tecido e na ausência de núcleo celular em cortes histológicos, dois protocolos foram selecionados (I e II). Além dos critérios já mencionados, ambos os protocolos foram comparados quanto à quantidade de DNA remanescente na MEC decelularizada e à permanência e distribuição de algumas das proteínas da matriz. O detergente SDS foi o mais eficaz na remoção de células, embora não tenha sido suficiente para promover uma decelularização tecidual completa. O congelamento prévio das placentas requereu um maior tempo de incubação posterior das amostras nos distintos detergentes. Ambos métodos de perfusão e imersão foram eficazes na remoção das células, embora grande concentração de proteínas do citoesqueleto tenham permanecido retidas na matriz. As amostras processadas pelo protocolo I (SDS 1%, 5mM EDTA + 50mM TRIS + 0,5% antibiótico, e Triton X-100 1%) apresentaram maior preservação da

organização estrutural da MEC quando comparadas àquelas processadas de acordo com o protocolo II (que diferiu do anterior pela utilização de solução contendo 0,05% tripsina ao invés de 50mM TRIS), esse último método entretanto foi o que melhor removeu as células das placentas, conforme observado em lâminas histológicas e demonstrado pela menor concentração de DNA. Tanto as porções materna quanto fetal submetidas à ambos protocolos, mantiveram as proteínas laminina, fibronectina e colágeno tipo I. O colágeno tipo III foi observado somente na porção fetal. Conclui-se que o protocolo II foi o mais eficaz no processo de decelularização de placentas caninas tendo promovido a remoção do conteúdo celular e diminuição da concentração de DNA na MEC remanescente. No entanto é necessário otimizar o tempo de incubação das placentas em soluções enzimáticas visando maior conservação do arranjo da matriz decelularizada. A análise da capacidade da MEC decelularizada por tal método para ser utilizada em bioengenharia de tecidos ainda deve ser avaliada *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Placenta. Biomaterial. Engenharia de tecidos. Decelularização.

ABSTRACT

LEONEL, L. C. P. C. **Production and characterization of bioactive biomaterials obtained from decellularized placentas.** [Produção e caracterização de biomateriais acelulares bioativos obtidos a partir da decelularização de placentas]. 2016. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Tissue engineering is based on the use of bioactive molecules, stem cells and biomaterials to repair tissues and/organs. Biomaterials can be classified according to their origin in synthetic or biological. Biological biomaterials can be produced by decellularization which aims at removing cells from the extracellular matrix (ECM), while maintain its chemical and physical integrity. Placentas are organs of great interest in tissue engineering due to the fact that they are discarded after birth and present large amount of ECM. Decellularization methods can be classified into chemical, physical and enzymatic. All of them are known to cause changes on ECM; thus their association has been commonly used. This study compared different protocols and established a more favorable method for decellularization of canine placentas, aiming at the production of a biomaterial for clinical applications. Initially both placental portions – maternal and fetal – were subjected to ten different protocols that evaluated variables such as concentration and time of incubation in detergents, different temperatures and the influence of perfusion versus immersion of solutions in the remaining ECM were analysed. The analysis of tissue transparency and absence of cellular nuclei in histological slices stained with HE, led to selection of two protocols (I and II). Besides the before mentioned criteria, both protocols were compared according to the amount of DNA that remained in the ECM decellularized and the distribution of some ECM proteins. SDS was the most effective detergent for cell removal although it was not enough to complete decellularization. The freezing of placentas led to larger periods of samples incubation in different detergents. Both perfusion and immersion methods were capable of removing cells, although large concentration of cytoskeletal proteins remained entrapped in the matrix. Samples subjected to protocol I (1% SDS, 5 mM EDTA + 50 mM TRIS + 0,5% antibiotic, and 1% Triton X-100) better preserved the structural organization of ECM when compared to those subjected to protocol II (which differed from the first by the use of 0,05% trypsin instead of 50mM TRIS). However, protocol II optimized cell removal as observed in histological slices and decreased the

DNA concentration. Both maternal and fetal portions, subjected to both protocols, retained the laminin, fibronectin and collagen type I proteins. Collagen type III was identified only in fetal portion. In conclusion, protocol II was more effective in the decellularization of canine placentas than protocol I; it removed cellular content and decrease the concentration of remaining DNA in remaining ECM. The ability of ECM decellularized by such method to be applied in tissue engineering strategies still need to be evaluated *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Placenta. Biomaterial. Tissue engineering. Decellularization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação esquemática das moléculas dos três grupos de detergentes (iônicos, não-iônicos e zwitteriônicos) usados em protocolos de decelularização.....	23
Figura 2 -	Fórmula química dos principais detergentes usados em protocolos de decelularização.....	24
Figura 3 -	Tipos morfológicos das placentas: discoide, cotiledonária, difusa e zonária	39
Figura 4 -	Esquemas das barreiras materno-fetais epiteliocorial, sinepiteliocorial, endotelicorial e hemocorial	40
Figura 5 -	Tipos de interdigitações materno-fetais: pregueada, lamelar, trabecular, vilosa e labiríntica.....	41
Figura 6 -	Métodos de imersão e perfusão das soluções de decelularização para as placentas caninas	55
Figura 7 -	Descrição esquemática dos 10 dias dos protocolos I e II de decelularização descritos no Quadro 2.....	57
Figura 8 -	Avaliação macro e microscópica da porção fetal das placentas decelularizadas pelos métodos de imersão e perfusão e previamente congeladas à -20°C e -80°C	63
Figura 9 -	Aspecto macroscópico, histológico e tridimensional da MEC fetal e/ou materna submetidas à diferentes protocolos de decelularização	65
Figura 10 -	Análise macroscópica das placentas do grupo controle e decelularizadas com os Protocolos I e II.....	75
Figura 11 -	Análise microscópica por colorações de Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Masson da porção fetal da placenta canina referente ao grupo controle e decelularizado com Protocolo I e Protocolo II	77
Figura 12 -	Análise microscópica por colorações de Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Masson da porção materna da placenta canina referente ao grupo controle e decelularizado com o Protocolo I e Protocolo II.....	78

Figura 13 -	Análise do colágeno fibrilar das porções fetal e materna da placenta canina do grupo controle e decelularizadas pelos Protocolos I e II	79
Figura 14 -	Análise da ultraestrutura das matrizes extracelulares decelularizadas com os Protocolos I e II	81
Figura 15 -	Análise por imunofluorescência, com anticorpo para laminina, da porção fetal e materna da placenta canina decelularizada	84
Figura 16 -	Análise por imunofluorescência, com anticorpo para fibronectina, da porção fetal e materna da placenta canina decelularizada	85
Figura 17 -	Análise por imunofluorescência, com anticorpo para colágeno tipo I, da porção fetal e materna da placenta canina decelularizada	86
Figura 18 -	Análise por imunofluorescência, com anticorpo para colágeno tipo III, da porção fetal e materna da placenta canina decelularizada	87
Quadro 1 -	Descrição dos dez protocolos testes de decelularização e suas variáveis usadas, com respectiva duração, número de placentas processadas e idade gestacional dos fetos	56
Quadro 2 -	Descrição dos dois protocolos de decelularização selecionados e elaborados após as análises dos dez protocolos descritos no Quadro 1, com o número de placentas processadas e a idade gestacional dos fetos estão indicados.....	57
Quadro 3 -	Listagem dos anticorpos usados para caracterização da matriz extracelular das placentas decelularizadas com os Protocolos I e II	61
Quadro 4 –	Relação das proteínas de matriz extracelular encontradas nas análises de proteômica de amostras dos protocolos nº 5 e nº 7	66
Gráfico 1 -	Gráfico utilizado para o cálculo da idade gestacional dos fetos	53
Gráfico 2 -	Distribuição das proteínas das placentas decelularizadas identificadas por proteômica.	67

Gráfico 3 -	Análise da quantidade de DNA remanescente nas placentas decelularizadas por Protocolo I e Protocolo II	82
-------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Lista das proteínas identificadas pela análise de proteômica da porção materna da placenta canina decelularizada pelo protocolo número 5 (imersão em SDS 1% + 10mM TRIS por 9 dias; imersão em Triton X-100 1% por 2 dias).....	68
Tabela 2 -	Lista das proteínas identificadas pela análise de proteômica da porção fetal da placenta canina decelularizada pelo protocolo número 5 (imersão em SDS 1% + 10mM TRIS por 9 dias; imersão em Triton X-100 1% por 2 dias).....	69
Tabela 3 -	Lista das proteínas identificadas pela análise de proteômica da porção materna da placenta canina decelularizada pelo protocolo número 7 (imersão em SDS 1% + 10mM TRIS por 3 dias; imersão em Triton X-100 1% por 2 dias).....	70
Tabela 4 -	Lista das proteínas identificadas pela análise de proteômica da porção fetal da placenta canina decelularizada pelo protocolo número 7 (imersão em SDS 1% + 10mM TRIS por 3 dias; imersão em Triton X-100 1% por 2 dias).....	71

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

α AML – α -Actina de Músculo Liso

ATB – Antibiótico

bFGF – (*Basic Fibroblast Growth Factor*) – Fator de Crescimento Fibroblástico Básico

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

CK7 – (*Cytokeratin 7*) – Citoqueratina 7

CMC – Concentração Micelar Crítica

CR – *Crow Rump*

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DNA – (*Deoxyribonucleic acid*) - Ácido Desoxirribonucleico

dsDNA – (*double-stranded DNA*) - Fita Dupla de DNA

EGFR1 – (*Epidermal Growth Factor Receptor 1*) - Receptor para Fator de Crescimento Epidermal I

EDTA – (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EGTA – (*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*) - Ácido Etileno Glicol Tetracético

FGF – (*Fibroblast Growth Factor*) - Fator de Crescimento Fibroblástico

GAGs – Glicosaminoglicanas

HHP – (*High Hydrostatic Pressure*) – Alta Pressão Hidrostática

HSPG – (*Heparan Sulfate Proteoglycan*) - Proteoglicano de Heparan Sulfato

HSPG2 – (*Heparan Sulfate Proteoglycan 2*) - Proteoglicano de Heparan Sulfato 2

IGFR1 – (*Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*) - Receptor para Fator de Crescimento Insulínico I

KDR – (*Kinase Insert Domain Receptor*) - Receptor de Domínio para Inserção de Quinase

MEC – Matriz Extracelular

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mm – Milímetros

mM - Milimolar

MMPs – Metaloproteinases de matriz

NaCl – Cloreto de Sódio

nm – Nanômetro

OSH – Ovariosalpingohisterectomia

PAA – (*Peracetic acid / Peroxyacetic acid*) – Ácido Peracético

PBS – (*Phosphate-buffered saline*) – Tampão Fosfato Salino

PDGF – (*Platelet-derived Growth Factor*) – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PFA – Paraformaldeído

PIGF – (*Placental Growth Factor*) – Fator de Crescimento Placentário

RNA – (*Ribonucleic acid*) – Ácido Ribonucléico

SDS – (*Sodium Dodecyl Sulfate*) – Dodecil Sulfato de Sódio

SIS – (*Small Intestinal Submucosa*) – Submucosa do Intestino Delgado

SPARC – (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*) – Proteína Secretada Ácida e Rica em Cisteína

SRLP – (*Small Leucin-rich Proteoglycan*) – Proteoglicano Pequeno Rico em Leucina

ssDNA – (*single-stranded DNA*) – Fita Simples de DNA

TGF- β – (*Transforming Growth Factor β*) – Fator de Crescimento Transformador *Beta*

VEGF – (*Vascular Endothelial Growth Factor*) – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFA – (*Vascular Endothelial Growth Factor*) – Fator de Crescimento Endotelial Vascular A

VEGFR – (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) – Receptor para Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	MÉTODOS QUÍMICOS DE DECELULARIZAÇÃO	22
2.2	MÉTODOS FÍSICOS DE DECELULARIZAÇÃO	30
2.3	MÉTODOS ENZIMÁTICOS DE DECELULARIZAÇÃO	33
3	(I ARTIGO) PLACENTA COMO FONTE DE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)	35
3.1	INTRODUÇÃO	36
3.2	CLASSIFICAÇÃO DAS PLACENTAS	37
3.3	MATRIZ EXTRACELULAR DA PLACENTA	42
3.4	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46
4	(II ARTIGO) COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA DECELULARIZAÇÃO DE PLACENTAS CANINAS	50
4.1	INTRODUÇÃO	51
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	52
4.2.1	Coleta	52
4.2.2	Métodos para decelularização das placentas caninas	53
4.2.3	Análises Histológicas	58
4.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	58
4.2.5	Análise de Pico-Green® (Protocolos I e II)	59
4.2.6	Análise Proteômica	60
4.2.7	Imunofluorescência	60
4.2.8	Análise Estatística	61
4.3	RESULTADOS	62
4.3.1	Análises das variáveis presentes nos dez protocolos iniciais de decelularização (Quadro 1)	62
4.3.1.1	Imersão vs. Perfusão	62
4.3.1.2	Diferentes gradientes de temperatura	64

4.3.1.3	Tempo de incubação, tipo e concentração de detergentes.....	64
4.3.1.4	Identificação de proteínas da MEC após decelularização.....	66
4.3.2	Análises dos Protocolos I e II de decelularização.....	72
4.3.2.1	Análise macroscópica	73
4.3.2.2	Análises histológicas.....	75
4.3.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	79
4.3.2.4	Análise de Pico-Green® dos protocolos I e II.....	80
4.3.2.5	Imunofluorescência	82
4.3.2.5.1	<i>Lamina</i>	82
4.3.2.5.2	<i>Fibronectina</i>	83
4.3.2.5.3	<i>Colágeno tipo I</i>	83
4.3.2.5.4	<i>Colágeno tipo III</i>	83
4.4	DISCUSSÃO	88
4.5	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS	96
5	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICES	111

1 INTRODUÇÃO

A bioengenharia de tecidos fundamenta-se na utilização de biomateriais, células-tronco e moléculas bioativas para a regeneração de tecidos e órgãos, devolvendo à área lesionada suas atividades biológicas. Biomateriais podem ser genericamente classificados, quanto à sua origem, em biológicos ou sintéticos (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a; GRANDO MATTUELLA et al., 2007; NEREM, 2007; LOJUDICE; SOGAYAR, 2008).

Biomateriais são elaborados conforme a necessidade terapêutica e sempre objetivam desempenhar funções específicas e/ou mimetizar o órgão/tecido a ser reparado. No entanto, essa mimetização pode não ser totalmente fidedigna quando da utilização de biomateriais sintéticos, devido à dificuldade de se reproduzir perfeitamente a nível microscópico a estrutura desse órgão e/ou tecido (LÜ et al., 2014; XIANG et al., 2015).

Os biomateriais biológicos embora possa apresentar mais semelhança química com a área a ser reconstruída, têm a grande desvantagem de apresentarem importantes diferenças individuais. Biomateriais biológicos tem sido comumente produzidos por decelularização. Os biomateriais acelulares originados de tecidos biológicos, em geral, mantêm propriedades semelhantes àquelas encontradas nos tecidos naturais, oferecendo suporte mecânico, podendo ainda se integrar com maior facilidade aos tecidos adjacentes (quando implantado *in vivo*). Dependendo da sua composição, podem prover condições físicas e quimiotáticas para crescimento e diferenciação celular, otimizando a recelularização por células autólogas (BÖER et al., 2011; PELLEGGATA et al., 2013; WRONA et al., 2015).

Dentre os órgãos usados na produção de biomateriais biológicos estão a placenta. Durante a gravidez, ela promove o crescimento e sobrevivência do feto; atua como barreira seletiva entre este e a mãe, estabelecendo trocas gasosas e de nutrientes e apresenta ainda importantes propriedades antimicrobianas. Somado a isso, o fato de ela, em geral, ser descartada após o parto e possuir importantes componentes da MEC como colágeno tipo I, tipo IV e laminina, justificam seu potencial uso em medicina regenerativa (ENDERS; BLANKENSHIP, 1999; CHEN; APLIN, 2003;

HOPPER; WOODHOUSE; SEMPLE, 2003; NIKNEJAD et al., 2008; ROA; SMOK S; PRIETO G, 2012; BEAUDET et al., 2014). Diferenças placentárias entre espécies tais como tamanho, formato, composição de matriz extracelular nas diferentes idades gestacionais devem ser consideradas em possíveis aplicações das mesmas na bioengenharia de tecidos e são aspectos ainda pouco explorados (FLYNN; SEMPLE; WOODHOUSE, 2006; KAKABADZE; KAKABADZE, 2015).

A decelularização pode ser feita mediante a utilização de diferentes métodos e protocolos que variam de forma significativa dependendo do tamanho e da complexidade do tecido e/ou órgão com o qual se trabalhe. Esse deve ser capaz de remover as células conservando a estrutura da sua matriz extracelular, que pode então ser utilizada como biomaterial. Assim, o estabelecimento de um protocolo de decelularização que seja reproduzível e eficaz na remoção de células e na preservação da matriz extracelular representa o primeiro passo para futuras aplicações na medicina regenerativa (HOPPER; WOODHOUSE; SEMPLE, 2003; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a) e compõe o escopo deste trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para um biomaterial biológico acelular ser considerado aceitável para utilização clínica ele deve preencher os seguintes requisitos: 1) quantidade <50 ng de fita dupla de DNA por mg de MEC; 2) não conter material nuclear visível nos cortes dos tecidos corados com Hematoxilina-Eosina (HE) ou pelo DAPI –(4',6-diamidino-2-phenylidole) (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011) e 3) os fragmentos de DNA remanescentes devem ter comprimento menor que 200 pares de base (ZHENG et al., 2005; NAGATA; HANAYAMA; KAWANE, 2010). Na maioria dos tecidos e órgãos, para que os parâmetros descritos acima sejam atingidos, é necessária a combinação de diferentes soluções distribuídas ao longo do tecido, utilizando-se de formas variadas. Sendo assim, diferentes métodos de decelularização são descritos e podem ser classificados em físicos, químicos e enzimáticos (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a).

2.1 MÉTODOS QUÍMICOS DE DECELULARIZAÇÃO

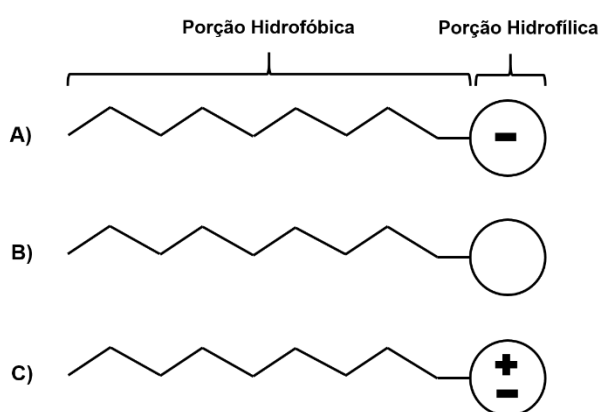
Os métodos químicos estão entre os mais eficazes para decelularização de tecidos, já que removem grande parte das células e concentração de DNA (OLIVEIRA et al., 2013). Correspondem à utilização de detergentes, ácidos e bases, soluções hiper/hipotônicas e os quelantes de cálcio (EDTA e EGTA).

Detergentes são moléculas anfipáticas que apresentam características específicas em soluções aquosas, nas quais espontaneamente formam uma estrutura micelar esférica; sua estrutura química consiste em um grupo de cabeça polar ou uma cadeia/cauda hidrofóbica (**Figura 1**) (SEDDON; CURNOW; BOOTH, 2004).

Grande parte dos detergentes usados no estudo da bioquímica proteica foram inicialmente desenvolvidos para fins de uso industrial e conforme o avanço tecnológico, pensou-se, na criação de detergentes específicos (como por exemplo o CHAPS) para estudos biológicos das proteínas de membrana. Levando-se em consideração a estrutura dos detergentes, eles podem ser classificados em três grupos: 1) iônicos, 2) não-iônicos e 3) zwitteriônicos (**Figura 1** e **Figura 2**). De modo geral detergentes podem desnaturar proteínas e causar a destruição da relação

existente entre DNA-proteína, lipídeos e lipoproteínas. Com a remoção celular no processo de decelularização, são esperadas também alterações nos componentes estruturais da MEC como diminuição na concentração de glicosaminoglicanas (GAGs) e fatores de crescimento, assim como desorganização da estrutura das fibras colágenas (SEDDON; CURNOW; BOOTH, 2004; PRIVÉ, 2007; FU et al., 2014; KAWASAKI et al., 2015).

Figura 1 - Representação esquemática das moléculas dos três grupos de detergentes (iônicos, não-iônicos e zwitteriônicos) usados em protocolos de decelularização



Fonte: Daltin (2011), modificado por Leonel (2015).

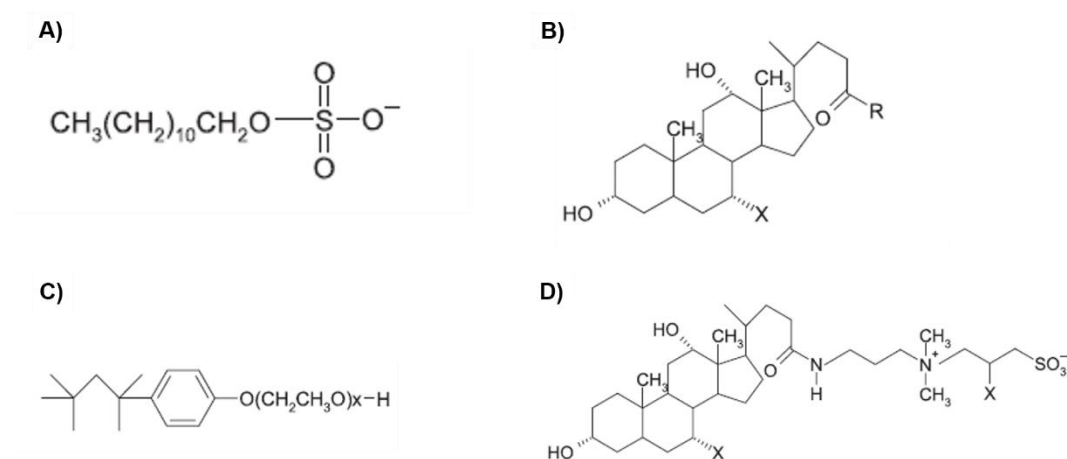
Legenda: Esquematização da estrutura molecular de detergentes iônicos (A) como por exemplo SDS, apresentando em sua porção hidrofílica carga negativa, contrapondo a porção hidrofílica sem carga encontrada nos detergentes não-iônicos (B) como o Triton X-100 e os detergentes zwitteriônicos (C) com ambas cargas, positiva e negativa em uma mesma molécula na porção hidrofílica.

Detergentes iônicos são bastante solúveis em água e possuem estrutura linear, sendo que em sua extremidade polar possuem carga negativa. Além disso nessa região, os átomos de oxigênio contribuem ainda mais para sua polaridade negativa. No caso de detergentes não iônicos as cargas responsáveis pela solubilização em água estão dispersas ao longo de vários átomos de oxigênio espalhados pela sua cadeia polimérica; desse modo, considera-se que os mesmos não possuem carga em sua extremidade hidrofílica. Os detergentes zwitteriônicos apresentam nessa mesma extremidade, moléculas com ambas as cargas (positiva e negativa), podendo dessa forma se comportar com características ora de detergentes iônicos, ora como detergentes não-iônicos (DALTIM, 2011).

Os detergentes mais usados em protocolos de decelularização são o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), (DE CASTRO BRÁS et al., 2013; KHORRAMIROUZ et al.,

2014; NONAKA et al., 2014; PAN et al., 2014; GUAN et al., 2015; KOCH et al., 2015), o Deoxicolato de Sódio (BÖER et al., 2011; PELLEGGATA et al., 2013; TOTONELLI et al., 2013; HELLSTRÖM et al., 2014), o Triton X-100 (DE CASTRO BRÁS et al., 2013; HELLSTRÖM et al., 2014; KHORRAMIROUZ et al., 2014; GARDIN et al., 2015; GUAN et al., 2015), e o CHAPS (FAULK et al., 2014a; TSUCHIYA et al., 2014) (**Figura 2**).

Figura 2 - Fórmula química dos principais detergentes usados em protocolos de decelularização



Fonte: Seddon, Curnow e Booth (2004).

Legenda: Em **A**) estrutura química do detergente Dodecil Sulfato de Sódio (exemplo de detergente iônico); **B**) Deoxicolato de Sódio (detergente iônico); **C**) Triton X-100 (detergente não-iônico) e **D**) CHAPS (detergente zwitteriônico).

O SDS é um detergente iônico que possui uma cadeia de hidrocarbono linear contendo um grupo de cabeças hidrofílicas carregadas com carga negativa. Essas características têm influência direta na sua interação com proteínas permitindo que ele solubilize as membranas citoplasmática e nuclear causando o extravasamento do conteúdo celular (PRIVÉ, 2007; FAULK et al., 2014a). De todos os detergentes descritos, este é comprovadamente um dos mais eficazes na remoção celular; porém causa alteração da composição da MEC, diminuindo a concentração de GAGs, citocinas e colágeno (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a; SANTOSO et al., 2014; KAWASAKI et al., 2015).

Biomateriais produzidos com rins suínos utilizando inicialmente SDS à 1% (e posterior incubação com Triton X-100), apresentaram redução de 95% do DNA, remoção quase total de células do órgão preservando a rede vascular, colágeno IV, laminina e fatores de crescimento como o HGF e VEGF. Resultados promissores

foram descritos ainda em relação à biocompatibilidade do biomaterial (GUAN et al., 2015). Em contrapartida, a associação dos mesmos detergentes para decelularização da mucosa do intestino delgado de suínos não obteve resultados tão positivos. Apesar dos detergentes terem deixado quantidade de DNA menor que 50ng/mg de MEC, houve grande comprometimento de sua biocompatibilidade prejudicando a recelularização (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; SYED et al., 2014).

Em alguns casos a lise celular não depende da associação entre detergentes, ou do tempo de incubação, mas sim da sua concentração utilizada. González-Andrades et al. (2015) descreveram que para a decelularização de córneas suínas, três concentrações de SDS (0,01%, 0,05% e 0,1%) apresentaram bons resultados tanto na remoção celular quanto na preservação da estrutura e composição da MEC, sendo que, quanto maior a concentração do detergente melhor a eficiência na remoção das células.

Na decelularização de discos intervertebrais realizada por Xu et al. (2014), o SDS na concentração de 0,5% foi um dos detergentes com melhores resultados na remoção das células e diminuição da concentração de DNA, porém foi também, o que provocou maior desarranjo nas fibras colágenas criando grandes espaços entre elas, diminuindo a concentração de GAGs e alterando características mecânicas do tecido. Alterações nos vasos sanguíneos (colabamento e desarranjo de sua estrutura tridimensional) também são descritas na literatura (MELO et al., 2014).

O detergente deoxicolato de sódio também é um detergente iônico [classificado por Seddon, Curnow e Booth (2004) como um tipo de detergente do grupo de sais ácidos biliares] usado para decelularização de tecidos (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Esse detergente foi usado para a produção de biomateriais acelulares por Totonelli et al. (2013). Apesar de algumas perdas na quantidade de GAGs e glândulas da submucosa de esôfagos suínos, ele foi capaz de produzir um tecido com aspectos translúcido e livre de núcleos celulares nas análises histológicas, conservando o colágeno nas camadas da mucosa, submucosa e muscular. Quando usado em aortas suínas, o mesmo detergente permitiu a preservação da estrutura da MEC da camada

interna dos vasos, ausência de remanescentes nucleares e alterações não significativas nas propriedades mecânicas (PELLEGATA et al., 2013).

Em artérias carótidas equinas a associação entre os dois detergentes iônicos - deoxicolato de sódio e SDS (ambos na concentração de 0,5%) - foi testada, produzindo uma matriz decelularizada e com concentração de DNA com valor de 60ng/mg de MEC (33% do encontrado no grupo controle). Além disso, durante análise proteica, aproximadamente 306 proteínas foram descritas sendo 12 delas pertencentes à matriz extracelular (BÖER et al., 2011).

O Triton X-100 (*t-octilfenoxipoliétoxietanol*) é um detergente não-iônico com estrutura química bastante heterogênea (PRIVÉ, 2007; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011) descrito na decelularização de placenta (SCHNEIDER et al., 2015), glândula lacrimal (LIN et al., 2015), pâncreas (ZHENG et al., 2015), fígado (ZHENG et al., 2015), dentro outros tecidos.

Ele é considerado um detergente menos agressivo aos componentes biológicos da MEC, sendo capaz de permitir a decelularização enquanto mantém grande parte de seus componentes como GAGs, redes fibrilares de colágeno, conservação das propriedades mecânicas e da sua biocompatibilidade. Na decelularização de intestinos de ratos o Triton X-100 foi um dos que obteve melhores resultados produzindo biomaterial acelular tridimensional, conservando os pequenos espaços presentes entre fibras colágenas (OLIVEIRA et al., 2013; XU et al., 2014).

A escolha de cada detergente depende do tecido a ser decelularizado. Idealmente, biomateriais utilizados em bioengenharia de tecidos devem manter sua estrutura física e propriedades biológicas, facilitando posterior recelularização. Sendo assim, o Triton X-100, por ser um detergente menos agressivo, tem sido preferível quando possível, em relação ao SDS, pois preserva de forma mais qualitativa a estrutura conformacional da MEC pós-decelularização (PRIVÉ, 2007; FAULK et al., 2014a).

Entretanto, há controvérsias em relação à sua ação menos prejudicial aos componentes da MEC. Em um estudo realizado por Santoso et al. (2014), o Triton X-100 não só foi o detergente que mais danificou a estrutura de colágeno e elastina da matriz de úteros de ratas, como também foi considerado insatisfatório na remoção das

células, por não ser capaz de penetrar nas camadas mais profundas do tecido. Burk et al. (2014) também mostraram que ele não foi capaz de remover satisfatoriamente as células presentes em tendões equinos, como observado com outros métodos testados e que apresentaram melhores resultados. Rins decelularizados com esse detergente por Caralt et al. (2015), mesmo ao final do protocolo, apresentaram células endoteliais e musculares visíveis.

Os detergentes zwitteriônicos, em geral protegem a estrutura natural dos tecidos durante o procedimento de decelularização. No entanto, há relatos de que eles podem desnaturar proteínas de modo mais agressivo que os detergentes iônicos e não-iônicos. O detergente zwitteriônico mais conhecido é o (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), ou CHAPS, que apresenta uma rígida forma de anel esteroide (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a; FAULK et al., 2014a; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

Na decelularização de cordões umbilicais com incubação em 8mM CHAPS (e posterior incubação com 1.8mM SDS), as células foram removidas e a concentração de DNA reduzida para 6% (74,4 ng/mg) do valor encontrado no grupo controle, sendo este o protocolo que mais se aproximou dos parâmetros aceitáveis para aplicação terapêutica do biomaterial. Somado a isso, proteínas estruturais da matriz extracelular, como o colágeno, foram preservadas após decelularização (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; MALLIS et al., 2014).

A mesma concentração desse detergente zwitteriônico (8mM CHAPS) foi usada em pulmões de ratos. Nos estudos de Tsuchiya et al. (2014), análises histológicas comprovaram a completa eliminação celular, preservação dos septos alveolares e demais características arquitetônicas do órgão. Petersen et al. (2012) mostraram ainda que o detergente diminuiu de forma significativa a quantidade de elastina do tecido pulmonar; por outro lado, foi capaz de remover aproximadamente 99% do DNA e preservar basicamente a mesma quantidade de colágeno encontrada no grupo controle.

Os ácidos e bases desnaturam proteínas, rompem a membrana celular, solubilizam os elementos celulares e alteram ácidos nucleicos. No entanto, essas soluções não são seletivas e podem afetar elementos da MEC, particularmente o

colágeno, GAGs e fatores de crescimento. O ácido peracético ou peroxiacético (*paracetic acid* - PAA) usado na decelularização da submucosa do intestino delgado (*small intestinal submucosa* - SIS), reduziu a quantidade de DNA bem próximo à 50ng/mg de MEC. No entanto, houve a diminuição da elasticidade do tecido, alterações mecânicas no biomaterial e em toda a sua superfície, causando rachaduras e defeitos visíveis na microscopia eletrônica de varredura (FU et al., 2014; SYED et al., 2014).

Em tumores, um dos protocolos para remoção celular fez uso de PAA por 16 horas, sendo comprovado remoção incompleta das células desse tecido, produzindo uma amostra com aspecto sólido e de tonalidade opaca. Mesmo retendo maior quantidade de células ele foi capaz de reduzir a quantidade de DNA em concentrações menores que 50 ng/mg de MEC, sendo ainda positivo para as marcações de citoqueratina 7 (CK7) e α -actina de músculo liso (α AML) (LÜ et al., 2014).

Em relação ao pH de soluções de decelularização, Tsuchiya et al. (2014), demonstraram que pulmões decelularizados com CHAPS em pH=8 foram os que melhor preservaram os constituintes da MEC, removendo maior quantidade de DNA e β -actina (proteína presente no citoesqueleto). Curiosamente, mesmo com presença de remanescentes celulares, quando implantado *in vivo*, esse biomaterial não causou resposta inflamatória exacerbada. Já o grupo tratado com CHAPS em pH=12, além de apresentar uma resposta imunológica mais agressiva, levou à perda de 30% na quantidade de colágeno e diminuição também na quantidade de elastina, fibronectina e laminina (TSUCHIYA et al., 2014).

As soluções hiper/hipotônicas interferem na relação entre o DNA e as proteínas causando a lise celular por choque osmótico, em lavagens alternadas entre os dois tipos de soluções. As lavagens têm objetivo não só de remover as células do tecido, mas também servem como uma maneira de retirar os resíduos celulares provenientes das etapas anteriores do protocolo de decelularização (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; FAULK et al., 2014b; FU et al., 2014).

O cloreto de sódio (NaCl – solução hipertônica) foi descrito no protocolo de decelularização de intestinos de ratos com remoção de aproximadamente 89% do conteúdo celular e preservação dos espaços interfibrilares do colágeno, causando

desorganização e alteração da estrutura tridimensional do tecido, intensa perda de fibras reticulares e eliminação de 50% de GAGs (OLIVEIRA et al., 2013). Incubação alternada de tumores em solução tampão hipotônica e hipertônica associada posteriormente com a incubação em detergentes removeu completamente as células de tecidos sendo que após o final do protocolo não houve marcação positiva de CK7 e α -AML, reduzindo a quase zero a quantidade de DNA (LÜ et al., 2014).

Agentes quelantes de cálcio como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ácido etileno glicol tetracético (EGTA) se ligam aos cátions bivalentes que estão presentes nos locais de adesões entre célula-célula e célula-matriz, facilitando a remoção do material celular dos tecidos. Em geral, o EDTA é usado em associação com a tripsina (método enzimático), sendo importante limitar o tempo de exposição a eles evitando danos à estrutura e composição da matriz (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a; PAN et al., 2014; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

Na decelularização de córneas suínas incubou-se os tecidos em solução de EDTA (isoladamente, depois com adição do detergente SDS), o que resultou na remoção de células sem desestruturação aparente da MEC e na preservação de sua estrutura em camadas. A biocompatibilidade foi mantida, sendo observada integração com tecidos adjacentes e recelularização autóloga após implantação *in vivo*. Com as análises de coloração nuclear por DAPI, núcleos mostraram-se presentes após essa implantação, indicando a migração de células do hospedeiro para o biomaterial (YOERUEK et al., 2012).

Em pâncreas de ratos o uso do EGTA (ácido etileno glicol tetracético) deixou remanescente de DNA menores que 50 ng/mg de matriz e comprimento de fita menor que 200 pares de bases. A preservação da porosidade promoveu adesão celular, conservando ainda componentes de membrana basal como laminina e fibronectina, além de colágeno tipo I e IV. A análise *in vivo* evidenciou resposta inflamatória branda e com presença de angiogênese, assim como formação de redes fibrilares de colágeno após três semanas do implante (XIANG et al., 2015). Já em rins, o protocolo com associação do EGTA e tripsina causou a translucidez do órgão preservando a rede vascular, o microambiente estrutural e seus componentes funcionais (vasos, túbulos e glomérulo); no entanto, em análises histológicas debris proteináceos foram observados em meio à MEC (CARALT et al., 2015).

EDTA e EGTA são dois ácidos quimicamente semelhantes, embora o último apresente maior número de íons carbono, hidrogênio e oxigênio em sua molécula, o que lhe confere maior habilidade em quelar cálcio, comparado ao primeiro (EDTA). Este, por sua vez, além de atuar sobre o cálcio, quela também metais tais como íons de magnésio, levando à interrupção da ação de enzimas (SOUSA; SILVA, 2005; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006b).

2.2 MÉTODOS FÍSICOS DE DECELULARIZAÇÃO

Os métodos físicos de decelularização são tidos como eficazes na preservação da bioatividade da matriz extracelular e seus fatores de crescimento. Dentre os mais comumente utilizados estão o uso de diferentes gradientes de temperatura, aplicação de pressões e ondas sonoras sob o tecido/órgão (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a; FAULK et al., 2014b; FU et al., 2014).

O congelamento, além de ser um método de conservação de tecidos bastante eficaz, provoca a formação de cristais de gelo dentro das células, causando a ruptura da membrana celular. Essa taxa de mudança de temperatura deve ser controlada cuidadosamente para que a formação de gelo não afete também a estrutura da MEC. Enquanto o congelamento é efetivo para a morte celular, as etapas seguintes do protocolo de decelularização devem ser usados para a remoção do material celular remanescente (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a; NONAKA et al., 2014).

Esse método físico pode ser aplicado tanto em tecidos uniformes ou até mesmo em órgãos inteiros. Após serem decelularizados, pulmões de ratos foram submetidos à ciclos alternados de congelamento e descongelamento nas temperaturas de -20°C e -80°C , para avaliação do efeito do congelamento nas suas propriedades ventilatórias. Nenhuma alteração mecânica significativa na matriz dos pulmões decelularizados após tais ciclos foi descrita (NONAKA et al., 2014).

Tendões de equinos congelados e posteriormente incubados com detergentes, apresentaram espaços vazios entre fibras de colágeno e nenhuma estrutura celular visível. Consequentemente menor quantidade de DNA foi encontrada

(cerca de 80% a menos que o controle). Em ensaios *in vitro* houve ainda adesão celular, sendo que com o passar dos dias a densidade e migração celular aumentou gradualmente por entre as fibras de colágeno (BURK et al., 2014).

No mesmo estudo os autores comprovaram ainda que o congelamento melhorou a eficiência da decelularização em etapas posteriores, quando associado aos métodos químicos. Usado isoladamente, o detergente Triton X-100 não foi capaz de remover adequadamente as células dos tendões; entretanto, quando utilizado após o congelamento, maior remoção celular, menores concentrações de DNA remanescente e melhor citocompatibilidade foram observados (BURK et al., 2014).

A aplicação de gradientes de pressão sob o tecido provoca a morte celular e consequente eliminação de resíduos celulares após a decelularização. Esse método é indicado para tecidos mais finos e superficiais (vasos sanguíneos, por exemplo) e que não apresentam uma MEC densamente organizada (fígado e pulmão). Essa técnica facilita a remoção das camadas teciduais de órgãos laminares (tais como intestino delgado e ureter) e pode ser usado isoladamente ou associado aos métodos químicos/enzimáticos. Outro método semelhante é o uso de alta pressão hidrostática em alguns protocolos, reduzindo o tempo de exposição dos tecidos com detergentes mais agressivos (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

A alta pressão hidrostática (*High Hydrostatic Pressure* - HHP) rompe membranas celulares retirando as células de todas as camadas teciduais, sem desnaturar ou reduzir as proteínas de matriz (SANTOSO et al., 2014). Em úteros de ratas a HHP removeu células de todas as suas camadas reduzindo satisfatoriamente a quantidade de DNA. Após remoção de um pequeno fragmento dos cornos uterinos de ratas e posterior implantação *in vivo* do biomaterial, houve o recrutamento de células autólogas (migração e proliferação celular), com consequente regeneração tecidual, e aumento nas proteínas de matriz como o colágeno e elastina. Além disso o novo tecido formado apresentou-se responsivo ao hormônio ovariano estrógeno. Com a conservação das propriedades mecânicas e dos componentes da MEC, as fêmeas foram ainda capazes de ficar prenhas e manter a gestação por mais de 20 dias (SANTOSO et al., 2014).

Na decelularização de corações e fígados de ratos, a HHP não deixou nenhum núcleo visível na coloração de HE. Após as MECs de ambos tecidos (corações e fígados) serem congeladas e trituradas, os fragmentos derivados da MEC hepática apresentaram-se com menor tamanho quando comparados aos do coração. A incubação com fibroblastos por 24 horas mostrou que esses fragmentos menores derivados da matriz hepática promoveram migração celular *in vitro*, ao contrário daqueles derivados do coração (TABUCHI et al., 2015).

Hashimoto et al. (2015) decelularizaram córneas suínas pelo método de HHP demonstrando com sucesso a remoção das células e quantidade remanescente de DNA menor que 50ng/mg de MEC. Apesar de ter apresentado maior período de tempo para re-epitelização do que o observado em córneas normais, a implantação do biomaterial em coelhos permitiu recelularização por queratócitos autólogos e seis meses após a cirurgia, estava totalmente integrado ao tecido adjacente, sem presença de células inflamatórias (macrófago e monócitos) (HASHIMOTO et al., 2015).

A sonicação (aplicação de ondas sonoras em soluções líquidas), quando usada na frequência/magnitude adequada, pode causar o rompimento celular, dependendo da velocidade, do volume do reagente e do comprimento das ondas aplicado na agitação mecânica. A intensidade da sonicação deve ser monitorada constantemente: conforme ela aumenta, sua capacidade de remoção de DNA pode chegar a até 99%; no entanto, alterações estruturais na matriz também são relatadas (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a; AZHIM et al., 2014).

A sonicação associada com métodos químicos aprimora o processo de decelularização, promovendo a ruptura da membrana celular uniformemente em todo tecido. Após curto período de tempo, a posterior imersão no detergente, remove os debris e possíveis remanescente celulares. A técnica possui limitações como o fato de ser aplicada em apenas uma dimensão do tecido; contudo, com algumas modificações no aparato de sonicação, ela pode ser empregada em tecidos com organização estrutural mais complexa. Neste caso, sua intensidade deve ser a mesma em todas as regiões do tecido, para evitar diferenças no processo de decelularização (AZHIM et al., 2014).

Quando utilizou-se a sonicação na decelularização de intestinos de ratos, houve aumento nos espaços entre as redes fibrilares de colágeno, com desorganização da estrutura original da MEC (OLIVEIRA et al., 2013). Já em aortas suínas decelularizadas com a mesma técnica e posterior incubação em SDS, as redes fibrilares de colágeno e elastina foram mantidas (compactadas), as células foram removidas e 90% do DNA eliminado. *In vivo*, o biomaterial apresentou menor quantidade de infiltrado de células CD4 (responsáveis por reações imunológicas contra implantes). Macrófagos foram encontrados nas regiões próximas ao local do implante, iniciando o processo de degradação e remodelação desse biomaterial (AZHIM et al., 2014).

2.3 MÉTODOS ENZIMÁTICOS DE DECELULARIZAÇÃO

Os métodos enzimáticos causam ruptura das células e das ligações peptídicas que as ancoram à MEC, removendo resíduos de DNA que permanecem aderidos às proteínas de matriz após o rompimento nuclear. Seu uso deve ser controlado já que as soluções enzimáticas podem permanecer nos tecidos em quantidades suficientes para desencadear reações imunológicas adversas. Ademais, longos períodos de exposição às enzimas podem causar a desestruturação da matriz com remoção de colágeno, laminina, fibronectina, elastina e GAGs. Exemplos de soluções enzimáticas usadas em protocolos de decelularização são a tripsina e as endonucleases (DNase e RNase) (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; PETERSEN et al., 2012; FU et al., 2014).

A tripsina causa a separação celular da matriz adjacente e pode alterar a quantidade de colágeno tipo I, afetar as GAGs, além de eliminar totalmente a elastina do tecido, causando desordem na matriz e desorganização dos seus poros. Fatores de crescimento também podem ser afetados pela sua ação, de modo que sua concentração pode ser bastante reduzida ou mesmo completamente eliminada (FAULK et al., 2014b; KHORRAMIROUZ et al., 2014; XU et al., 2014; CARALT et al., 2015).

A associação da tripsina com o EDTA é comum em protocolos de decelularização. Após lavagens em soluções hipo e hipertônicas, tumores foram incubados com essa associação antes do tratamento com detergente e após análises de caracterização de matriz e quantificação de DNA, esse foi considerado o protocolo que melhor conservou a distribuição de fibras colágenas, assim como a de GAGs. Em posterior recelularização do biomaterial, as células nele semeadas *in vitro* apresentaram viabilidade celular significativa, sendo capazes de secretar fatores de crescimento como IL-8, VEGF e bFGF (LÜ et al., 2014).

Na decelularização de artérias carótidas, Mancuso et al. (2014) usaram a mesma associação de tripsina e EDTA. Observaram a remoção de células musculares da camada média dos vasos, com conservação dos componentes estruturais da MEC (elastina, colágeno e fibronectina) e dos poros entre as fibras de colágeno. Os autores reportaram, entretanto, eliminação total da laminina, assim como a eliminação quase que 100% da concentração de DNA, não havendo, porém, comprometimento da adesão e proliferação celular.

As endonucleases digerem resíduos de DNA presentes na MEC após o rompimento celular (BÖER et al., 2011). Para remoção eficaz de DNA remanescente, após o rompimento nuclear, a concentração das endonucleases e associação com outros métodos de decelularização deve ser realizado. Em esôfagos suínos a concentração de 2000kU de DNase-I reduziu de forma significativa a quantidade de DNA; no entanto essa mesma concentração foi usada em artérias carótidas e, apesar de ter reduzido consideravelmente a quantidade de DNA, os parâmetros exigidos para uso clínico não foram atingidos (PELLEGATA et al., 2013; TOTONELLI et al., 2013; WRONA et al., 2015).

3 (I ARTIGO) PLACENTA COMO FONTE DE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

Resumo

A placenta é um órgão temporal e dinâmico, que apresenta importantes propriedades imunológicas que permitem o desenvolvimento e sobrevivência do feto, sendo comumente usada para estudar a evolução das espécies. Sob vários aspectos, essas propriedades se assemelham às encontradas na progressão de tumores. Devido ao fato de geralmente ser descartada após o parto e de apresentar uma rica composição de matriz extracelular (MEC), a placenta se torna uma importante fonte de células e matriz para os propósitos da bioengenharia de tecidos e medicina regenerativa. As diferenças em relação aos tipos de classificação das placentas entre as várias espécies, assim como os principais componentes da sua matriz extracelular foram revisados aqui.

Palavras-chave: Placenta. Matriz extracelular. Decelularização.

Abstract

Placenta is a temporal and dynamic organ, which presents important immunological properties that allows fetal development and survival, and is commonly used to study the evolution of species. Under several aspects, its formation resembles tumor progression. The fact that it is usually discarded after birth, allows high yield of stem/progenitor cells and is rich in extracellular matrix, makes it an important source of cells and matrix for tissue engineering and regenerative medicine purposes. The differences regarding the types and classifications of the placentas among several species as well as the placental extracellular matrix components were revised herein.

Key words: Placenta. Extracellular matrix. Decellularization.

3.1 INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão de estrutura complexa que permite o desenvolvimento e nutrição fetal, apresentando inúmeras variações morfológicas entre os mamíferos (CARTER; MESS, 2013). A placentação é a “aproximação ou combinação de um tecido embrionário àqueles naturais à mãe para a realização das trocas fisiológicas” (MOSSMAN, 1987. p. 312), enquanto que o novo tecido formado – a placenta – é definido como a estrutura capaz de permitir tais trocas entre a mãe e o concepto (BENIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006), incluindo gases e nutrientes (MESS; CARTER, 2007). Problemas relacionados à implantação e placentação podem ser as causas de uma deficiência reprodutiva entre os mamíferos (JOHNSON, 2003).

A placentação representa um importante passo no processo evolucionário. O crescimento do embrião dentro de um ovo (oviparidade) permitiu que os vertebrados vivessem na terra e se tornassem independentes da água para reprodução. O embrião desenvolvido dentro de ovos (no caso das aves e espécies não-mamíferas) está envolvido por quatro membranas extra-embriônicas denominadas de âmnio, saco vitelino, alantoide e córion, das quais a placenta dos mamíferos evoluiu (MOSSMAN, 1987). O atual conhecimento das diversidades placentárias nas diferentes espécies de mamíferos sugere as suas distintas origens evolucionárias.

Placentas apresentam importantes propriedades imunoregulatórias, que são representadas pela tolerância do feto pelo sistema imune materno, sendo esse um processo que envolve a inibição de uma excessiva inflamação depois da implantação do blastocisto e proliferação de células T regulatórias (TRIPATHI; GULERIA, 2015). Além disso, elas têm mostrado propriedades anti-inflamatórias, antibacteriana e anticicatrizial, que combinadas com o fato de serem geralmente descartadas após o parto, despertaram o interesse pela sua aplicação na terapia celular e medicina regenerativa (LOPEZ-ESPINOSA et al., 2009; HONG et al., 2010; DE; CHAKRABORTY; BHATTACHARYYA, 2011; CHOI et al., 2013).

3.2 CLASSIFICAÇÕES DAS PLACENTAS

A formação da placenta tem início logo na implantação (nidação), onde ocorre a aposição e adesão do blastocisto formado ao endométrio, e invasão (penetração) do trofoblasto fetal no útero. Esse processo invasivo varia entre os mamíferos eutérios (placentários) e pode ocorrer mediante uma penetração invasiva (como em humanos, macaco *rhesus*, *guinea-pig*), por deslocamento (rato e camundongo) ou ainda por fusão (coelhos e ruminantes) (BISCHOF; MARTELLI, 1992). A penetração do trofoectoderma do concepto no endométrio, que em humanos pode ocorrer em locais ectópicos com grande frequência, assemelha-se à invasões de carcinomas, havendo alterações na expressão de moléculas de adesão e aumento da expressão de proteinases que degradam a matriz extracelular (BISCHOF; MARTELLI, 1992).

A placenta, as membranas fetais e o cordão umbilical correspondem aos anexos fetais (PAROLINI et al., 2008). As membranas fetais compreendem o âmnio (membrana amniótica), uma íntima camada que circunda o feto contendo o líquido amniótico, e o córion, uma camada externa que adere à decídua, sendo a parte materna da placenta (PAROLINI et al., 2008; MAKHOUL; CHIU; CECERE, 2013). O âmnio é um tecido avascular constituído por três camadas (correspondendo à uma camada interna e compacta, uma camada de células mesenquimatosas e uma camada externa intermediária ou camada esponjosa), ou ainda mais detalhadamente como uma membrana apresentando cinco camadas distintas: 1) camada epitelial amniótica, que apresenta uma única camada de células cuboides ou colunares; 2) membrana basal; 3) camada compacta ou estroma rica em fibras colágenas; 4) camada fibroblástica e 5) uma camada esponjosa ou rica em mucina, mais próxima do córion (PAROLINI et al., 2008; NIKNEJAD et al., 2013). O córion é composto por mesênquima e uma região de células trofoblásticas extravilosas proliferativas (PAROLINI et al., 2008).

Em embriões de mamíferos, o âmnio e os principais componentes do saco vitelino (endoderma) e alantóide são derivados da massa celular interna do blastocisto, enquanto que a camada mais externa de células dará origem ao trofoblasto e contribuirá para a formação das membranas extra-embrionárias. Somente quando o mesoderma, que apresenta ramos dos vasos vitelinos, está

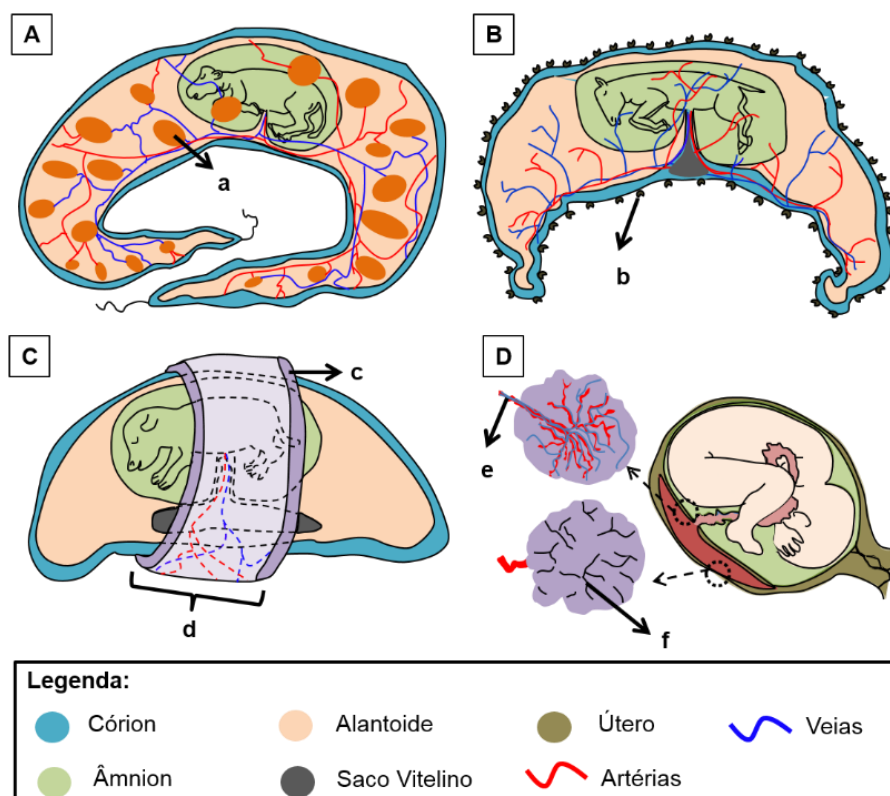
interposto entre o endoderma e o trofoblasto, é que a troca materno-fetal é estabelecida (CARTER; ENDERS, 2004). Essa estrutura trilaminar – endoderma, mesoderma e trofoblasto – forma o coriovitelino ou saco vitelino da placenta, que persiste até o parto em algumas espécies como roedores e logomorfos (CARTER; ENDERS, 2004; MESS; CARTER, 2007). Em outras espécies, como nos humanos, o crescimento do alantoide causa o deslocamento do saco vitelino do trofoblasto, e então a placentação corioalantoide é estabelecida; essa é vascularizada pelos vasos do alantoide ou vasos umbilicais (MESS; CARTER, 2007).

Na placenta corionalantoide, três camadas maternas e três camadas fetais podem ser observadas justapostas logo após a formação da placenta: 1) o endotélio fetal dos capilares do alantoide; 2) o tecido conjuntivo fetal do mesoderma corioalantoide; 3) o epitélio coriônico formado pelo trofoblasto; 4) os capilares endoteliais maternos dos vasos sanguíneos do endométrio; 5) o estroma uterino ou tecido conjuntivo do endométrio (decídua) e 6) o epitélio uterino (MESS; CARTER, 2007). A decídua corresponde ao lado materno da interface materno-fetal, enquanto que o lado fetal dessa interface corresponde ao trofoblasto da placenta (JOHNSON, 2003).

Placentas são comumente classificadas de acordo com suas características macroscópicas, ou conforme o tipo de interface materno-fetal (barreira) e o tipo de interdigitação materno-fetal (estrutura interna).

Dependendo de suas características macroscópicas, que também envolvem a distribuição das áreas de contato entre as membranas fetais e o endométrio, as placentas são denominadas: 1) discoide, onde uma única área de contato dará origem à placenta (humanos, primatas e roedores); 2) cotiledonária, onde múltiplas áreas do corioalantoide são formadas com o endométrio (ruminantes); 3) difusa, em que a grande maioria da superfície do corioalantoide está envolvida na formação da placenta (observada em equinos, suínos e baleias) e 4) zonária, onde a placenta forma uma espécie de anel ao redor do feto (observada em carnívoros como cachorras, gatas, ursos e elefantas). Na placenta cotiledonária, a porção fetal em contato é denominada cotilédone, a porção materna é conhecida como carúncula e o complexo cotilédone-carúncula é chamado de placentoma (**Figura 3**).

Figura 3 - Tipos morfológicos das placentas: discoide, cotiledonária, difusa e zonária



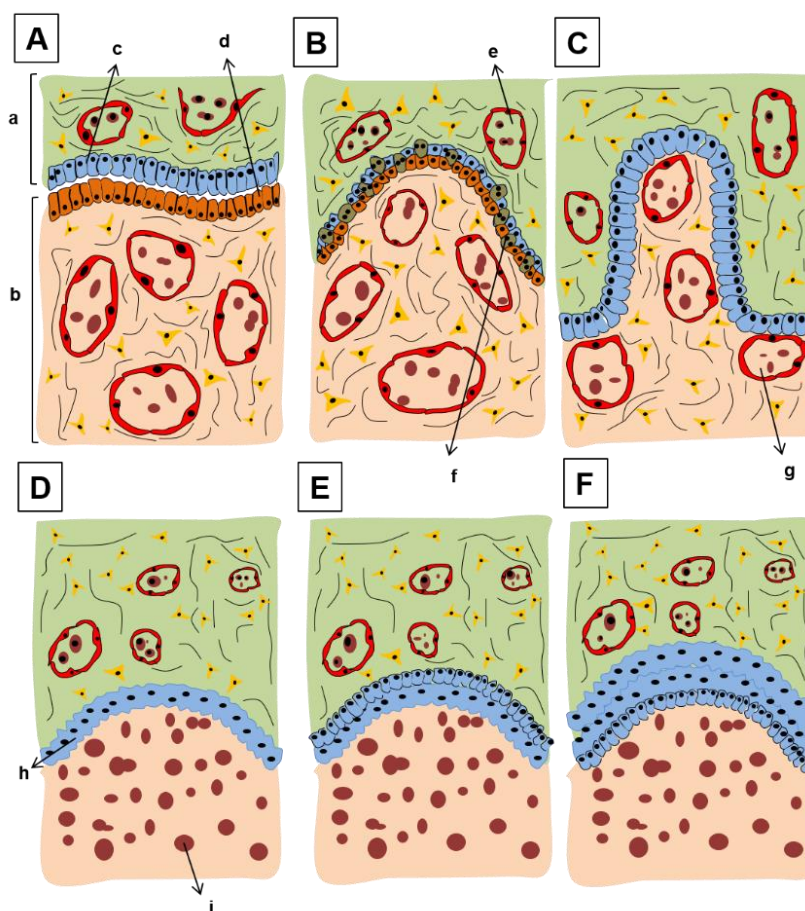
Fonte: Steven e Morriss (1975); Benirschke, Kaufmann e Baergen (2006) e Vejlsted (2012), modificado por Leonel (2015).

Legenda: **A** – Placenta cotiledonária da espécie bovina e outros ruminantes; **B** – placenta difusa encontrada nas espécies equina e suína; **C** – placenta zonária de carnívoros; **D** – placenta discoide da mulher com visão da parte fetal (superior à esquerda) e do cordão umbilical e outra da parte materna (inferior à esquerda) contrastando os sulcos cotiledonários; **a** – cotilédones; **b** – microcotilédones; **c** – hematoma marginal; **d** – placenta zonária da cadela; **e** – cordão umbilical; **f** – sulcos cotiledonários.

De acordo com a interface materno-fetal (relação entre o trofoblasto fetal e superfície endometrial materna), as placentas são classificadas em: 1) epiteliocorial, onde o trofoblasto está justaposto através de uma simples interdigitação microvilar do epitélio uterino (observada em cavalos, porcos e ruminantes como bovinos, ovinos, caprinos e veado); 2) sinepiteliocorial, onde há uma aposição do trofoblasto com o tecido conjuntivo materno, mas com a persistência do epitélio uterino que é modificado pela migração de células trofoblásticas binucleares/gigantes (esse termo é atualmente usado em substituição de sindesmocorial); 3) endoteliocorial, na qual o trofoblasto está em contato com o endotélio dos vasos sanguíneos materno (encontrada em carnívoros) e 4) hemocorial, onde o trofoblasto está em contato direto com o sangue materno (observada em humanos, macacos e roedores). No entanto, uma combinação dessas interfaces pode ser observada em diferentes espécies, como nos

ruminantes. O tipo hemocorial pode ser subdividido em hemo-monocorial, hemo-dicorial e hemo-tricorial, dependendo do número de camadas de células trofoblásticas observadas na superfície vilosa, como visto em primatas (CARTER; ENDERS, 2004; PETER, 2013) (**Figura 4**).

Figura 4 - Esquemas das barreiras materno-fetais epiteliocorial, sinepiteliocorial, endoteliocorial e hemocorial



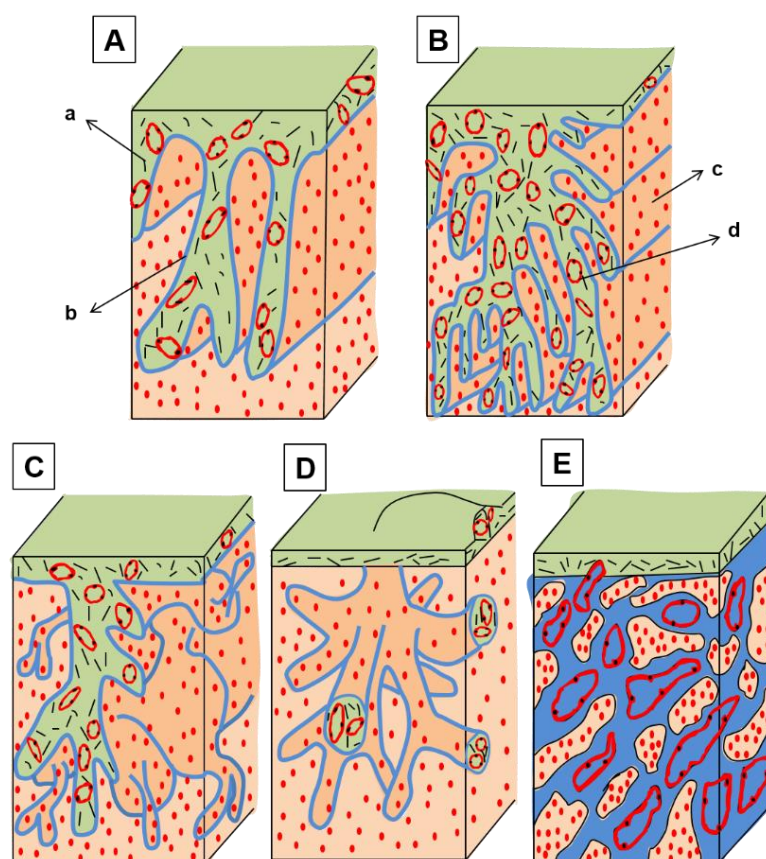
Fonte: Vejlsted (2012) e Furukawa, Kuroda e Sugiyama (2014), modificado por Leonel (2015).

Legenda: **A** – placenta epiteliocorial encontrada nas espécies suína e equina; **B** – placenta sinepiteliocorial de ruminantes; **C** – placenta endoteliocorial encontrada nos carnívoros; **D** – placenta hemo-monocorial de *guinea-pig* e da placenta humana à termo com uma única camada de trofoblasto; **E** – placenta hemo-dicorial encontrada em coelhos e no primeiro trimestre da gestação humana apresentando duas camadas de trofoblasto; e **F** – placenta hemo-tricorial de camundongos e com três camadas de trofoblasto. **a** – componentes fetais da placenta; **b** – componentes maternos da placenta; **c** – citotrofoblasto; **d** – epitélio endometrial; **e** – vasos fetais; **f** – células binucleadas; **g** – vasos maternos; **h** – sinciotrofoblasto; **i** – células vermelhas do sangue.

Conforme o tipo de interdigitação materno-fetal (estrutura interna), placentas são descritas como: 1) pregueada (porcos); 2) lamelar (carnívoros); 3) trabecular, em que os vasos sanguíneos fetais formam uma espécie de árvore vilosa, que é rodeada

pele sangue materno em seu espaço intertrabecular (alguns primatas); 4) labiríntica, onde os capilares fetais estão em paralelo com os capilares maternos ou canais/redes repletas de sangue (roedores, logomorfos como coelhos, insetívoros) e 5) vilosa, em que uma espécie de árvore vilosa flutuante é rodeada por sangue materno em um espaço intervílico (humanos) (CARTER; MESS, 2013) (**Figura 5**).

Figura 5 - Tipos de interdigitações materno-fetais: pregueada, lamelar, trabecular, vilosa e labiríntica



Fonte: Benirschke, Kaufmann, Baergen (2006), modificado por Leonel (2015).

Legenda: **A** – Tipo de placenta com interdigitação pregueada encontrada em placenta difusa; **B** – Tipo lamelar de interdigitação placentária descrita em carnívoros; **C** – Tipo de interdigitação trabecular encontrada em alguns macacos (*Callithrix*), é semelhante ao tipo pregueada e lamelar; **D** – Tipo de interdigitação vilosa da placenta de ruminantes e primatas mais evoluídos; **E** – Tipo de interdigitação labiríntica encontrada em algumas espécies de roedores e alguns macacos menos evoluídos, caracterizada pela penetração do trofoblasto com canais repletos com sangue materno e/ou vasos fetais. **a** – tecidos fetais; **b** – trofoblasto; **c** – tecidos maternos; **d** – vasos fetais.

Baseado nesses critérios, a placenta humana é considerada do tipo discoide, corionalantoide, hemocorial e vilosa. Em contrapartida a placenta canina, pode ser classificada como zonária, corialantoide, endoteliocorial e lamelar. No entanto, é importante realçar que nem todas as combinações das classificações das placentas foram vistas ou descritas.

3.3 MATRIZ EXTRACELULAR DA PLACENTA

A matriz extracelular (MEC) é sintetizada pelas células, sendo fundamental para a determinação de seu microambiente e provendo suporte estrutural e funcional para tecidos e órgãos (BORNSTEIN; SAGE, 2002; LUTOLF; GILBERT; BLAU, 2009; SCHULTZ; WYSOCKI, 2009). A remodelação da MEC endometrial e do córion é fundamental para o processo de implantação e placentação (KORHONEN; VIRTANEN, 1997; GUILLOMOT et al., 2014). Igualmente importante é a remodelação placentária que ocorre ao longo da gestação, que leva à diferenças na composição da MEC em diferentes idades gestacionais (KORHONEN; VIRTANEN, 1997; JOHNSON, 2003; GUILLOMOT et al., 2014).

A MEC é um componente crucial do microambiente tecidual que compreende os sinais bioquímicos e biofísicos que a célula recebe da matriz, células vizinhas, sistema imune e fatores solúveis como citocinas, hormônios e fatores de crescimento (XU; BOUDREAU; BISSELL, 2009). A síntese e remodelação da MEC (ciclo degradação/síntese) é um importante passo para a morfogênese, para a cicatrização de feridas e manutenção tecidual (SCHULTZ; WYSOCKI, 2009; XU; BOUDREAU; BISSELL, 2009).

A MEC implementa um ambiente regulatório de sinais bioquímicos que somado à propriedades biofísicas, tais como mecânicas e arquitetônicas/topográficas, garantem valiosas informações no que dizem respeito ao comportamento celular (BORNSTEIN; SAGE, 2002; LUTOLF; GILBERT; BLAU, 2009).

A interação entre célula-matriz extracelular regula o destino celular mediante um processo denominado reciprocidade dinâmica, no qual MEC e núcleo celular estão constantemente regulando um ao outro (BISSELL; HALL; PARRY, 1982; XU; BOUDREAU; BISSELL, 2009). Essa interação dinâmica e recíproca é mediada pelas integrinas que levam à uma reorganização da actina e de outros componentes do citoesqueleto (como microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos), além das laminas, que são proteínas estruturais do envelope nuclear e que estão conectadas ao citoesqueleto através da nesprina. Em última análise, essas ligações

influenciam a forma global e específica do locus da cromatina e conseqüentemente, modulam a expressão gênica (XU; BOUDREAU; BISSELL, 2009).

Inversamente, células podem ativamente remodelar a MEC através da tensão do citoesqueleto. Desta forma, pode-se por exemplo, modular a agregação de fibronectina e regular a transcrição de metaloproteínases de matriz (MMPs). Portanto, características físicas e bioquímicas (moduladas por processos de mecanotransdução), localização nuclear, movimento, expressão gênica e homeostase tecidual são diretamente reguladas (XU; BOUDREAU; BISSELL, 2009).

As proteínas da MEC são classificadas em quatro grupos principais: 1) proteínas estruturais (como o colágeno e elastina), 2) glicoproteínas adesivas com múltiplos domínios (como a fibronectina, laminina, vitronectina), 3) glicosaminoglicanas (como o hialurano) e proteoglicanas (como versican, sindecan, glipican, perlecan, também conhecida como proteína de proteoglicano de heparan sulfato (HSPG) ou proteoglicana de heparan sulfato 2 – HSPG2) e 4) proteínas matricelulares, que são proteínas com variadas funções, que interagem com proteínas estruturais assim como com receptores celulares, proteases, hormônios e outras moléculas bioativas. Exemplos de proteínas matricelulares são a SPARC (proteína secretora rica em cisteína) – que inclui a osteonectina, trombospondina 1 e 2, tenascina C e X, osteopontina e periostina (BORNSTEIN; SAGE, 2002; SCHULTZ; WYSOCKI, 2009; MORRIS; KYRIAKIDES, 2014).

Proteínas matricelulares (anteriormente denominadas matriz pericelular) estão localizadas em um sub compartimento da matriz extracelular adjacente à células e têm sido classificadas em diferentes categorias devido ao fato de serem encontradas em baixos níveis nos tecidos adultos: sua expressão é aumentada no desenvolvimento, patologias e depois de lesões e podem ser encontradas no estado solúvel ou insolúvel. Funcionalmente atuam como moduladoras de interação célula-matriz, muitas vezes podem induzir desprendimentos de células se opondo à maioria das proteínas de adesão encontradas na matriz e produzem, em camundongos *knockout*, um fenótipo de grosseiramente normal a sútil (BORNSTEIN; SAGE, 2002; BORNSTEIN, 2009; MORRIS; KYRIAKIDES, 2014).

Durante a decidualização, processo de remodelagem endometrial que ocorre depois da ovulação em preparação para a gestação, as proteínas matricelulares (membrana basal) encontradas ao redor de cada célula decidual compreendem lamina com cadeias $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\gamma 1$, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicano de heparan sulfato (WEWER et al., 1985; KORHONEN; VIRTANEN, 1997; GELLERSEN; BROSENS; BROSENS, 2007). As células da decidualização estromal controlam a invasão do trofoblasto, resistem ao estresse oxidativo, inflamatório e às respostas imunes maternas (GELLERSEN; BROSENS; BROSENS, 2007).

Outra proteína matricelular encontrada ao longo da placentação e que é conhecida por ter diversas funções no útero é a osteopontina. Ela influencia a implantação e a placentação, desempenhando papéis desde os estágios iniciais até os períodos mais avançados da gestação. A osteopontina tem sido relacionada com a transdução de sinal na adesão da interface útero-placenta, sendo expressa no estroma uterino e associada ao grau de invasão do concepto, regulando o comportamento de células imunes e a produção de citocinas (JOHNSON, 2003).

Outra importante proteína matricelular é a proteoglicana pequena rica em leucina (*Small Leucin-rich Proteoglycan - SLRP*) denominada decorina. A expressão diminuída de decorina tem sido associada com proliferação, remodelação e vascularização de tecidos placentários e sua desregulação, com anomalias placentárias de clones bovinos produzidos por transferência nuclear de células somáticas (GUILLMOT et al., 2014). A expressão diminuída do gene da decorina diminui também a proliferação de células endoteliais da microvasculatura humana provavelmente devido à uma conseqüente queda da expressão intracelular de EGFR1, IGFR1 e VEGFR, assim como pela formação de redes de trombina (CHUI et al., 2014).

A MEC apresenta locais específicos de ligação para fatores de crescimento, que influenciam sua disponibilidade e sinalização. As fibronectina, vitronectina, tenascina C, osteopontina, fibrinogênio e o colágeno I de menor tamanho, são particularmente importantes para a ligação de fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento fibrobláticos (FGF) e neurotrofina (MARTINO et al., 2014). O PIGF apresenta dois

tipos de *splices* alternativos chamados PIGF-1 e PIGF-2, esse último apresenta uma sequência de ligação para heparina próximo à extremidade terminal C e se liga fortemente a várias outras proteínas da MEC, se opondo à PIGF-1 que não apresenta local de ligação aos componentes da MEC (ATHANASSIADES; LALA, 1998; MARTINO et al., 2014). PIGF é sintetizada pelas células trofoblásticas extravilosas humanas e pela placenta humana e interage somente com o receptor de VEGF Flt-1 mas não com KDR (região contendo o domínio quinase) (ATHANASSIADES; LALA, 1998).

3. 4 CONCLUSÃO

Durante toda a gestação, a placenta será o órgão responsável pela manutenção e sobrevivência do feto em todos mamíferos eutérios. Apesar de apresentar a mesma função entre os mamíferos, são encontradas variabilidades entre as espécies que permitem classificá-las de acordo com aspectos morfológicos/macrocópicos, aspectos microscópicos e com base ainda no tipo de interação em que estabelecem entre os tecidos maternos e fetais. Igualmente variável, é sua composição de matriz extracelular contendo proteínas estruturais e responsáveis por sinalização celular durante todo o período embriológico. A matriz extracelular, inclusive a derivada de placentas, tem sido amplamente utilizada na bioengenharia de tecidos. A variabilidade desse órgão observado nas diferentes espécies deve ser melhor estudada com vistas as potenciais aplicações clínicas.

REFERÊNCIAS

- ATHANASSIADES, A.; LALA, P. K. Role of placenta growth factor (PIGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. **Placenta**, v. 19, n. 7, p. 465–73, set. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9778119>>. Acesso em: 5 set. 2015.
- BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P.; BAERGEN, R. N. **Pathology of the Human Placenta**. 5. ed. Nova Iorque: Springer, 2006.
- BISCHOF, P.; MARTELLI, M. Current topic: Proteolysis in the penetration phase of the implantation process. **Placenta**, v. 13, n. 1, p. 17–24, jan. 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014340049290003C>>. Acesso em: 5 set. 2015.
- BISSELL, M. J.; HALL, H. G.; PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? **Journal of Theoretical Biology**, v. 99, n. 1, p. 31–68, 7 nov. 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6892044>>. Acesso em: 5 set. 2015.
- BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 5, p. 608–16, out. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12231357>>. Acesso em: 5 set. 2015.
- BORNSTEIN, P. Matricellular proteins: an overview. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 3, n. 3-4, p. 163–5, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2778588&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16 jul. 2015.
- CARTER, A. M.; ENDERS, A. C. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. **Reproductive Biology and Endocrinology** : RB&E, v. 2, p. 46, 5 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=455692&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 set. 2015.
- CARTER, A. M.; MESS, A. M. Conservation of placentation during the tertiary radiation of mammals in South America. **Journal of Morphology**, v. 274, n. 5, p. 557–69, maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23355381>>. Acesso em: 5 set. 2015.
- CHOI, J. S.; KIM, J. D.; YOON, H. S.; CHO, Y. W. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules. **Tissue Engineering. Part A**, v. 19, n. 3-4, p. 329–39, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3542901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 set. 2015.
- CHUI, A.; MURTHI, P.; GUNATILLAKE, T.; BRENNECKE, S. P.; IGNJATOVIC, V.; MONAGLE, P. T.; WHITELOCK, J. M.; SAID, J. M. Altered decorin leads to disrupted endothelial cell function: a possible mechanism in the pathogenesis of fetal growth

restriction? **Placenta**, v. 35, n. 8, p. 596–605, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24947404>>. Acesso em: 5 set. 2015.

DE, D.; CHAKRABORTY, P. D.; BHATTACHARYYA, D. Regulation of trypsin activity by peptide fraction of an aqueous extract of human placenta used as wound healer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 8, p. 2033–40, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21520055>>. Acesso em: 5 set. 2015.

FURUKAWA, S.; KURODA, Y.; SUGIYAMA, A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 11–8, abr. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4000068&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 set. 2015.

GELLERSEN, B.; BROSENS, I. A.; BROSENS, J. J. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 6, p. 445–53, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17960529>>. Acesso em: 2 set. 2015.

GUILLOMOT, M.; CAMPION, E.; PRÉZELIN, A.; SANDRA, O.; HUE, I.; LE BOURHIS, D.; RICHARD, C.; BIASE, F. H.; RABEL, C.; WALLACE, R.; LEWIN, H.; RENARD, J.-P.; JAMMES, H. Spatial and temporal changes of decorin, type I collagen and fibronectin expression in normal and clone bovine placenta. **Placenta**, v. 35, n. 9, p. 737–47, set. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25012297>>. Acesso em: 5 set. 2015.

HONG, J. W.; LEE, W. J.; HAHN, S. B.; KIM, B. J.; LEW, D. H. The effect of human placenta extract in a wound healing model. **Annals of Plastic Surgery**, v. 65, n. 1, p. 96–100, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20548228>>. Acesso em: 5 set. 2015.

JOHNSON, G. A. Osteopontin: Roles in Implantation and Placentation. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 5, p. 1458–1471, 9 jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12890718>>. Acesso em: 6 abr. 2015.

KORHONEN, M.; VIRTANEN, I. The distribution of laminins and fibronectins is modulated during extravillous trophoblastic cell differentiation and decidual cell response to invasion in the human placenta. **The journal of Histochemistry and Cytochemistry** : official journal of the Histochemistry Society, v. 45, n. 4, p. 569–81, abr. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111235>>. Acesso em: 5 set. 2015.

LOPEZ-ESPINOSA, M.-J.; SILVA, E.; GRANADA, A.; MOLINA-MOLINA, J.-M.; FERNANDEZ, M. F.; AGUILAR-GARDUÑO, C.; OLEA-SERRANO, F.; KORTENKAMP, A.; OLEA, N. Assessment of the total effective xenoestrogen burden in extracts of human placentas. **Biomarkers** : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals, v. 14, n. 5, p. 271–7, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19476411>>. Acesso em: 5 set. 2015.

LUTOLF, M. P.; GILBERT, P. M.; BLAU, H. M. Designing materials to direct stem-cell fate. **Nature**, v. 462, n. 7272, p. 433–41, 26 nov. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2908011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 jul. 2014.

MAKHOUL, G.; CHIU, R. C. J.; CECERE, R. Placental mesenchymal stem cells: a unique source for cellular cardiomyoplasty. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 95, n. 5, p. 1827–33, maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23541427>>. Acesso em: 5 set. 2015.

MARTINO, M. M.; BRIQUEZ, P. S.; GÜÇ, E.; TORTELLI, F.; KILARSKI, W. W.; METZGER, S.; RICE, J. J.; KUHN, G. A.; MÜLLER, R.; SWARTZ, M. A.; HUBBELL, J. A. Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing. **Science (New York, N.Y.)**, v. 343, n. 6173, p. 885–8, 21 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/343/6173/885.short>>. Acesso em: 1 jun. 2015.

MESS, A.; CARTER, A. M. Evolution of the placenta during the early radiation of placental mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, n. 4, p. 769–79, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17347003>>. Acesso em: 5 set. 2015.

MORRIS, A. H.; KYRIAKIDES, T. R. Matricellular proteins and biomaterials. **Matrix Biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 37, p. 183–91, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4167162&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 set. 2015.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes: comparative ontogeny and morphology; evolution; phylogenetic significance; basic functions; research opportunities**. 1. ed. London: The Macmillan Press LTDA, 1987.

NIKNEJAD, H.; PAEINI-VAYGHAN, G.; TEHRANI, F. A.; KHAYAT-KHOEI, M.; PEIROVI, H. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. **Placenta**, v. 34, n. 4, p. 340–5, abr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23465536>>. Acesso em: 5 set. 2015.

PAROLINI, O.; ALVIANO, F.; BAGNARA, G. P.; BILIC, G.; BÜHRING, H.-J.; EVANGELISTA, M.; HENNERBICHLER, S.; LIU, B.; MAGATTI, M.; MAO, N.; MIKI, T.; MARONGIU, F.; NAKAJIMA, H.; NIKAIIDO, T.; PORTMANN-LANZ, C. B.; SANKAR, V.; SONCINI, M.; STADLER, G.; SURBEK, D.; TAKAHASHI, T. A.; REDL, H.; SAKURAGAWA, N.; WOLBANK, S.; ZEISBERGER, S.; ZISCH, A.; STROM, S. C. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 26, n. 2, p. 300–11, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17975221>>. Acesso em: 8 jul. 2015.

PETER, A. T. Bovine placenta: a review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 693–705, 15 out. 2013. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X1300246X>>. Acesso em: 5 set. 2015.

SCHULTZ, G. S.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. **Wound Repair and Regeneration** : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, v. 17, n. 2, p. 153–62, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19320882>>. Acesso em: 29 jul. 2015.

STEVEN, D.; MORRISS, G. Development of the foetal membranes. In: STEVEN, D. H. (Ed.). **Comparative placentation: Essays in structure and functions**. London: Academic press, 1975. p. 58–86.

TRIPATHI, S.; GULERIA, I. Role of PD1/PDL1 pathway, and TH17 and treg cells in maternal tolerance to the fetus. **Biomedical Journal**, v. 38, n. 1, p. 25–31, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25355392>>. Acesso em: 5 set. 2015.

VEJILSTED, M. Placentação comparada. In: HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. (Ed.). **Embriologia Veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 104–119.

WEWER, U. M.; FABER, M.; LIOTTA, L. A.; ALBRECHTSEN, R. Immunochemical and ultrastructural assessment of the nature of the pericellular basement membrane of human decidual cells. **Laboratory Investigation**: a journal of technical methods and pathology, v. 53, n. 6, p. 624–33, 1 dez. 1985. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/20739883_Immunochemical_and_ultrastructural_assessment_of_the_nature_of_pericellular_basement_membrane_of_human_decidual_cells>. Acesso em: 5 set. 2015.

XU, R.; BOUDREAU, A.; BISSELL, M. J. Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra- and intra-cellular matrices. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1-2, p. 167–76, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2720096&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 set. 2015.

4 (II ARTIGO) COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA DECELULARIZAÇÃO DE PLACENTAS CANINAS

Resumo

Vários métodos de decelularização de tecidos são descritos para a produção de biomaterias bioativos acelulares. Idealmente a remoção celular feita por métodos químicos, físicos e/ou enzimáticos deve preservar a composição e arranjo estrutural da matriz celular (MEC), e varia de acordo com cada tecido. Placentas caninas foram submetidas a dez protocolos preliminares, a partir dos quais foram selecionados dois, o protocolo I que utilizou 1% SDS, 5mM EDTA + 50mM TRIS + 0,5% antibiótico e Triton X-100 1% e protocolo II 1% SDS, 5m EDTA, 0,05% tripsina, 0,5% antibiótico e Triton X-100 1%. Placentas decelularizadas pelo protocolo I conservaram melhor a estrutura da MEC, mas mostraram maior quantidade de núcleo celular remanescente e concentração de DNA, ao contrário do observado pelas amostras decelularizadas com o protocolo II. As proteínas de matriz laminina, fibronectina e colágeno tipo I foram preservadas. O protocolo II proporcionou maior remoção de células, apresentando uma tendência de diminuição de concentração de DNA, embora tenha afetado mais a estrutura da MEC, este protocolo mostrou-se o mais promissor, dentre os testados, para a decelularização de placentas caninas.

Palavras-chave: Biomaterial. Engenharia de tecidos. Placenta.

Abstract

Various methods for tissue decellularization have been described aiming at producing acellular bioactive biomaterials. Ideally, cell removal performed using chemical, physical and/or enzymatic methods, should preserve the composition and structure of the remaining extracellular matrix (ECM) and varies among tissues. Canine placentas were subjected to ten protocols for decellularization and two of them were chosen afterward: protocol I (SDS 1%, 5mM EDTA, 50mM TRIS, 0,5% antibiotic and Triton X-100 1%) or protocol II (SDS 1%, 5mM EDTA, 0,05% trypsin, 0,5% antibiotic and Triton X-100 1%). Placentas decellularized using protocol I better preserved the ECM structure but kept larger amount of cells as well DNA concentration, as opposed to that were decellularized using protocol II. The matrices proteins laminin, fibronectin and

collagen type I were preserved. Protocol II optimized cell removal and presented a trend of lower DNA concentration. Although it has affected the ECM structure, it was shown to be the most promising protocol, among the tested ones, for decellularization of canine placentas.

Key words: Biomaterial. Tissue engineering. Placenta.

4.1 INTRODUÇÃO

Variados protocolos de decelularização são descritos na literatura, os quais visam a remoção do conteúdo celular e nuclear de determinado tecido/órgão, enquanto conservam as propriedades biológicas e mecânicas da matriz extracelular (MEC) remanescente, que pode então ser utilizada como biomaterial em medicina regenerativa (FU et al., 2014; PAN et al., 2014; GONZÁLEZ-ANDRADES et al., 2015; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

Biomaterias biológicos derivados da MEC podem apresentar conexões estruturais intrínsecas de vários componentes fibrilares e moléculas funcionais sendo elas proteínas, glicoproteínas, carboidratos e fatores de crescimento. Essas características justificam seu uso na bioengenharia de tecidos, pois servem não só como suporte estrutural tridimensional para regeneração de lesões teciduais, mas também permitem aderência e proliferação celular (LU et al., 2012; GUAN et al., 2015).

Idealmente a remoção celular deve ser realizada afetando o mínimo possível a conformação estrutural da MEC, preservando as características nativas do tecido. Entretanto, métodos de decelularização inevitavelmente alteram a matriz. A extensão dessas modificações muito depende de fatores como espessura, densidade e quantidade de células do tecido/órgão. Portanto, análises minuciosas e comparativas de métodos de decelularização são necessárias (FAULK et al., 2014b).

Os métodos de decelularização podem ser classificados como químicos, físicos e enzimáticos; contudo a maioria dos protocolos descritos trazem uma combinação

entre tais métodos com objetivo de otimizá-los, aumentando sua eficiência e minimizando a exposição exacerbada às soluções que causariam irreversíveis danos à MEC (FAULK et al., 2014b; FU et al., 2014; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

Este trabalho objetiva comparar a eficácia de protocolos a serem utilizados na decelularização das porções materna e fetal de placentas caninas, para produção de biomaterial acelular bioativo, visando futuras aplicações na bioengenharia de tecidos.

Para tanto, a remoção do conteúdo celular, a concentração de DNA remanescente e a preservação de algumas proteínas da MEC após a decelularização foram avaliadas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

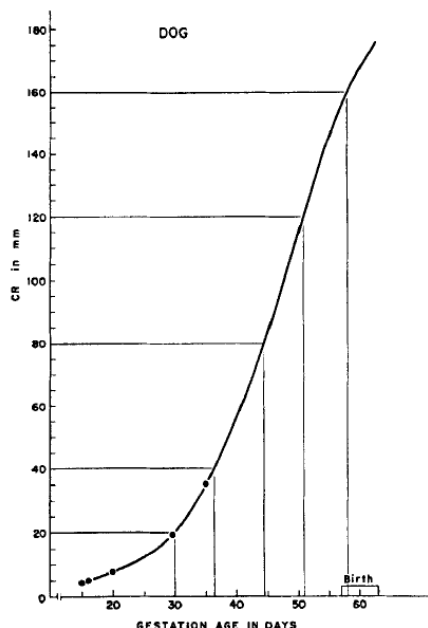
4.2.1 Coleta

O trabalho descrito foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ-USP) com número de protocolo 4195280115. Foram usados úteros de cadelas prenhas coletados em campanha de castração realizada no município de Embu das Artes – SP, entre os meses de Junho/2014 à Agosto/2015. Após a cirurgia de ovarioasalpingohisterectomia (OSH) os úteros foram acondicionados em caixas térmicas com gelo e transportados para o laboratório, para o início do processamento.

A idade gestacional dos fetos foi definida com a mensuração do *crown-rump* (CR), que se refere à medida da distância entre o ponto mais alto da cabeça de cada feto até o início da cauda. Essa medida então comparada ao gráfico descrito por Evans e Sack (1973) (**Gráfico 1**).

As placentas foram dissecadas, lavadas em água corrente e a porção materna e fetal, separadas.

Gráfico 1 - Gráfico utilizado para o cálculo da idade gestacional dos fetos



Fonte: Evans e Sack (1973).

Legenda: No eixo 'Y' tem-se as medidas do tamanho dos fetos em milímetros; no eixo 'X' os dias gestacionais referentes ao seu comprimento em milímetros.

4.2.2 Métodos para decelularização das placentas caninas

Inicialmente dez protocolos diferentes foram usados para decelularização das placentas caninas (**Quadro 1**). Variáveis como concentração e tempo de incubação em detergentes e soluções enzimáticas, imersão, perfusão, diferença de gradientes de temperatura e incubação estática vs. agitação foram testadas. Para a avaliação da eficácia inicial dessas variáveis, utilizou-se como parâmetros: 1) a transparência adquirida pelo tecido durante a incubação com detergentes (quanto maior a translucência, melhor o resultado), e 2) análises histológicas, com coloração de HE e Tricrômio de Masson para a localização de possíveis núcleos celulares remanescentes na MEC, após o término dos referidos protocolos (quanto menor o número de núcleos remanescentes, melhor). Caso o tecido placentário não adquirisse o aspecto translúcido (conforme descrito em literatura para biomateriais decelularizados) e ainda apresentasse marcação nuclear visível pelas técnicas

histológicas, um novo protocolo era estabelecido usando novos reagentes e testando as variáveis citadas.

A análise dessas variáveis contribuiu para a elaboração de dois protocolos, descritos no **Quadro 2**, que foram posteriormente utilizados.

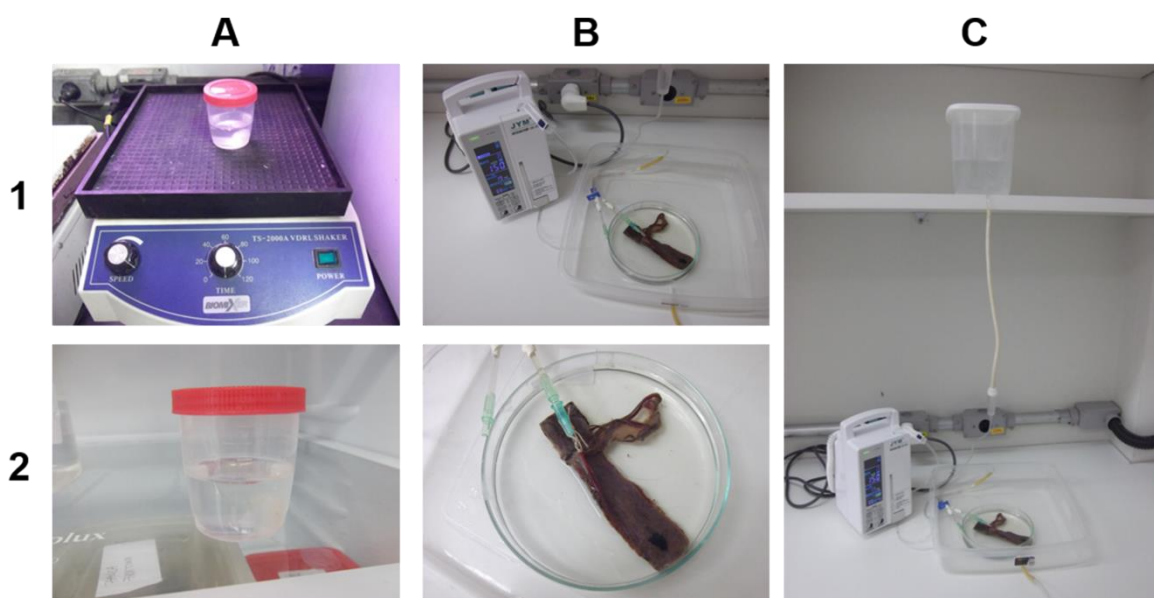
O método de decelularização por imersão (**Figura 6 – 1A e 2A**) foi utilizado com 86 fragmentos da porção fetal da placenta canina e 55 fragmentos da porção materna, divididos entre os dez protocolos iniciais. Após a lavagem em água corrente, ambas porções foram seccionadas em amostras de aproximadamente 2,5cm de comprimento x 2,5cm de largura e imersas nos reagentes com volume de 30ml por amostra. À imersão, associou-se agitação das amostras em 'Agitador TS-2000A tipo VDRL Shaker' (Biomixer). Para o método de perfusão foram usadas 4 porções fetais, lavadas em água corrente, canuladas com cateter nº 20 e perfundidas por período de 12 horas por dia utilizando o aparelho 'JYM – Infusion Pump JSB-1200' (Jian Yuan Medical Technology Co. Ltda, Changsha, China), com vazão de 150ml/hr (**Figura 6 – 1B, 2B e Coluna C**).

As amostras decelularizadas com os protocolos descritos no **Quadro 2** foram canuladas com cateter nº 18 e perfundidas com 60ml de água corrente para a remoção do sangue dentro dos vasos sanguíneos. Após essa perfusão, as amostras foram fragmentadas com 2cm de comprimento x 2cm de largura, lavadas três vezes com água destilada por 5 minutos e incubadas com SDS 1% por 4 dias. No primeiro dia de incubação foram realizadas três trocas da solução e nos dias restantes duas: uma no período diurno e outra no período noturno. Após a incubação com o detergente, foram realizadas três lavagens com solução de 40 mM de HEPES + 0,5% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina) por cinco minutos. A partir daí, as amostras foram então divididas entre os dois protocolos: no Protocolo I, as amostras foram incubadas em 5mM EDTA + 50 mM TRIS + 0,5% de antibiótico (ATB) e no Protocolo II em 5 mM EDTA + 0,05% de Tripsina + 0,5% de ATB por 48 horas, havendo duas trocas diárias das soluções. Posteriormente a essa incubação, mais três lavagens com 40 mM HEPES + 0,5% de ATB por cinco minutos foram realizadas e seguindo-se com imersão em Triton X-100 a 1% por 2 dias, também com duas trocas. No último dia de protocolo, três lavagens em PBS 1x + 0,5% de ATB por uma hora, três lavagens com álcool 70% por trinta minutos e três lavagens também de trinta minutos em PBS 1x +

0,5% de ATB foram realizadas, totalizando 10 dias de protocolos, como mostra a **Figura 7**.

As amostras foram deixadas em agitação na temperatura ambiente e mantidas em geladeira *overnight* (sem agitação), à 4°C. Após o último dia dos protocolos, as amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% ou glutaraldeído a 2,5% e alguns fragmentos congelados a -80°C para análise de proteômica.

Figura 6 - Métodos de imersão e perfusão das soluções de decelularização para as placentas caninas



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

Legenda: Método de decelularização por imersão (**1A**) e por perfusão (**1B**). Durante o dia os fragmentos permaneceram em temperatura ambiente com constante agitação (**1A**), após o que, eles foram mantidos em estática *overnight* à 4°C (**2A**). Em **1B**, **2B** a porção fetal da placenta canina encontra-se canulada para perfusão utilizando-se bomba de infusão. **Coluna C** mostra o aparato utilizado para a perfusão das soluções.

Quadro 1 - Descrição dos dez protocolos testes de decelularização e suas variáveis usadas, com respectiva duração, número de placentas processadas e idade gestacional dos fetos

PROTOCOLO	VARIÁVEIS				PORÇÃO FETAL	PORÇÃO MATERNA	CROW RUMP
	Método	Temperatura	Reagentes	Duração			
1	Imersão	4 °C	SDS 1% <u>ou</u> SDS + 10mM TRIS	2 dias	8	8	40 dias
			Triton X-100 1%	2 dias			
		4 °C	SDS 1% <u>ou</u> SDS + 10mM TRIS	3 dias	8	8	
			Triton X-100 1%	2 dias			
2	Imersão	-20°C ou - 80°C	SDS + 10mM TRIS	10 dias	20	4	47 dias
			Triton X-100 1%	2 dias			
3	Imersão	-20°C ou - 80°C	SDS + 10mM TRIS	10 dias	6	1	50 dias
			Triton X-100 1%	2 dias			
4	Perfusão	-20°C ou - 80°C	SDS + 10mM TRIS	10 dias	2 (inteiras)	---	
			Triton X-100 1%	2 dias			
5	Imersão	Temperatura Ambiente	SDS + 10mM TRIS	9 dias	6	4	53 dias
			Triton X-100 1%	2 dias			
6	Perfusão	Temperatura Ambiente	SDS + 10mM TRIS	8 dias	1 (inteira)	---	
			Triton X-100 1%	2 dias			
7	Imersão	Temperatura Ambiente	SDS + 10mM TRIS	3 dias	12	7	43 dias
			Triton X-100 1%	2 dias			
8	Perfusão	Temperatura Ambiente	SDS + 10mM TRIS	8 dias	1 (inteira)	---	
9	Imersão	Temperatura Ambiente	SDS 1%	4 dias	4	4	
			5mM EDTA + 0,5% de ATB <u>ou</u> 50 mM TRIS + 5 mM EDTA + 0,5% ATB	2 dias			
			DNase-I	5 horas			
			Álcool 70%	1h30min			
10	Imersão	Temperatura Ambiente	SDS 1%	4 dias	6	6	56 dias
			5mM EDTA + 0,05% de Tripsina + 0,5% de ATB <u>ou</u> 50 mM TRIS + 5 mM EDTA + 0,5% ATB	2 dias			
			Álcool 70%	1h30min			

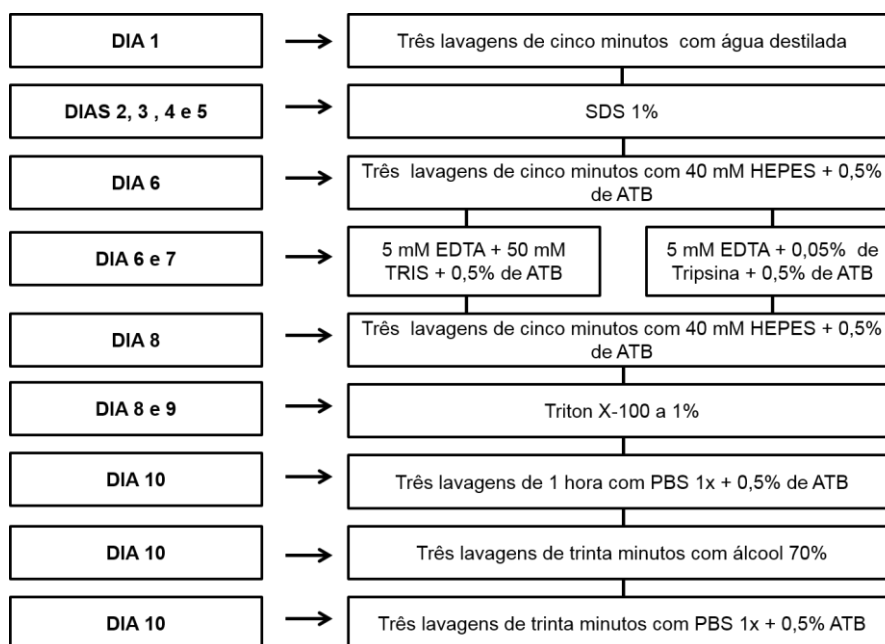
Legenda: SDS – Dodecil sulfato de sódio, mM – Milimolar, EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético, ATB – Antibiótico (Penicilina-Estreptomicina), h – hora, min – minutos.

Quadro 2 - Descrição dos dois protocolos de decelularização selecionados e elaborados após as análises dos dez protocolos descritos no **Quadro 1**, com o número de placentas processadas e a idade gestacional dos fetos estão indicados

DESCRIÇÃO DOS PROTOCOLOS	PORÇÃO FETAL	PORÇÃO MATERNA	CROW RUMP
• SDS 1% por 4 dias	4	3	54
• 5mM EDTA + 50mM TRIS + 0,5% ATB (Protocolo I) <u>ou</u> 5mM EDTA + 0,05% Tripsina + 0,5% ATB (Protocolo II) por 48 horas	4	2	55
• Triton X-100 1% por 2 dias	4	4	54
• Álcool 70% por 1h30min	4	4	51

Legenda: **SDS** – Dodecil sulfato de sódio; **EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético; **ATB** – Antibiótico (Penicilina-Estreptomicina), **h** – hora, **min** – minutos.

Figura 7 - Descrição esquemática dos 10 dias dos protocolos I e II de decelularização descritos no **Quadro 2**



Legenda: **SDS** – Dodecil sulfato de sódio; **mM** – Milimolar; **ATB** – Antibiótico (Penicilina-Estreptomicina); **EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético); **PBS** – Tampão fosfato salino.

4.2.3 Análises Histológicas

As amostras controle (não decelularizadas) e experimentais (decelularizadas), tanto da porção materna quanto fetal das placentas foram fixadas em PFA 4% ou glutaraldeído 2,5% por 72 horas e submetidas ao protocolo de desidratação, diafanização e inclusão em parafina (**Apêndice A**). Cortes de 5 micrômetros de espessura foram feitos e corados com Hematoxilina-Eosina (**Apêndice B**) para a avaliação da decelularização e visualização de possíveis núcleos remanescentes; a conservação e organização das fibras colágenas foi avaliada, utilizando-se colorações de Tricrômio de Masson (**Apêndice C**) e Picrosirius com luz polarizada (**Apêndice D**).

A análise das lâminas histológicas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômio de Masson foi realizada em 'Microscópio de Luz Nikon 80i', enquanto que as lâminas coradas com Picrosirius foram analisadas em luz polarizada em 'Microscópio Carl Zeiss com câmera (Zeiss West Germany 47 30 23 9900 / 47 30 12 9902)'.

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura foram usados fragmentos do grupo controle e do grupo decelularizado. Após a fixação em paraformaldeído 4% por no mínimo 72 horas, as amostras foram fragmentadas com gilete e lavadas em ultrassom por 24 minutos em água destilada (duas lavagens de dois minutos e quatro lavagens de cinco minutos), sendo feita troca da água a cada 5 minutos. Após a lavagem as amostras foram colocadas em álcool 70% *overnight*. No dia seguinte, seguiu-se com a desidratação utilizando-se concentrações crescentes de álcool. Foram realizadas duas imersões em álcool 80%, seguidas de imersões em álcool 90% por 5 minutos (com troca do álcool entre cada imersão) e três lavagens com álcool 100% por 10 minutos (cada imersão compreendendo duas trocas de solução) (**Apêndice E**).

Após o processo de desidratação das amostras foi realizado o ponto crítico no 'Aparelho CPD020 Balzers Union', metalização com ouro utilizando-se equipamento 'Emitec 14550' e análise no 'Microscópio Eletrônico de Varredura Leo 435 VP'.

4.2.5 Análise de Pico-Green® (Protocolo I e II)

A quantificação do DNA remanescente foi realizada com as amostras decelularizadas pelos protocolos descritos no **Quadro 2** usando o kit *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent* (Life Technologies – Waltham, Massachusetts, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Esse teste detecta fitas duplas de DNA (dsDNA) – diminuindo a interferência de possíveis remanescentes de RNA e de fitas simples de DNA (ssDNA) presentes nas amostras –, em fragmentos de até 25 pg/mL, através da ligação de fluoróforo nas dsDNA. A análise da fluorescência foi feita com leitura em espectrofotômetro utilizando-se comprimento de onda de 480nm de excitação e 520nm de emissão. A solução de PicoGreen® foi preparada usando o tampão TE 1x. Para a construção da curva padrão (controle) e sua relação com a fluorescência, utilizou-se cinco concentrações conhecidas de *Lambda DNA* (1µg/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml e blank – sem DNA), também diluído em tampão TE 1x.

Após o último dia do protocolo de decelularização, as amostras dos Protocolos I e II foram mantidas em PBS 1x + 0,5% de ATB na geladeira à 4°C até a realização do experimento. Amostras apresentando 3mm de comprimento x 3mm de largura foram então fragmentadas e colocadas em placas de 96 wells, contendo 100 microlitros de solução de PicoGreen®. Essa incubação foi feita por período de 18 horas, sendo que as amostras foram mantidas em estufa à 37°C. As placas foram envolvidas em papel alumínio para proteção contra a luz. Após esse período, a solução de PicoGreen® de cada poço foi pipetada, transferida para placas negras – Black Plate 96 wells (Falcon® - Cary, Carolina do Norte, USA) – e analisada com o programa SoftMax Pro6 (SpectraMax®Paradigm® - Sunnyvale, California, USA).

4.2.6 Análise Proteômica

Após o último dia de protocolo, pequenos fragmentos das amostras decelularizadas foram congelados em freezer -80°C , para envio ao Centro de Química e Proteínas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto. O estudo de proteômica foi feito pela técnica de *bottom-up*. As amostras foram submetidas à digestão enzimática com tripsina, os peptídeos foram ionizados em instrumento ESI-QUAD-TOF, os espectros MS/MS foram analisados e as proteínas foram identificadas utilizando os programas SwissPro e MASCOT. As modificações pós-traducionais correspondentes à metilação e oxidação foram consideradas na busca.

4.2.7 Imunofluorescência

A verificação da presença de proteínas da matriz extracelular placentária, antes e após a decelularização, foi feita pela técnica de imunofluorescência utilizando-se os anticorpos anti-laminina, anti-fibronectina, anti-colágeno tipo I e anti-colágeno tipo III (**Quadro 3**). Fragmentos de placentas do grupo controle e decelularizados pelo Protocolo I e II foram embebidos em '*Optimal Cutting Temperature (O.C.T.)*', congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer à -150°C . Cortes de 8 micrômetros de espessura foram realizados em 'Criostato Leica CM1850' e mantidos em temperatura ambiente por 1 hora, para secagem. A fixação foi realizada com acetona fria (previamente mantida *overnight* à 4°C) por 10 minutos dentro da geladeira. As lâminas foram então mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos para secagem e posteriormente foram incubadas com solução de TBS + BSA 2% por 1 hora, para bloqueio de ligações inespecíficas. A incubação dos cortes com o anticorpo primário foi feita *overnight* à 4°C em câmara umedecida e protegida da luz.

No segundo dia, os cortes foram lavados três vezes, por cinco minutos cada lavagem, com TBS + BSA 0,2%, em temperatura ambiente e incubados com o anticorpo secundário por uma hora. Seguiu-se com nova lavagem em solução de TBS + BSA 0,2% (3x por cinco minutos) e incubação com DAPI (1:10.000) por 10 minutos em temperatura ambiente. Três outras lavagens de cinco minutos com TBS 1x foram

realizadas, sendo que em todas as etapas as lâminas permaneceram dentro de câmara escura e úmida (**Apêndice F**). A montagem das lâminas foi feita com glicerol diluído em PBS 1x (1:1), seladas com esmalte e deixadas para secar *overnight* em temperatura ambiente protegidas da luz. A leitura foi feita em 'Microscópio Confocal FV1000 Olympus IX81' em objetiva de 400x de cinco campos microscópicos diferentes.

Quadro 3 - Listagem dos anticorpos usados para caracterização da matriz extracelular das placentas decelularizadas com os Protocolos I e II

Identificação do Anticorpo	Imunoglobulina / Hospedeiro	Empresa	Nº de catálogo	Diluição
Anticorpo Primário				
Anti-Laminina	IgG / Rabbit	ABCAM	ab11575	1:200
Anti-Fibronectina	IgG / Rabbit	ABCAM	ab2413	1:200
Pro-COL3A1 (N-18)	IgG / Goat	Santa Cruz	sc8779	1:200
COL1A1 (D-13)	IgG / Goat	Santa Cruz	sc25974	1:200
Anticorpo Secundário				
Alexa Fluor® 488 goat anti-Rabbit		Life Technologies	A11008	1:300
Alexa Fluor® 488 rabbit anti-Goat		Life Technologies	A11078	1:300

4.2.8 Análise Estatística

Os dados encontrados no ensaio de quantificação de DNA pelo kit *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent* (Life Technologies – Waltham, Massachusetts, USA) foram analisados calculando seu desvio padrão e 'Correlação de Pearson' (divisão da covariância das variáveis pelos seus respectivos desvios padrão). Para tanto, calculou-se a regressão linear (com base na fluorescência) encontrando a equação que permitisse o cálculo da concentração de DNA em cada amostra. Seguida de cálculo da média e desvio padrão, fez-se o estudo de correlação cruzada entre os valores das amostras dos seguintes grupos: 1) porção fetal (protocolo I) vs. porção fetal (protocolo II), 2) porção materna (protocolo I) vs. porção materna (protocolo II); 3) porção materna (protocolo I) vs. porção fetal (protocolo I), 4) porção materna (protocolo II) vs. porção fetal (protocolo II), 5) porção materna (protocolo I) vs. porção fetal (protocolo II) e 6) porção materna (protocolo II) vs. porção fetal (protocolo I); analisando existência de correlação estatística (ou não) entre os grupos.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Análise das variáveis presentes nos dez protocolos iniciais de decelularização (Quadro 1)

4.3.1.1 Imersão vs. Perfusão

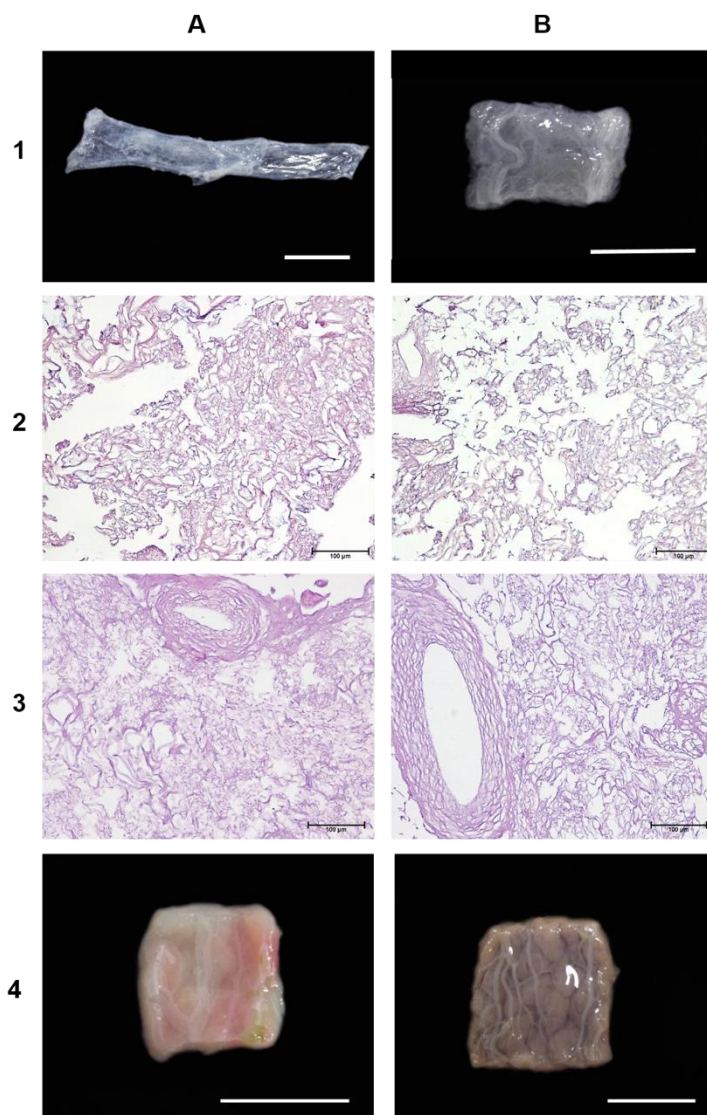
A perfusão das placentas somente foi realizada nas suas porções fetais, devido ao acesso dos vasos sanguíneos que foram canulados.

As porções fetais decelularizadas por perfusão não apresentaram diferenças macroscópicas (**Figura 8 – 1A**) ou microscópicas (**Figura 8 – 2A**) quando comparadas com as decelularizadas pelo método de imersão (**Figura 8 – 1B e 2B**). Ambos métodos produziram amostras com aspecto gelatinoso e translúcido ao final dos protocolos e promoveram a remoção da maior parte do conteúdo celular. Semelhança também foi observada quanto ao tempo requerido para que as amostras das placentas adquirissem as características macroscópicas citadas acima. Ao contrário do esperado, o protocolo de perfusão utilizado neste estudo não reduziu o tempo do processo de decelularização.

Entretanto, a abundante lavagem dos tecidos previamente ao início do processo de decelularização mostrou-se de grande importância e fator determinante no resultado final.

O fato de algumas placentas não terem sido previamente perfundidas com água para remoção do sangue de dentro dos vasos assim como do estroma (**Figura 8 – 4A e 4B, Figura 9 – 1A e 1B**), contribuiu para a manutenção de coágulos sanguíneos, o que atribuiu coloração marrom-avermelhado às amostras e comprometeu a ação dos detergentes quando usado o método de imersão.

Figura 8 - Avaliação macro e microscópica da porção fetal das placentas decelularizadas pelos métodos de imersão e perfusão e previamente congeladas à -20°C e -80°C



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

Legenda: Aspecto macroscópico da porção fetal submetida à decelularização utilizando-se perfusão (1A e 2A, 3A e 3B) e imersão (1B e 2B) ambas apresentam-se com aspecto gelatinoso e translúcido. Quanto a remoção celular, nenhuma diferença foi encontrada entre os dois métodos, sendo que remanescentes celulares não foram identificados pela coloração de HE. Diferenças também não foram encontradas na remoção celular das placentas congeladas à -20°C (2A e 3A) e a -80°C (2B e 3B); em 4A porção fetal da placenta após ter sido lavada com perfusão de água pelos vasos sanguíneos (lavagem realizada a partir do protocolo nº 9) mostrando a diferença na sua coloração comparada com 4B, que não foi previamente lavada. Barra = 1cm.

4.3.1.2 Diferentes gradientes de temperatura

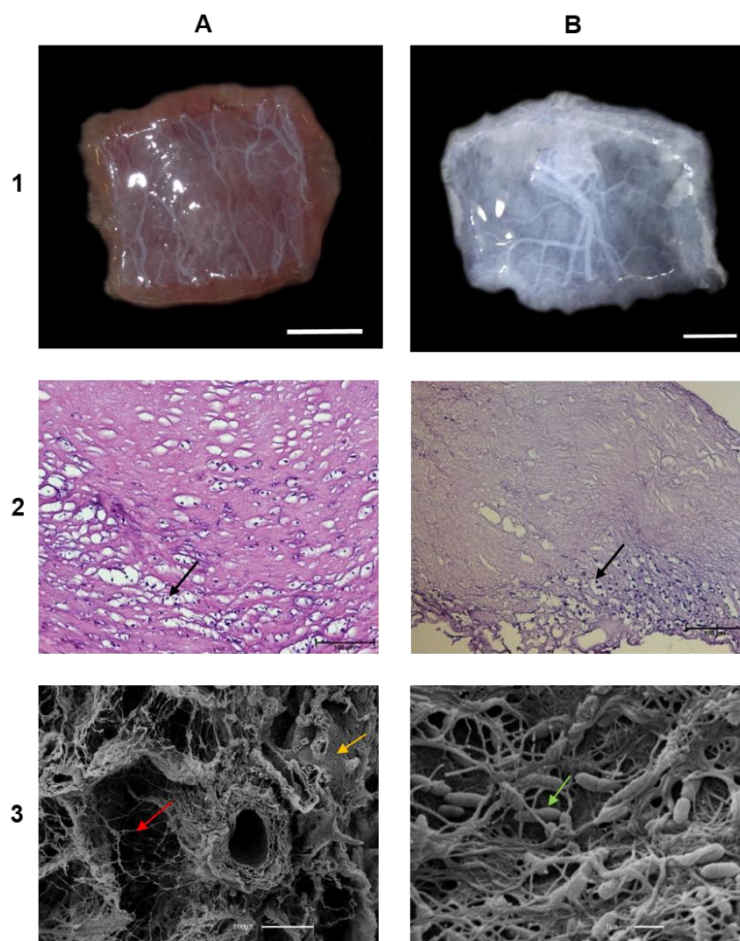
O congelamento prévio das placentas em duas temperaturas (-20°C e -80°C) foi testado e comparado à manutenção em geladeira à 4°C. As amostras congeladas não foram previamente lavadas para a remoção dos coágulos sanguíneos, o que prejudicou o processo de decelularização. As amostras tiveram que permanecer por maior tempo nas soluções de detergentes; o que pode ter contribuído para uma maior desorganização da matriz, observada nas análises histológicas, por outro lado houve remoção celular eficaz.

4.3.1.3 Tempo de incubação, tipo e concentração de detergentes

A escolha dos reagentes, suas respectivas concentrações e o tempo de incubação inicialmente utilizados foram selecionados a partir de protocolos já descritos na literatura, para decelularização de placentas.

Nas análises histológicas e por microscopia eletrônica de varredura observou-se presença de células em algumas amostras quando os detergentes SDS e Triton X-100 foram utilizados (**Figura 9 – 2A e 2B**) nos dez protocolos iniciais (**Figura 9 – 3A e 2B**). Conseqüentemente, visando otimizar a remoção das células, o quelante de cálcio EDTA, e agentes enzimáticos como a Tripsina e DNA-se foram associados. Fez-se também uso de antibióticos para prevenir contaminação das matrizes decelularizadas (**Figura 9 – 3B**).

Figura 9 - Aspecto macroscópico, histológico e tridimensional da MEC fetal e/ou materna submetidas à diferentes protocolos de decelularização



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

Legenda: **Linha 1** porções fetais após um dia em imersão em SDS 1% + 10mM TRIS, perfundida com água corrente antes do início do protocolo de decelularização (**1B**) e não perfundida (**1A**), mostrando a diferença na ação do detergente. **Linha 1:** barra = 1cm. **Linha 2:** aumento 20x, barra = 100 micrometros, coloração: HE. **2A** porção materna após 4 dias em SDS 1% mostrando a presença de núcleos celulares (seta preta), e **2B** porção materna decelularizada com SDS 1% por 4 dias seguido de imersão em 5mM EDTA + 50mM TRIS por 48 horas, também com núcleos celulares visíveis (seta preta). MEV das porções fetal (**3A**) e materna (**3B**) decelularizadas pelo protocolo nº 1 (Quadro 1) onde observa-se a arquitetura tridimensional das fibras (seta vermelha) e decelularização parcial das MECs (seta amarela), além de contaminação bacteriana (seta verde). **Linha 3:** barra = 300 micrometros (**3A**) e 1 micrometro (**3B**).

4.3.1.4 Identificação de proteínas da MEC após decelularização

A análise de proteômica foi realizada com placentas decelularizadas por dois protocolos descritos no **Quadro 1** (Protocolos nº 5 e nº 7). A técnica utilizada foi a de *bottom-up*, por digestão enzimática com tripsina, posterior ionização dos peptídeos gerados e analisados por MS/MS (espectrometria de massas) com identificação das proteínas em banco de dados SwissPro e MASCOT.

Apesar da incubação das MECs decelularizadas em tripsina por até uma semana, não foi possível a digestão enzimática de toda a matriz em nenhum dos grupos analisados; no entanto, algumas proteínas da MEC puderam ser identificadas, conforme descrito no **Quadro 4**. Foram identificadas 32 proteínas na porção materna (**Tabela 1**) e 34 proteínas na porção fetal decelularizadas pelo protocolo nº 5 (**Tabela 2**). Já na porção materna (**Tabela 3**) e fetal (**Tabela 4**) decelularizadas pelo protocolo nº 7, foram identificadas 34 e 53 proteínas respectivamente. De modo geral, as proteínas descritas no **Quadro 4** correspondem à proteínas estruturais da matriz (colágenos) e à proteínas de membrana basal (laminina). A maior parte das proteínas descritas relacionam-se ao citoesqueleto, perfazendo mais de 60% dos achados em todos os quatro grupos (**Gráfico 2**). Com base nessa avaliação proteica fez-se a escolha dos anticorpos usados na técnica de imunofluorescência para sua localização nas matrizes decelularizadas pelos Protocolos I e II.

Quadro 4 – Relação das proteínas de matriz extracelular encontradas nas análises de proteômica de amostras dos protocolos nº 5 e nº 7

Proteína Identificada	Codificação	Porção da Placenta	Protocolo
Cadeia $\alpha 2$ do colágeno I	CO1A2_CANFA	Porção Materna	nº 5
Cadeia $\alpha 2$ de Colágeno I	CO1A2_MAMAE	Porção Materna	nº 5
Laminina (subunidade $\gamma 1$)	LAMIC1_HUMAN	Porção fetal	nº 5
Cadeia $\alpha 3$ de Colágeno VI	CO6A3_HUMAN	Porção Fetal	nº 5
Cadeia $\alpha 2$ de colágeno I	CO1A2_CANFA	Porção Materna	nº 7
Cadeia $\alpha 3$ de Colágeno VI	CO6A3_HUMAN	Porção Materna	nº 7
Periostina	POSTN_HUMAN	Porção Fetal	nº 7
Periostina	POSTN_MOUSE	Porção Fetal	nº 7

Gráfico 2 - Distribuição das proteínas das placentas decelularizadas identificadas por proteômica.

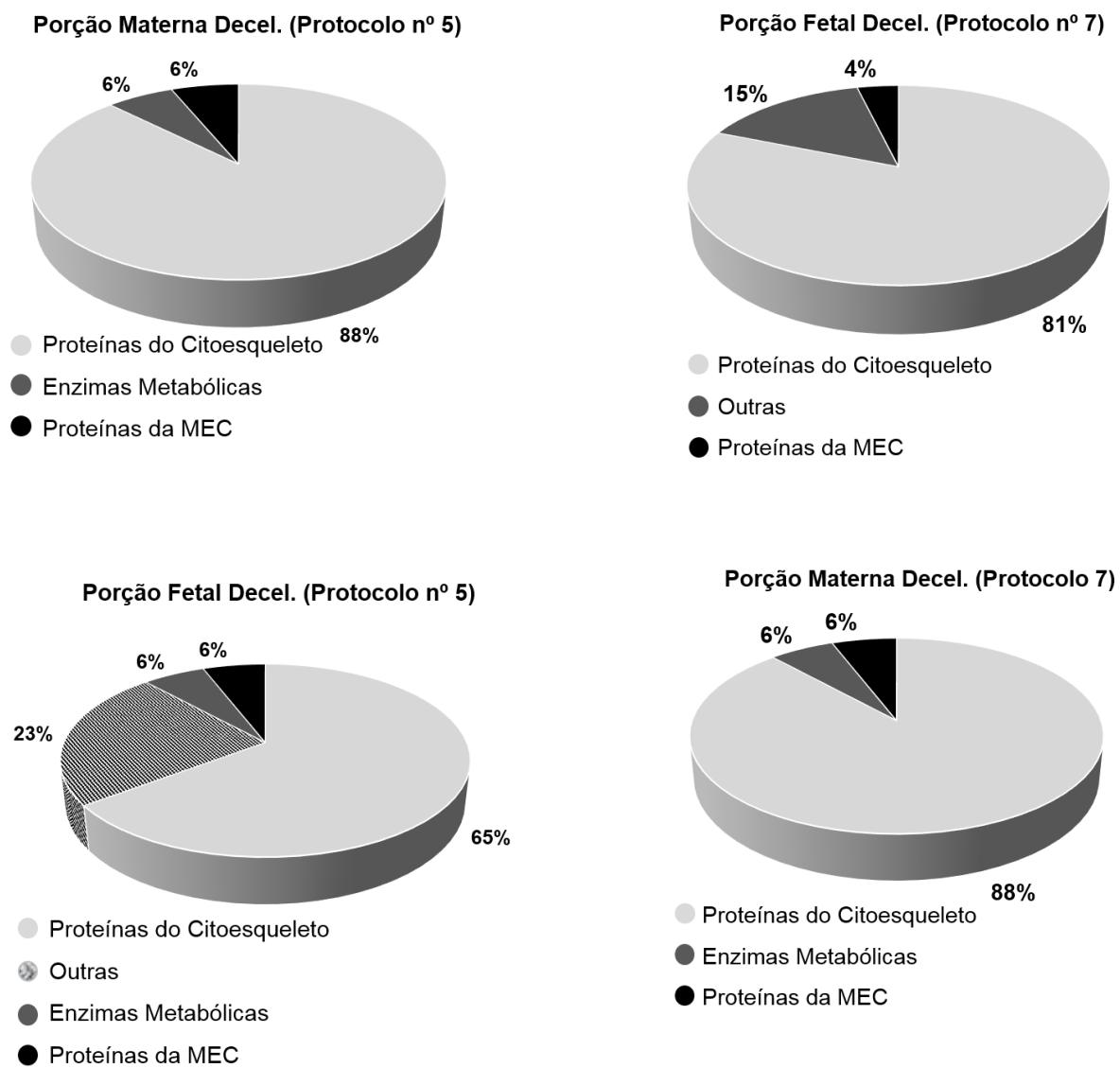


Tabela 1 - Lista das proteínas identificadas pela análise de proteômica da porção materna da placenta canina decelularizada pelo protocolo número 5 (imersão em SDS 1% + 10mM TRIS por 9 dias; imersão em Triton X-100 1% por 2 dias)

Identificação da Proteína	Codificação	Mascot Score	Peso molecular (Da)
Cadeia $\alpha 2$ do colágeno I	CO1A2_CANFA	87	129725
Anexina A1	ANXA1_CAVCU	80	38761
Anexina A1	ANXA1_CHICK	80	14435
Anexina A1	ANXA1_HUMAN	80	38874
Anexina A1	ANXA1_MOUSE	80	38940
Anexina A1	ANXA1_RABBIT	80	38941
Anexina A1	ANXA1_RAT	80	39081
Lisil endopeptidase	LYSC_PSEAB	79	48470
Lisil endopeptidase	LYSC_PSEAB	79	48505
Citoqueratina tipo II 5	K2C5_BOVIN	76	63036
Citoqueratina tipo II 5	K2C5_MOUSE	76	61913
Citoqueratina tipo II 5	K2C5_RAT	76	61926
Citoqueratina tipo II 6A	K2C6A_MOUSE	76	50575
Citoqueratina tipo II 6A	K2C6A_RAT	76	59489
Citoqueratina tipo II 6B	K2C6B_MOUSE	76	60561
Citoqueratina tipo II 75	K2C75_BOVIN	76	59321
Citoqueratina tipo II 75	K2C75_MOUSE	76	59888
Citoqueratina tipo II 1	K2C75_RAT	76	59175
Citoqueratina tipo II 1	K2C1_HUMAN	73	66137
Citoqueratina tipo II 7	K2C1_PANTR	73	65588
Citoqueratina tipo II 7	K2C7_BOVIN	73	51592
Citoqueratina tipo II 7	K2C7_HUMAN	73	51400
Citoqueratina tipo II 7	K2C7_PANTR	73	51428
Citoqueratina tipo II 8	K2C8_HUMAN	67	53671
Citoqueratina tipo II 8	K2C8_MESAU	67	12966
Citoqueratina tipo II 8	K2C8_MOUSE	67	54531
Citoqueratina tipo II 8	K2C8_POTTR	67	351149
Citoqueratina tipo II 8	K2C8_RAT	67	53985
Anexina A5	ANXA5_HUMAN	51	35960
Anexina A5	ANXA5_MACFA	51	35870
Anexina A5	ANXA5_PANTR	51	35960
Cadeia $\alpha 2$ de Colágeno I	CO1A2_MAMAE	51	93128

Tabela 2 - Lista das proteínas identificadas pela análise de proteômica da porção fetal da placenta canina decelularizada pelo protocolo número 5 (imersão em SDS 1% + 10mM TRIS por 9 dias; imersão em Triton X-100 1% por 2 dias)

Identificação da Proteína	Codificação	Mascot Score	Peso molecular (Da)
Cadeia α 3 de Colágeno VI	CO6A3_HUMAN	164	344836
Laminina (subunidade γ 1)	LAMIC1_HUMAN	154	182087
Lisil endopeptidase	LYSC_PSEAB	86	48470
Lisil endopeptidase	LYSC_PSEAE	86	48505
Transgelina 2	TAGL2_BOVIN	73	22550
Transgelina 2	TAGL2_HUMAN	73	22515
Transgelina 2	TAGL2_MOUSE	73	22519
Transgelina 2	TAGL2_RAT	73	22517
Anexina A1	ANXA1_CAVCU	65	38761
Anexina A1	ANXA1_CHICK	65	14435
Anexina A1	ANXA1_HUMAN	65	38874
Anexina A1	ANXA1_MOUSE	65	38940
Anexina A1	ANXA1_RABIT	65	38941
Anexina A1	ANXA1_RAT	65	39081
Actina α 1	ACTN1_CHICK	60	103510
Actina α 1	ACTN1_HUMAN	60	103453
Actina α 1	ACTN1_MACFA	60	103421
Actina α 1	ACTN1_MOUSE	60	103509
Actina α 1	ACTN1_RAT	60	103355
Actina α 4	ACTN4_BOVIN	60	105230
Actina α 4	ACTN4_CHICK	60	104602
Actina α 4	ACTN4_HUMAN	60	105156
Actina α 4	ACTN4_MOUSE	60	105279
Actina α 4	ACTN4_PONAB	60	105157
Actina α 4	ACTN4_RAT	60	105217
Actina α 1	ACTN1_BOVIN	58	103375
Ribonucleoproteína Nuclear Heterogênea F	HNRPF_BOVIN	50	45936
Ribonucleoproteína Nuclear Heterogênea F	HNRPF_HUMAN	50	45919
Ribonucleoproteína Nuclear Heterogênea F	HNRPF_MACFA	50	45965
Ribonucleoproteína Nuclear Heterogênea F	HNRPF_MOUSE	50	45977
Ribonucleoproteína Nuclear Heterogênea F	HNRPF_RAT	50	45977
Ribonucleoproteína Nuclear Heterogênea H	HNRPF_HUMAN	50	49428
Ribonucleoproteína Nuclear Heterogênea H	HNRPF_MOUSE	50	49398
Ribonucleoproteína Nuclear Heterogênea H	HNRPF_RAT	50	48397

Tabela 3 - Lista das proteínas identificadas pela análise de proteômica da porção materna da placenta canina decelularizada pelo protocolo número 7 (imersão em SDS 1% + 10mM TRIS por 3 dias; imersão em Triton X-100 1% por 2 dias)

Identificação da Proteína	Codificação	Mascot Score	Peso molecular (Da)
Cadeia α 3 de Colágeno VI	CO6A3_HUMAN	161	344836
Desmoplaquina	DESP_HUMAN	90	333546
Desmoplaquina	DESP_MOUSE	90	334683
Miosina-9	MYH9_CANFA	67	227340
Miosina-9	MYH9_HUMAN	67	227403
Miosina-9	MYH9_MOUSE	67	227197
Miosina-9	MYH9_CHICK	65	227237
Miosina-9	MYH9_RAT	67	227301
Anexina A1	ANXA1_CAVCU	67	38761
Anexina A1	ANXA1_CHICK	67	14435
Anexina A1	ANXA1_HUMAN	67	38874
Anexina A1	ANXA1_MOUSE	67	38940
Anexina A1	ANXA1_RABBIT	67	38941
Anexina A1	ANXA1_RAT	67	39081
Cadeia α 2 de colágeno I	CO1A2_CANFA	59	129735
Lisil endopeptidase	LYSC_PSEAB	56	48470
Lisil endopeptidase	LYSC_PSEAB	56	48505
Actina α 1	ACTN1_CHICK	56	103510
Actina α 1	ACTN1_HUMAN	56	103453
Actina α 1	ACTN1_MACFA	56	103421
Actina α 1	ACTN1_MOUSE	56	103509
Actina α 1	ACTN1_RAT	56	103355
Actina α 4	ACTN4_BOVIN	56	105230
Actina α 4	ACTN4_CHICK	56	104602
Actina α 4	ACTN4_HUMAN	56	105156
Actina α 4	ACTN4_MOUSE	56	105279
Actina α 4	ACTN4_PONAB	56	105157
Actina α 4	ACTN4_RAT	56	105217
Actina α 1	ACTN1_BOVIN	53	103375
Integrina β 1	ITB1_BOVIN	44	90703
Integrina β 1	ITB1_CAMBA	44	90720
Integrina β 1	ITB1_FELCA	44	90702
Integrina β 1	ITB1_PIG	44	90829
Integrina β 1	ITB1_SHEEP	44	90719

Tabela 4 - Lista das proteínas identificadas pela análise de proteômica da porção fetal da placenta canina decelularizada pelo protocolo número 7 (imersão em SDS 1% + 10mM TRIS por 3 dias; imersão em Triton X-100 1% por 2 dias)

(Continua)

Identificação da Proteína	Codificação	Mascot Score	Peso molecular (Da)
Periostina	POSTN_HUMAN	96	93761
Periostina	POSTN_MOUSE	77	93637
Cadeia de α -tubulina	TBA_PICAB	76	12703
Cadeia de α -tubulina	TBA_PRUDU	76	50047
Cadeia de α -tubulina	TBA_TORMA	76	50687
Cadeia de α -tubulina	TBA_WHEAT	76	50263
Cadeia de α -tubulina	TBA_XENLA	76	50399
Cadeia de α -tubulina	TBA_XENTR	76	50524
Cadeia de α -tubulina 1A	TBA1A_GRIGR	76	50655
Cadeia de α -tubulina 1A	TBA1A_HUMAN	76	50655
Cadeia de α -tubulina 1A	TBA1A_MOUSE	76	50655
Cadeia de α -tubulina 1A	TBA1A_PANTR	76	50655
Cadeia de α -tubulina 1A	TBA1A_PIG	76	50588
Cadeia de α -tubulina 1A	TBA1A_RAT	76	50655
Cadeia de α -tubulina 1B	TBA1B_BOVIN	76	50671
Cadeia de α -tubulina 1B	TBA1B_GRIGR	76	50671
Cadeia de α -tubulina 1B	TBA1B_HUMAN	76	50671
Cadeia de α -tubulina 1B	TBA1B_MACFA	76	50671
Cadeia de α -tubulina 1B	TBA1B_MERUN	76	50671
Cadeia de α -tubulina 1B	TBA1B_MOUSE	76	50671
Cadeia de α -tubulina 1B	TBA1B_PANTR	76	50656
Cadeia de α -tubulina 1B	TBA1B_PIG	76	50671
Cadeia de α -tubulina 1B	TBA1B_RAT	76	50671
Cadeia de α -tubulina 1C	TBA1C_BOVIN	76	50377
Cadeia de α -tubulina 1C	TBA1C_GRIGR	76	50429
Cadeia de α -tubulina 1C	TBA1C_HUMAN	76	50415
Cadeia de α -tubulina 1C	TBA1C_MOUSE	76	505429
Cadeia de α -tubulina 1C	TBA1C_RAT	76	50457
Cadeia de α -tubulina 1D	TBA1D_BOVIN	76	50802
Cadeia de α -tubulina 1	TBA1_CHICK	76	46286
Cadeia de α -tubulina 1	TBA1_ELEIN	76	50251
Cadeia de α -tubulina 1	TBA1_MAIZE	76	50251
Cadeia de α -tubulina 1	TBA1_PEA	76	50173
Cadeia de α -tubulina 2	TBA2_ARATH	76	50061
Cadeia de α -tubulina 2	TBA2_GOSHI	76	50061
Cadeia de α -tubulina 2	TBA2_HORVU	76	50221
Cadeia de α -tubulina 2	TBA2_MAIZE	76	50251
Cadeia de α -tubulina 2	TBA2_ORYSJ	76	50257
Cadeia de α -tubulina 3	TBA3_ARATH	76	50128
Cadeia de α -tubulina 3	TBA3_HORVU	76	50249
Cadeia de α -tubulina 4	TBA4_ARATH	76	50061
Cadeia de α -tubulina 4	TBA4_GOSHI	76	50091
Cadeia de α -tubulina 5	TBA5_ARATH	76	50128

				(Conclusão)
Identificação da Proteína		Codificação	Mascot Score	Peso molecular (Da)
Cadeia de α -tubulina 6		TBA6_ARATH	76	50058
Cadeia de α -tubulina		TBA_ENTDO	76	50058
Ribonucleoproteína	Nuclear	HNRPF_BOVIN	46	45936
Heterogênea F				
Ribonucleoproteína	Nuclear	HNRPF_HUMAN	46	45919
Heterogênea F				
Ribonucleoproteína	Nuclear	HNRPF_MACFA	46	45965
Heterogênea F				
Ribonucleoproteína	Nuclear	HNRPF_MOUSE	46	45977
Heterogênea F				
Ribonucleoproteína	Nuclear	HNRPF_RAT	46	45977
Heterogênea H				
Ribonucleoproteína	Nuclear	HNRPF_HUMAN	46	49428
Heterogênea H				
Ribonucleoproteína	Nuclear	HNRPF_MOUSE	46	49398
Heterogênea H				
Ribonucleoproteína	Nuclear	HNRPF_RAT	46	49387
Heterogênea H				

4.3.2 Análises dos Protocolos I e II de decelularização

O aspecto macroscópico (transparência) e redução da quantidade de núcleos celulares visíveis em colorações histológicas foram os dois parâmetros iniciais para a seleção de protocolos mais favoráveis à decelularização de placentas. Assim, dentre os dez protocolos descritos no **Quadro 1**, dois (I e II) foram selecionados. À esses, associaram-se métodos químicos e enzimáticos, e outras análises foram levadas à cabo. Avaliações por histologia, microscopia eletrônica de varredura (MEV), quantificação de DNA remanescente nas MECs e identificação de proteínas presentes nas matrizes decelularizadas foram levadas à cabo.

4.3.2.1 Análise macroscópica

O fato das porções fetais da placenta canina terem sido canuladas e perfundidas manualmente com água corrente, contribuiu de forma significativa para a remoção do sangue e pode ter colaborado para a ação das demais soluções usadas para decelularização. Logo após serem perfundidas com água, as placentas apresentaram-se livres de sangue, tendo adquirido coloração mais clara (rosa claro) em contraposição ao aspecto marrom-avermelhado observado na coleta (**Figura 8 – 4B**) e nas amostras que não foram lavadas previamente, quando iniciado o protocolo de decelularização, três lavagens em água foram suficientes para remover a sujidade inicial de cada amostra previamente limpa, tanto da porção fetal quanto da materna (**Figura 10 – 1A e 2B**).

Inicialmente, três trocas diárias de solução de SDS 1% foram necessárias, posteriormente, duas trocas mostraram-se suficientes. A porção fetal, logo no primeiro dia de incubação de SDS 1%, já apresentou coloração translúcida nas extremidades, sendo que, ao final do quinto dia de protocolo (quarto dia de incubação com o detergente) a amostra já estava totalmente translúcida e com aspecto gelatinoso. A organização e estrutura dos vasos sanguíneos, observadas macroscopicamente, foram mantidas. Houve entretanto, diminuição do tamanho, em largura e espessura, das amostras. Já a porção materna, logo após quatro dias da ação do SDS 1% passou de uma coloração amarelada para uma totalmente branca (porém não translúcida como a observada na porção fetal).

As amostras submetidas à imersão com a associação de 5mM EDTA + 0,05% de Tripsina + 0,5% de antibiótico (Protocolo II), logo após 24 horas de incubação, apresentaram estrutura muito mais frágil, sendo facilmente fragmentadas (principalmente a porção fetal), quando comparadas àquelas que foram incubadas com 5mM EDTA + 50mM TRIS + 0,5% de antibiótico (Protocolo I). Além disso, durante as duas últimas trocas da solução do Protocolo II, observou-se a destruição da MEC remanescente das amostras em ambas as porções da placenta.

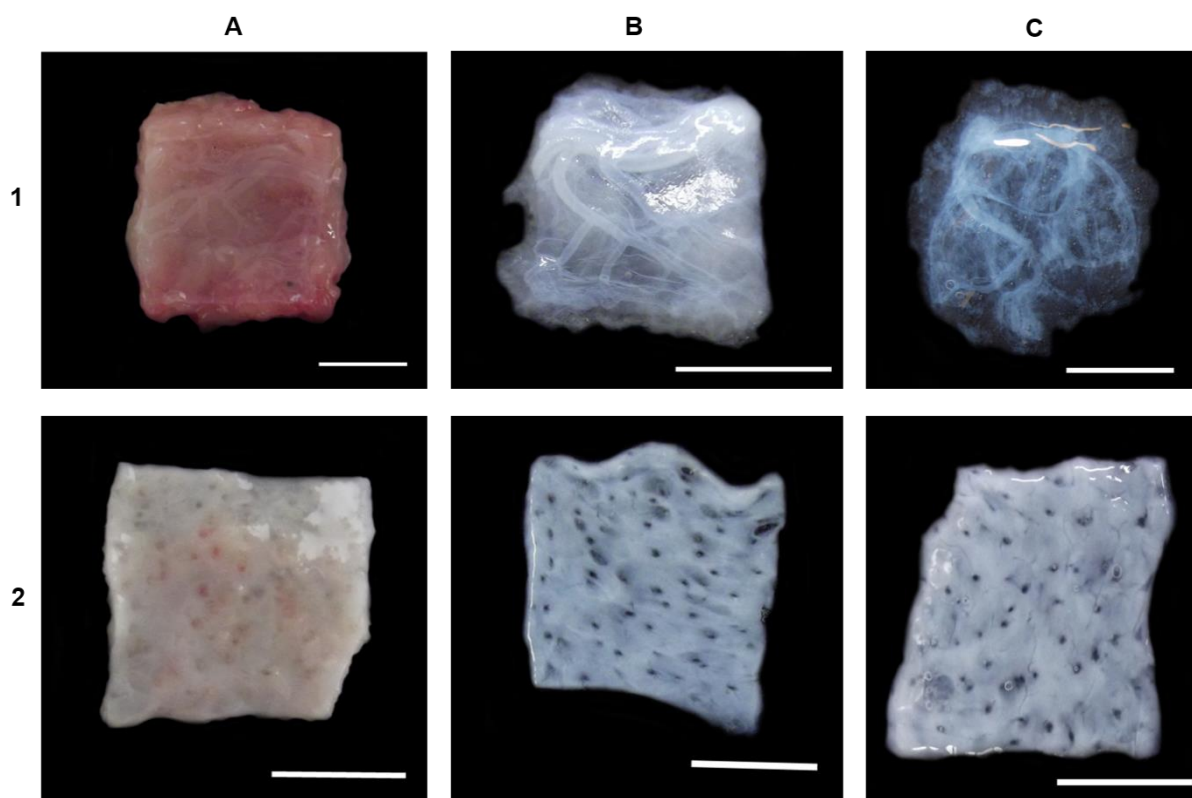
Com as 48 horas completas de incubação e posterior lavagem com solução tampão, as amostras foram incubadas com Triton X-100 1% por mais dois dias e nenhuma alteração macroscópica significativa foi observada. Esse detergente

(comparado às demais soluções usadas até então nos protocolos) foi o que menos danificou macroscopicamente a estrutura arquitetônica da MEC.

O restante do protocolo também não causou alterações estruturais macroscópicas nas porções placentárias. Entretanto, ao final do décimo dia, observou-se que as amostras submetidas ao Protocolo I (**Figura 10 – Coluna B**) tornaram-se totalmente translúcidas, gelatinosas e diminuídas em suas dimensões (espessura, largura e comprimento).

As amostras do Protocolo II (**Figura 10 – Coluna C**), por sua vez, apresentaram grande desorganização de sua MEC ao longo das etapas de decelularização (principalmente quando incubadas com 5mM EDTA + 0,05% de Tripsina + 0,5% de antibiótico). No final do décimo dia haviam perdido o formato retangular e a organização nítida dos vasos sanguíneos. As porções fetal e materna tornaram-se muito mais frágeis e friáveis, comparadas àquelas processadas de acordo com o Protocolo I, sendo que a porção mais afetada e danificada foi a fetal, que adquiriu um aspecto quase liquefeito.

Figura 10 - Análise macroscópica das placentas do grupo controle e decelularizadas com os Protocolos I e II



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

Legenda: **Coluna A** grupo controle da porção fetal (**1A**) e da porção materna (**2A**) da placenta canina no primeiro dia do protocolo de decelularização (dia da coleta). **Coluna B** porção fetal (**1B**) e materna (**2B**) decelularizadas com o Protocolo I e **Coluna C** porção fetal (**1C**) e materna (**2C**) decelularizadas com o Protocolo II. A porção fetal decelularizada com o Protocolo I (**1B**) mostrou melhor conservação da estrutura retangular desde o início do processamento, em contrapartida ao Protocolo II (**1C**) que foi mais agressivo e danificou o arranjo estrutural macroscópico observado no dia da coleta. Na porção materna (**Linha 2**) não houve alterações significativas quanto à estrutura nas amostras do Protocolo I (**2B**) e o Protocolo II (**2C**). Barras = 1cm.

4.3.2.2 Análises histológicas

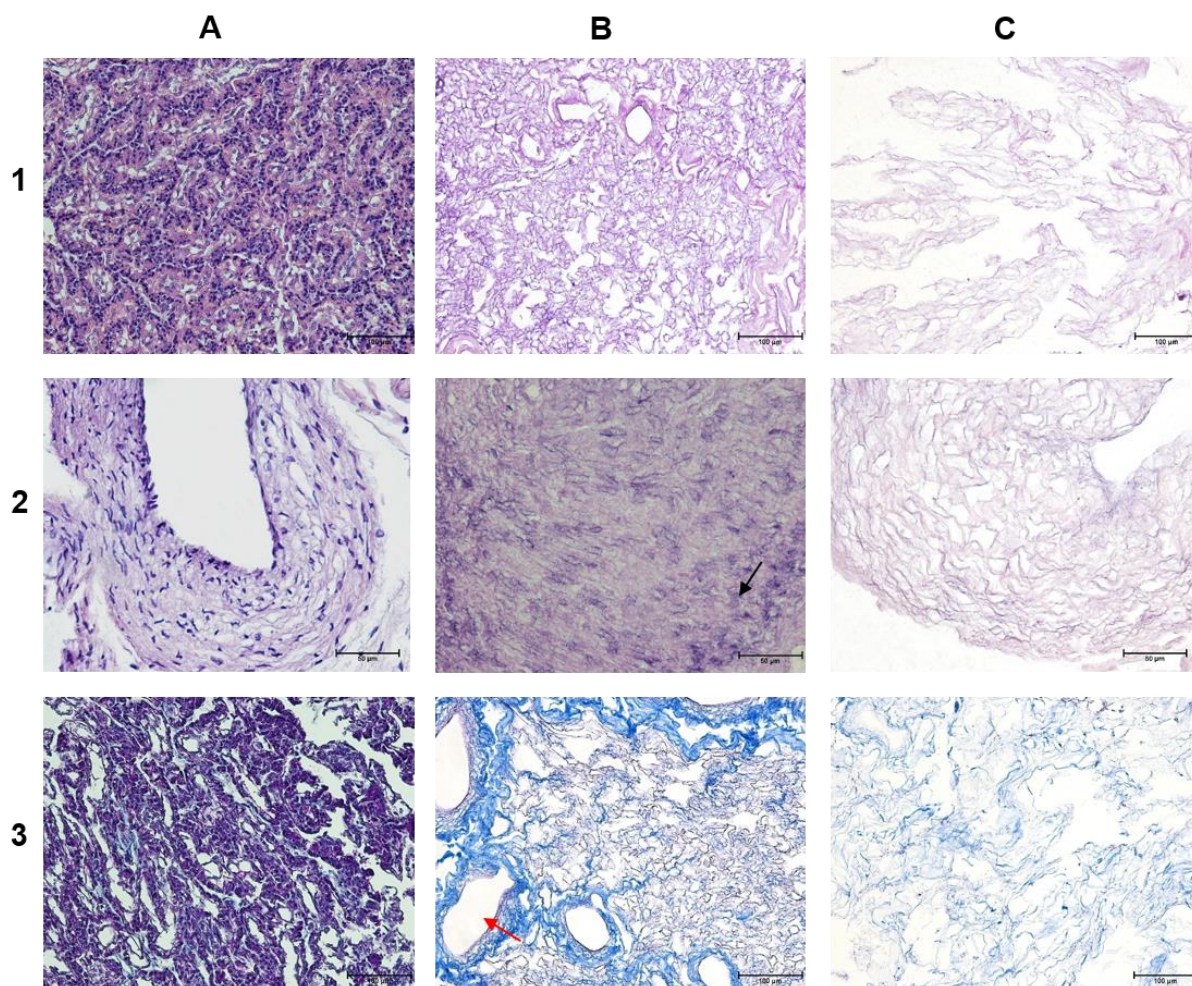
Durante as análises histológicas observaram-se diferenças principalmente referentes às porções fetais submetidas aos protocolos I (incubadas com 5mM EDTA + 50mM TRIS + 0,5% antibiótico) e II (incubadas com 5mM EDTA + 0,05% de Tripsina + 0,5% antibiótico). Ambos levaram à remoção considerável e quase total das células das porções placentárias; entretanto, diferenças na organização espacial dos componentes da MEC foram observadas.

Análises histológicas das porções fetais submetidas ao Protocolo I mostraram conservação da organização estrutural da MEC e remoção de grande parte do núcleo celular (**Figura 11 – 1B**) Porém nas regiões próximas aos vasos sanguíneos ainda foi possível observar a presença de núcleos celulares, mesmo que de modo desorganizado e em pouca quantidade (**Figura 11 – 2B**) Em contrapartida, o grupo submetido ao Protocolo II apresentou remoção total das células, porém com nítido desarranjo da MEC remanescente, assim como de toda a estrutura dos vasos sanguíneos (**Figura 11 – 1C, 2C**) As fibras colágenas das amostras do Protocolo I (**Figura 11 – 3B**) foram coradas com mais intensidade pelo Tricrômio de Masson do que aquelas do Protocolo II (**Figura 11 – 3C**), sugerindo melhor e maior conservação das mesmas.

A porção materna da placenta também apresentou núcleos celulares dispersos nas amostras submetidas ao Protocolo I (**Figura 12 – 2B**). Assim como aconteceu com a porção fetal, as amostras maternas submetidas ao Protocolo II (**Figura 12 – 1C, 2C**) tiveram sua estrutura mais desarranjada do que as decelularizadas pelo Protocolo I; porém, não apresentaram núcleos celulares visíveis. Macroscopicamente as alterações observadas na porção materna das placentas não foram tão significativas quanto as observadas na porção fetal. Pequenos vasos sanguíneos foram conservados em ambos protocolos (**Figura 12 – 3B, 3C**).

Na coloração de picrossirius (análise em luz polarizada), o colágeno fibrilar foi observado em todas as amostras (**Figura 13**).

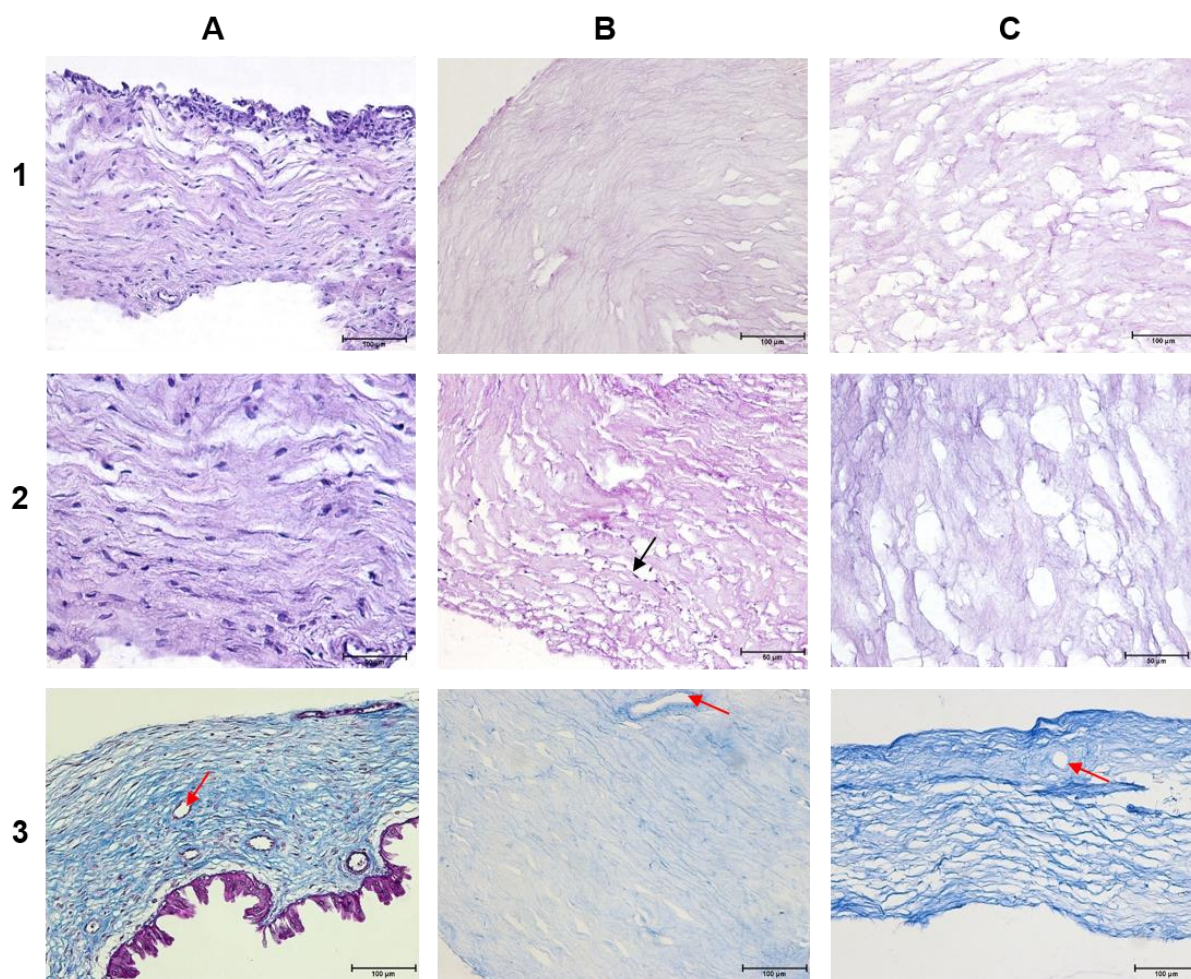
Figura 11 - Análise microscópica por colorações de Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Masson da porção fetal da placenta canina referente ao grupo controle e decelularizado com Protocolo I e Protocolo II



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

Legenda: Microscopia de luz do grupo controle (**Coluna A**); placenta decelularizada com o Protocolo I (incubação com 5mM EDTA + 50mM TRIS + 0,5% antibiótico por 48h) (**Coluna B**) e com Protocolo II (incubação com 5mM EDTA + 0,05% Tripsina + 0,5% antibiótico por 48h) (**Coluna C**). Ambos protocolos foram capazes de remover a maior parte do conteúdo celular das amostras. Em **1B** observa-se maior quantidade de matriz extracelular que se encontra estruturalmente mais organizada do que a observada em **1C**. Nas amostras decelularizadas com o Protocolo I ainda são observados núcleos, principalmente ao redor dos vasos sanguíneos (seta preta) (**2B**). Quando comparadas com o grupo controle o Protocolo II (**Coluna C**) foi mais agressivo causando desorganização da MEC. Em **3B** (Protocolo I) a MEC encontra-se orientada de modo mais organizada, sendo possível ainda observar a luz dos vasos sanguíneos (seta vermelha) e todo o arranjo arquitetônico do colágeno na parede vascular. **Linha 1:** aumento = 20x, barra = 100 micrometros, coloração: HE. **Linha 2:** aumento = 40x, barra = 50 micrometros, coloração: HE. **Linha 3:** aumento 20x, barra = 100 micrometros, coloração: Tricrômio de Masson.

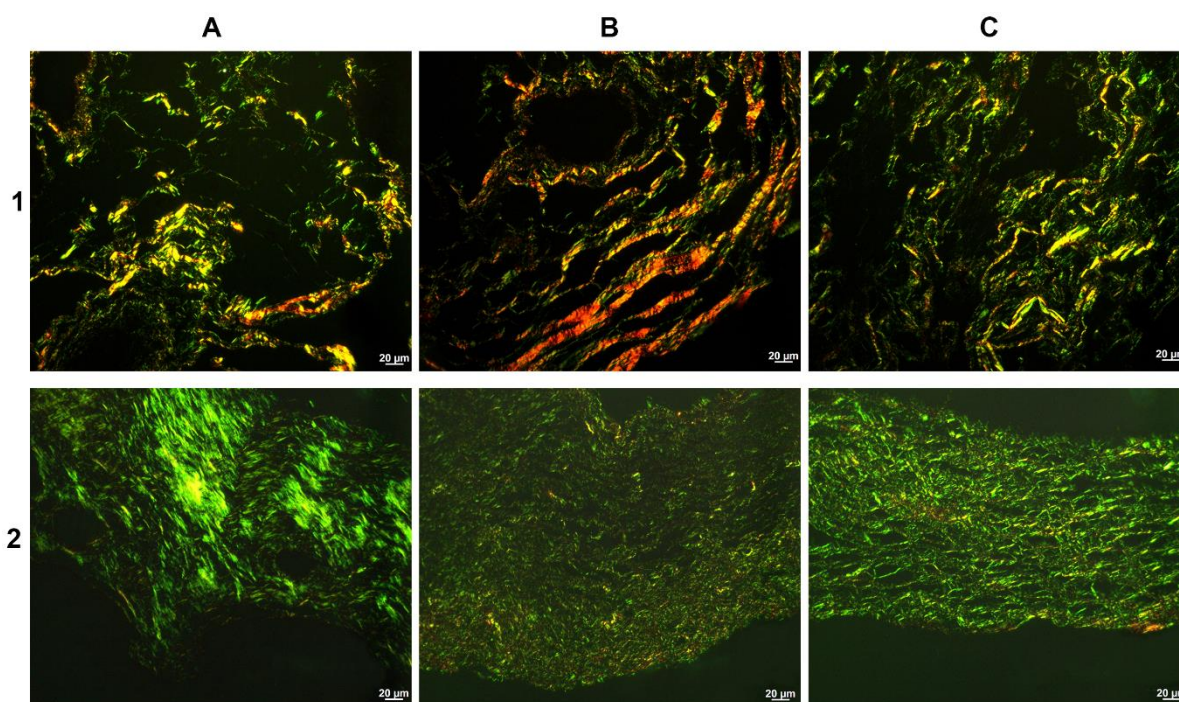
Figura 12 - Análise microscópica por colorações de Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Masson da porção materna da placenta canina referente ao grupo controle e decelularizado com o Protocolo I e Protocolo II



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

Legenda: Microscopia de luz grupo controle (**Coluna A**), decelularizada de acordo com o Protocolo I (incubação com 5mM EDTA + 50mM TRIS + 0,5% antibiótico por 48h) (**Coluna B**) e com o Protocolo II (incubação com 5mM EDTA + 0,05% Tripsina + 0,5% antibiótico por 48h) (**Coluna C**). A remoção de praticamente todo conteúdo nuclear foi evidenciada nos dois protocolos de decelularização, porém no Protocolo I (**2B**) foram observados mais núcleos celulares (seta preta) em comparação ao Protocolo II (**2C**). **Linhas 1 e 2** coloração de HE. A estrutura de vasos sanguíneos (seta vermelha) foi preservada em ambos os Protocolos I e II (**3B e 3C** respectivamente). **Linha 1:** aumento = 20x, barra = 100 micrometros, coloração: HE. **Linha 2:** aumento = 40x, barra = 50 micrometros, coloração: HE. **Linha 3:** aumento 20x, barra = 100 micrometros, coloração: Tricrômio de Masson.

Figura 13 - Análise do colágeno fibrilar das porções fetal e materna da placenta canina do grupo controle e decelularizadas pelos Protocolos I e II



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

Legenda: Microscopia com luz polarizada das porções fetal (**Linha 1**) e materna (**Linha 2**) de placentas dos grupos controle (**Coluna A**) e decelularizados pelos protocolos I (**Coluna B**) e II (**Coluna C**). Ambos protocolos e ambas porções mantiveram as redes fibrilares características de fibras colágenas. Coloração: Picosirius; Objetiva 16, aumento de 1,25.

4.3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

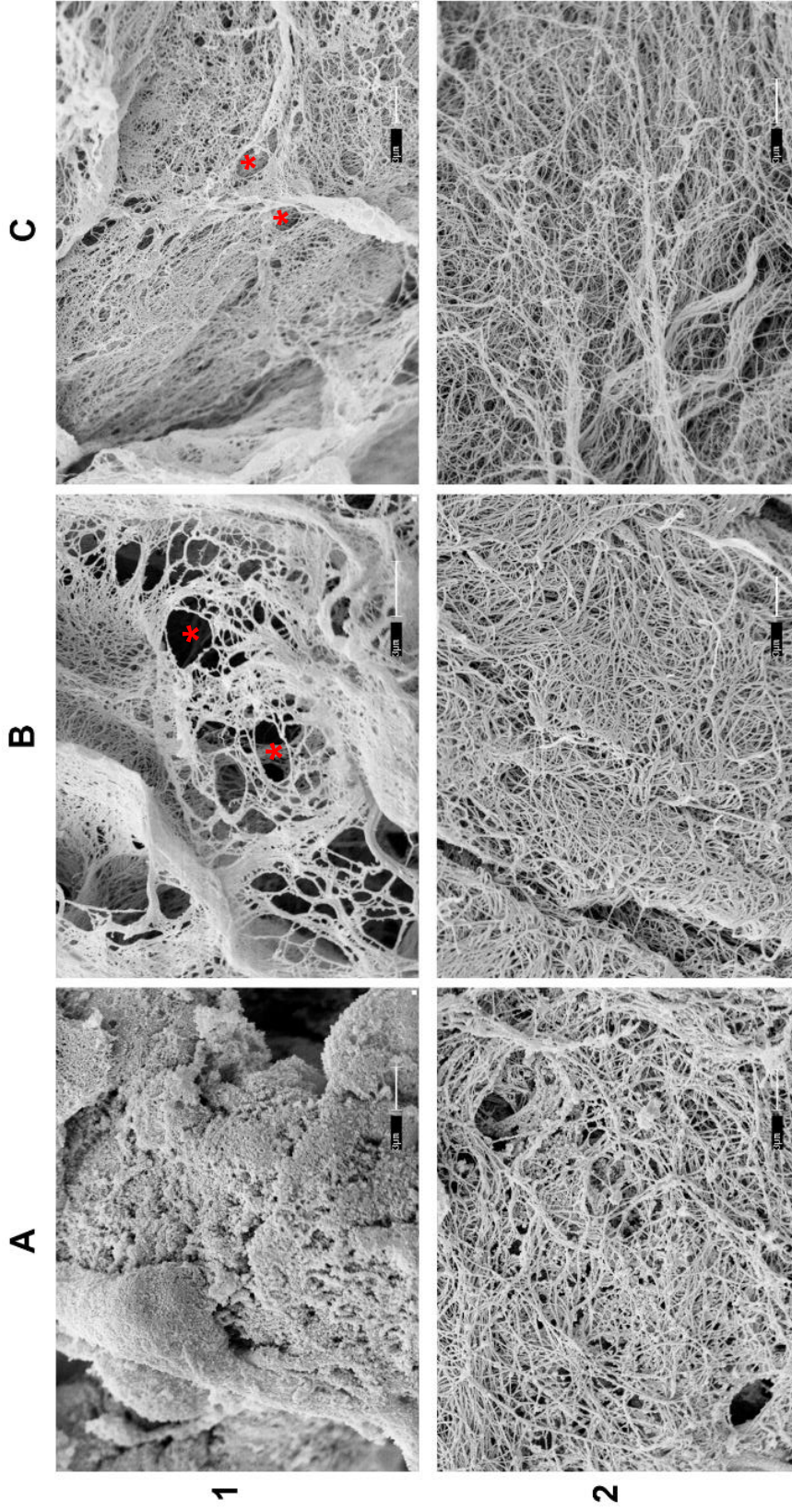
As análises por microscopia eletrônica de varredura mostraram que as MECs decelularizadas por ambos protocolos apresentaram estrutura arquitetônica tridimensional com poros. As amostras fetais do Protocolo I aparentemente apresentaram, entretanto, poros maiores entre os componentes fibrilares (**Figura 14 – 1B**) do que os encontrados nas amostras do Protocolo II (**Figura 14 – 1C**), muito embora a porosidade não tenha sido mensurada e quantificada. Na porção materna, a estrutura arquitetônica apresentou-se semelhante em ambos protocolos. Poros também foram encontrados e a organização fibrilar dos componentes das MECs decelularizada demonstrou ser mais compactada do que aquela encontrada na porção fetal (**Figura 14 – 2B e 2C**).

4.3.2.4 Análise de Pico-Green® dos Protocolos I e II

Para quantificar a concentração de DNA remanescente nas MECs após a decelularização das placentas caninas com ambos protocolos I (imersão com 5mM EDTA + 50mM TRIS + 0,5% de antibiótico) e II (imersão com 5mM EDTA + 0,05% de Tripsina + 0,5% de antibiótico), utilizou-se o Kit *Quant-iT™PicoGreen®dsDNAreagent* (Life Technologies – Waltham, Massachusetts, USA), seguindo-se instruções do fabricante.

Foram usados seis fragmentos de placentas de ambas as porções para análise da concentração de DNA remanescente em cada um dos dois protocolos. O **Gráfico 3** mostra uma tendência de maior remoção de DNA das amostras processadas pelo protocolo II, em ambas porções materna e fetal (concentração de 412 ng/ml e 387 ng/ml respectivamente), do que pelo protocolo I. Essa diferença não foi, entretanto, estatisticamente significativa.

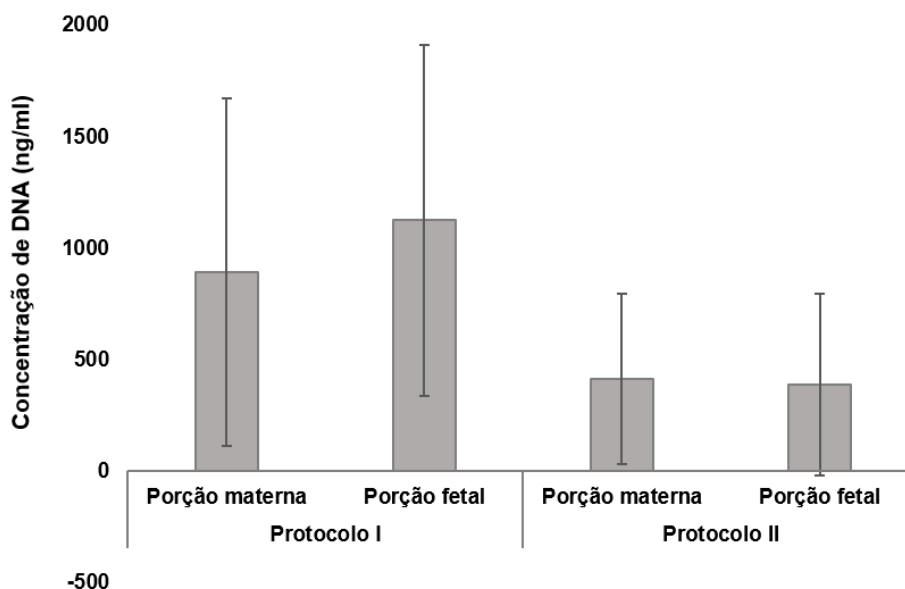
Figura 14 - Análise da ultraestrutura das matrizes extracelulares decelularizadas com os Protocolos I e II



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

Legenda: Microscopia eletrônica de varredura de varredura das porções fetal (Linha 1) e materna (Linha 2) dos grupos controle (Coluna A) e decelularizados pelo protocolo I (Coluna B) e II (Coluna C). Os asteriscos vermelhos destacam os poros observados na porção fetal da MEC, mais evidente nas amostras do Protocolo I (1B). Barra: 3 micrometros.

Gráfico 3 - Análise da quantidade de DNA remanescente nas placentas decelularizadas por Protocolo I e Protocolo II



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

4.3.2.5 Imunofluorescência

4.3.2.5.1 Laminina

A imunomarcação da laminina, foi observada tanto na porção fetal quanto na porção materna (**Figura 15 – Linha 1**) da placenta canina do grupo controle. A laminina encontrou-se presente na porção fetal (**Figura 15 – Colunas A, B e C**) em ambos protocolos. Por outro lado, a porção materna decelularizada pelo protocolo II apresentou expressão bastante diminuída (**Figura 15 – 3D e 3F**). A marcação do DAPI demonstrou a remoção do componente celular das porções fetal e materna, processadas por ambos protocolos.

4.3.2.5.2 *Fibronectina*

A imunomarcação da fibronectina foi observada nas porções fetal e materna tanto no grupo controle quanto nos decelularizados. As porções maternas decelularizadas pelo Protocolo II (**Figura 16 – 3D – 3F**) mostraram distribuição de fibronectina mais semelhante ao grupo controle, comparado àquelas submetidas ao Protocolo I (**Figura 16 – 2D – 2F**). A marcação do DAPI não evidenciou núcleos celulares nas porções fetal e materna decelularizadas.

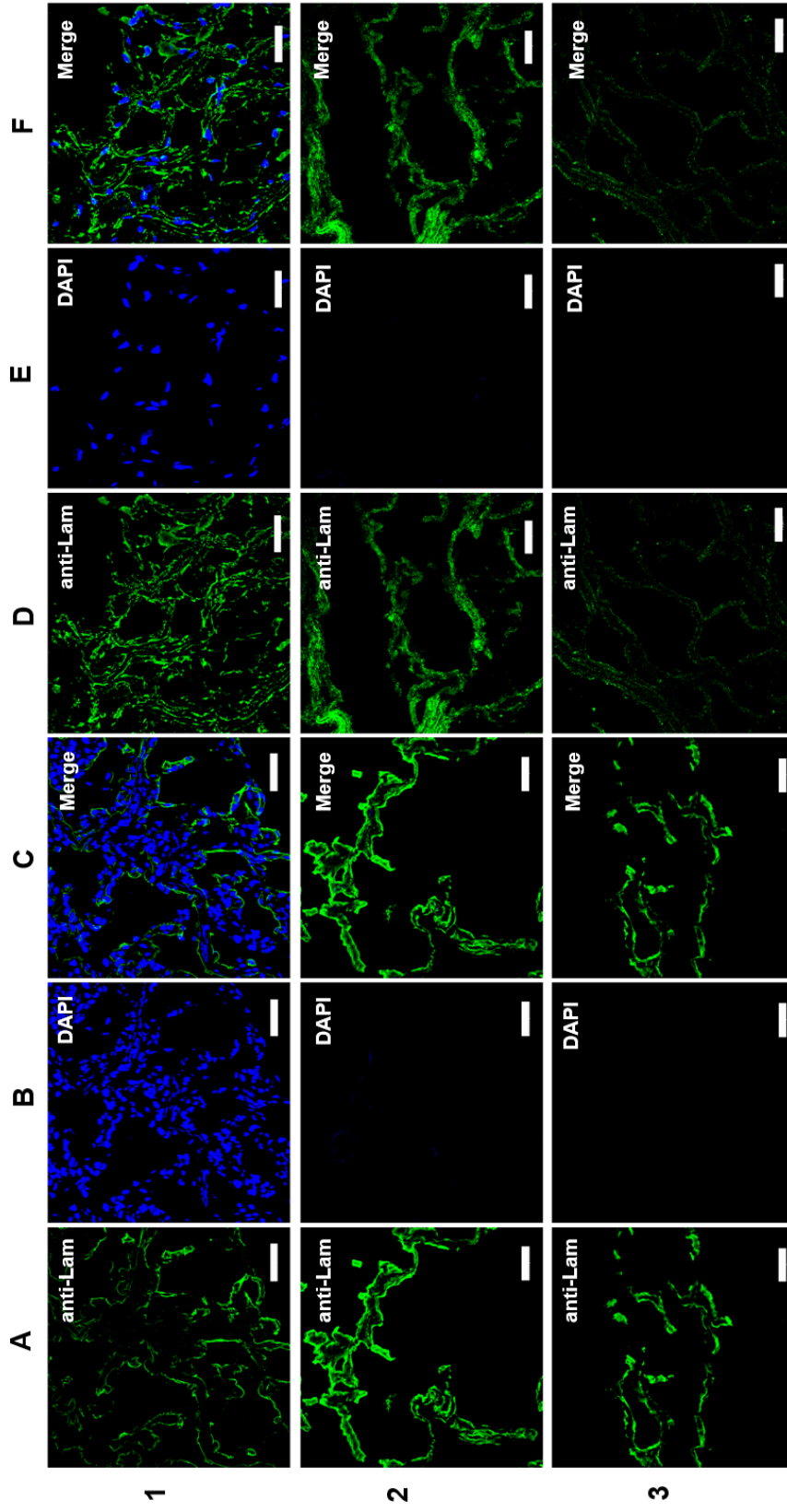
4.3.2.5.3 *Colágeno tipo I*

A imunomarcação para colágeno tipo I foi observada na porção materna e fetal do grupo controle (**Figura 17 – Linha 1**). Na porção materna (**Figura 17 – Colunas D, E e F**) observa-se organização linear e disposição paralela das fibras colágenas. Na porção fetal formaram redes dispersas e espessas. Após a decelularização por ambos os protocolos a porção materna (**Figura 17 – 2D – 2F e 3D – 3F**) mostrou-se com fibras colágenas mais desorganizadas quando comparadas com o grupo controle. A marcação do DAPI não evidenciou a presença de núcleos nas porções fetal e materna.

4.3.2.5.4 *Colágeno tipo III*

A imunomarcação do colágeno tipo III foi menos intensa do que as demais testadas. Na porção fetal e materna do grupo controle (**Figura 18 – Linha 1**) mostrou arranjo semelhante ao observado para o colágeno tipo I (**Figura 17 – Linha 1**). A porção fetal decelularizada da placenta (**Figura 18 – 2A – 2C, 3A – 3C**) apresentou marcação bastante discreta ambos os protocolos. Não houve marcação de colágeno tipo III na porção materna após ambos protocolos de decelularização. A marcação do DAPI não evidenciou a presença de componente nuclear nas porções fetal e materna.

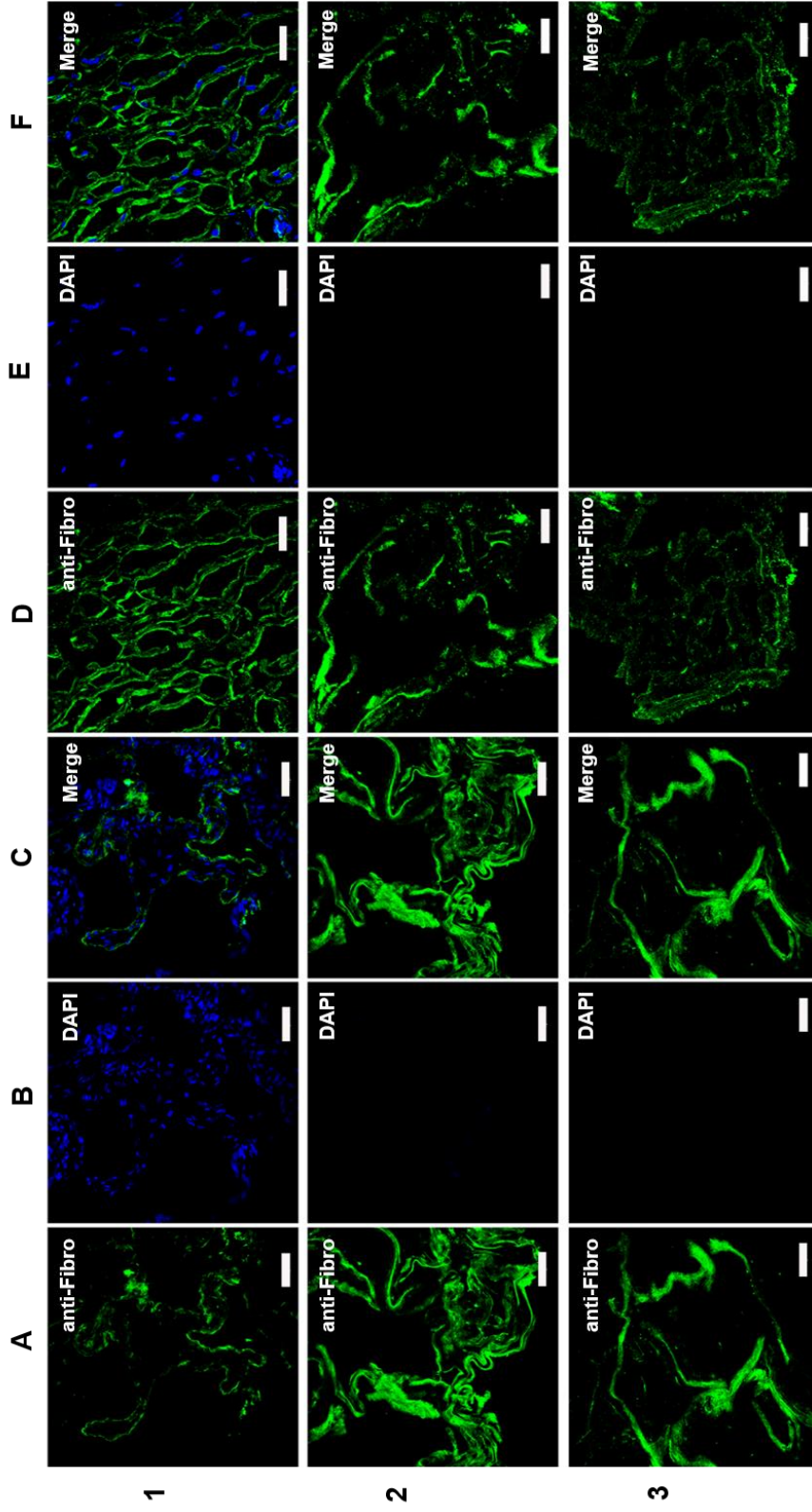
Figura 15 - Análise por imunofluorescência, com anticorpo para laminina, da porção fetal e materna da placenta canina decelularizada



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

Legenda: Marcação para laminina e núcleos celulares da porção fetal (**Colunas A, B e C**) e da porção materna (**Colunas D, E e F**). **Linha 1** grupo controle, **Linha 2** grupo decelularizado com o Protocolo I e **Linha 3** decelularizado com Protocolo II. Marcações mais intensas foram observadas na porção fetal, em ambos protocolos. As porções maternas decelularizadas pelo protocolo II (**3D e 3F**) apresentaram marcação menos intensa do que aquelas processadas pelo protocolo I (**2D e 2F**). Barra = 40 micrometros.

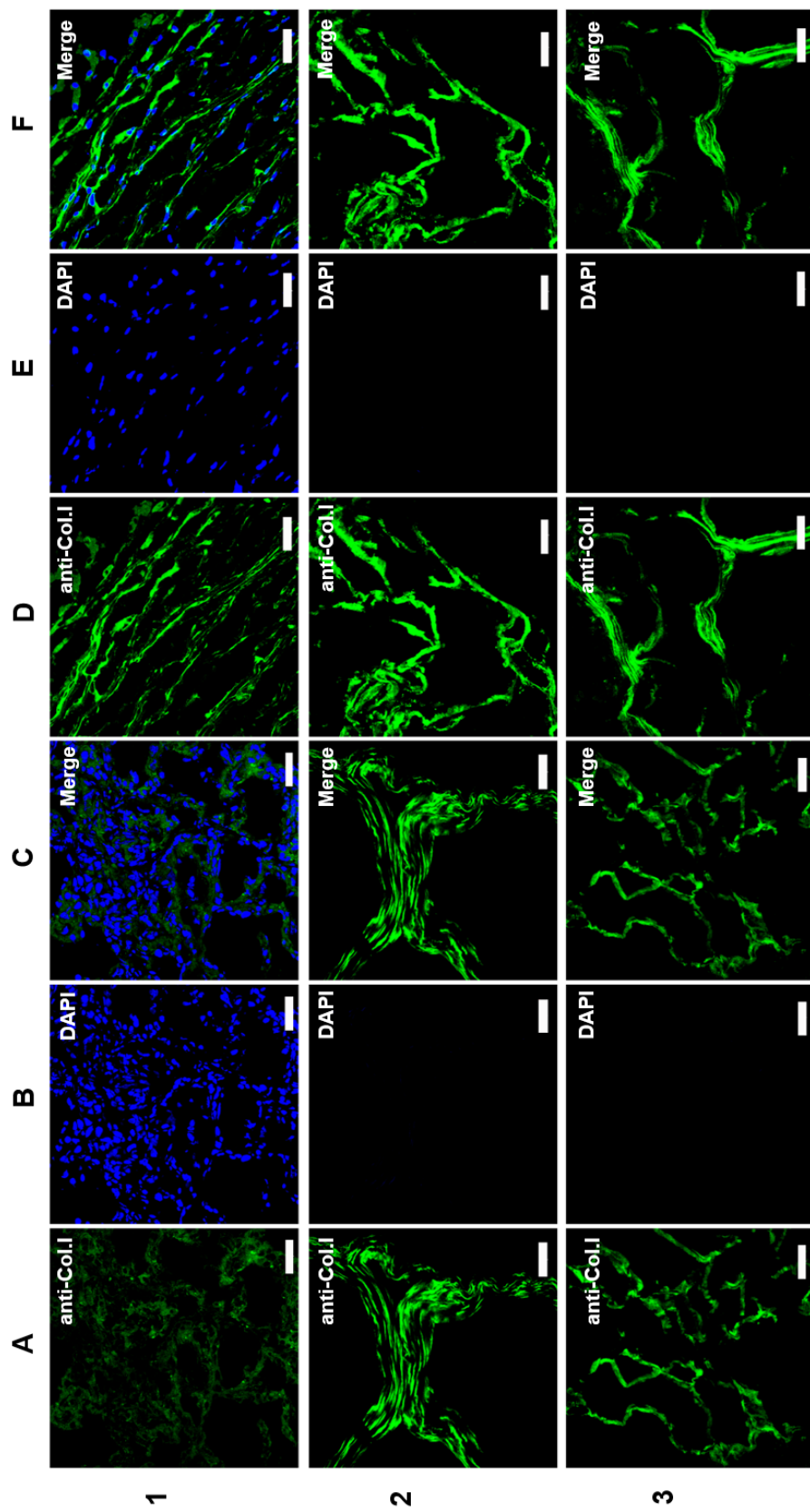
Figura 16 - Análise por imunofluorescência, com anticorpo para fibronectina, da porção fetal e materna da placenta decelularizada



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

Legenda: Marcação para fibronectina e núcleos celulares da porção fetal (Colunas A, B e C) e materna (Colunas D, E e F) de amostras controle (Linha 1) e decelularizadas pelo protocolo I (Linha 2) e II (Linha 3). A conformação paralela da fibronectina da porção materna (1D – 1F) foi mais preservada no grupo decelularizado pelo Protocolo II (3D – 3F). Não foi observada marcação nuclear por DAPI em nenhum dos grupos decelularizados. Barra = 40 micrômetros.

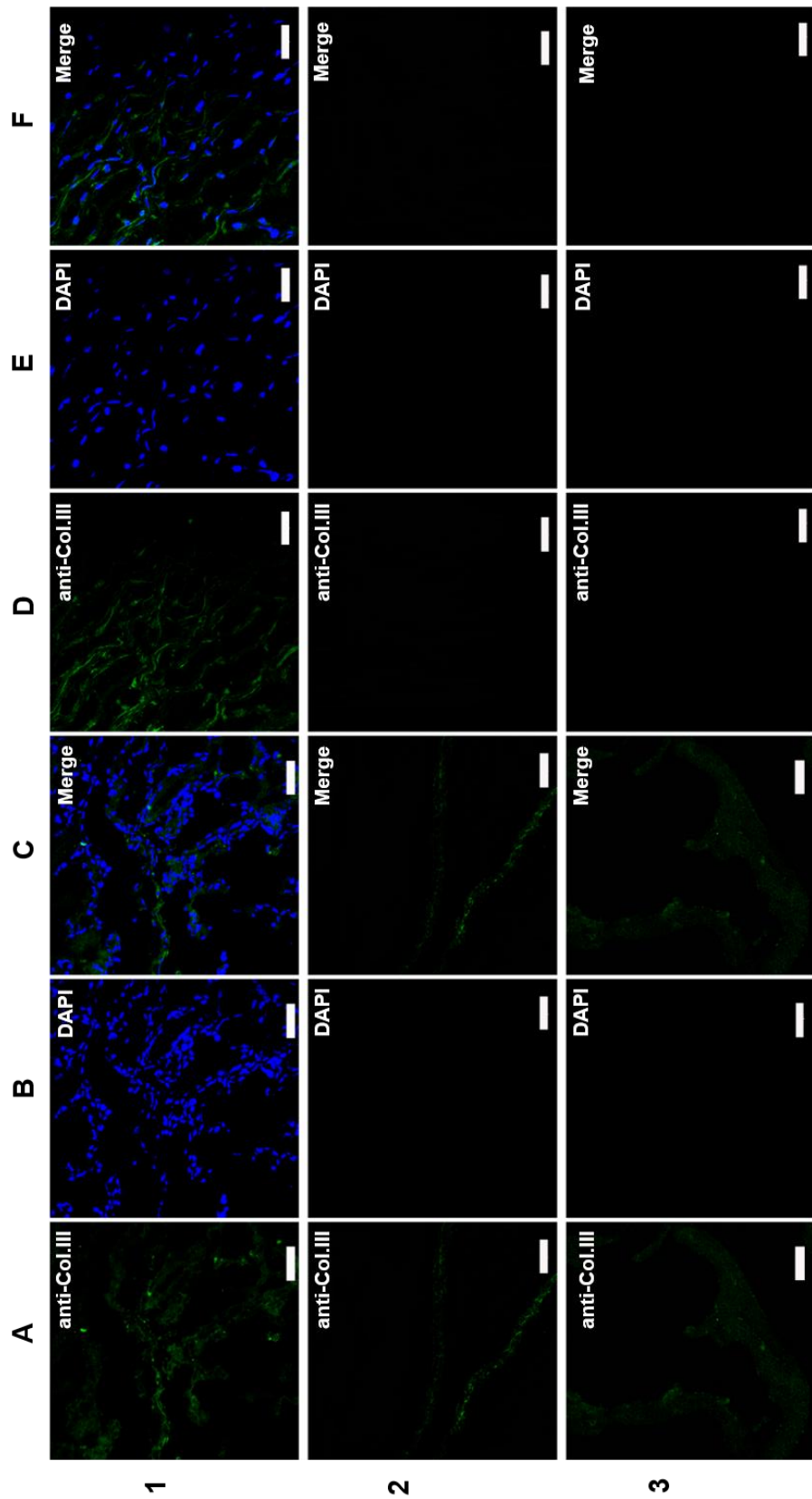
Figura 17 - Análise por imunofluorescência, com anticorpo para colágeno tipo I, da porção fetal e materna da placenta canina decelularizada



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

Legenda: Imunomarcção de colágeno tipo I das porções fetal (Colunas A, B e C) e materna (Colunas D, E e F) dos grupos controle (Linha 1) e decelularizados pelo protocolo I (Linha 2) e II (Linha 3). O colágeno tipo I mostrou-se presente em ambas porções placentárias e processadas pelos dois protocolos testados. Nenhuma marcação nuclear positiva foi encontrada nos grupos decelularizados. Barra = 40 micrometros.

Figura 18 - Análise por imunofluorescência, com anticorpo para colágeno tipo III, da porção fetal e materna da placenta canina decelularizada



Fonte: Leonel, L. C. P. C. (2015).

Legenda: Imunomarcção de colágeno tipo III das porções fetal (**Colunas A, B e C**) e materna (**Colunas D, E e F**) dos grupos controle (**Linha 1**) e decelularizados pelo protocolo I (**Linha 2**) e II (**Linha 3**). Os dois protocolos de decelularização mantiveram escassa marcação de colágeno tipo III na porção fetal da placenta (**2A – 2C e 3A – 3C**). A porção materna decelularizada com ambos protocolos (**2D – 2F e 3D – 3F**) mostraram remoção total do colágeno III ao longo de todos os campos microscópicos analisados. Marcação nuclear por DAPI foi observada apenas no grupo controle. Barra = 40 micrometros.

4.4 DISCUSSÃO

Diferentes protocolos de decelularização têm sido aplicados à distintos tecidos e órgão, tais como rins (GUAN et al., 2015; KARCZEWSKI; MALKIEWICZ, 2015; RAFIGHDOUST; SHAHRI; BAHARARA, 2015), fígado (DE KOCK et al., 2011; SOTO-GUTIERREZ et al., 2011; CARALT, 2015; ZHOU et al., 2015), coração (MOMTAHAN et al., 2015; PEREA-GIL et al., 2015; SÁNCHEZ et al., 2015), pulmão (TSUCHIYA et al., 2014; DA PALMA et al., 2015), pâncreas (XIANG et al., 2015), além de placentas humanas (HOPPER; WOODHOUSE; SEMPLE, 2003; FLYNN; SEMPLE; WOODHOUSE, 2006; SCHNEIDER et al., 2015) e bovinas (KAKABADZE; KAKABADZE, 2015). O presente trabalho é o primeiro descrito na literatura, que avalia protocolos de decelularização de placentas caninas.

A combinação de métodos de decelularização (químicos, físicos e enzimáticos) e suas variáveis (perfusão/imersão, tempo de incubação e concentração de detergentes, gradientes de temperatura) permitiu a elaboração e seleção inicial de dois protocolos promissores que permitissem a remoção das células de placentas caninas e a manutenção de sua estrutura física. Devido à complexidade da placenta e sua grande vascularização, estabelecer um protocolo reproduzível de decelularização pode ser um desafio (FLYNN; SEMPLE; WOODHOUSE, 2006).

As lavagens iniciais realizadas com perfusão de água para retirada do sangue presente em todo o tecido contribuíram para a limpeza inicial e posterior penetração das demais soluções (detergentes) ao longo dos protocolos testados. Os detergentes (SDS e Triton X-100) e soluções enzimáticas (tripsina) mostraram-se eficazes, porém com efeitos distintos nas duas porções placentárias (fetal e materna). A remoção dos debris celulares foi realizada mediante abundantes lavagens em solução tampão, ao longo e entre as distintas etapas dos protocolos, conforme descrito na literatura (HOPPER; WOODHOUSE; SEMPLE, 2003; CHOI et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2015).

Lavagens iniciais das placentas, antes de serem incubadas com detergentes são necessárias, conforme descrito por Hopper et al. (2003) e Choi et al., que decelularizaram placentas humanas. Em placentas bovinas, a mesma lavagem para remoção de sangue foi levada à cabo; no entanto, antes da ação de detergentes

iônicos e não-iônicos essas placentas foram congeladas a -80°C por 12 horas (KAKABADZE; KAKABADZE, 2015).

O cinturão da placenta canina é formado por três sistemas vasculares (arterial, venoso e os capilares do labirinto da placenta) e após os 45 dias de gestação, essa rede capilar está distribuída e organizada na forma de lóbulos por toda zona do labirinto fetal. A rede capilar presente em cada lóbulo individualizado não está isolada, apresentando conexões entre os capilares adjacentes (KISO et al., 1990). Soluções perfundidas por qualquer um desses sistemas vasculares serão distribuídas por todo tecido através dessa intrínseca rede de pequenos vasos interconectados presentes na porção fetal da placenta canina. Vale ressaltar que em nosso trabalho, essa perfusão com água logo após a coleta e antes dos fragmentos serem incubados com detergentes, não foi feita em todos os protocolos.

Nos protocolos em que esse procedimento não foi realizado, houve comprometimento significativo do tempo necessário para a remoção celular (principalmente nos Protocolos nº 2, 3 e 4). Mesmo com o congelamento das placentas e decelularização comprovada pelas análises histológicas, esses foram os protocolos em que elas permaneceram por maior período de tempo incubadas com o detergente SDS, para adquirirem o aspecto translúcido. A lavagem por perfusão antes do congelamento de placentas deve ser realizada para evitar a formação de coágulos dentro dos vasos, o que pode dificultar a penetração das soluções de decelularização nas etapas seguintes. Hopper et al. (2003) mostraram que a difusão das soluções químicas de decelularização em placentas pode ser prejudicada por esse bloqueio causado por células sanguíneas presentes dentro dos capilares, impedindo a passagem dos reagentes.

A perfusão das soluções para decelularização através das redes vasculares permite sua distribuição mais homogênea por todo tecido. Quando o método de imersão nessas soluções é utilizado, o período de incubação deve ser cuidadosamente observado e padronizado, já que tecidos mais espessos necessitam de mais tempo imersos para a remoção total das células (KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

Assim, tecidos com maior volume e espessura, como placentas humanas, podem apresentar maior dificuldade de penetração das soluções, tornando o processo de decelularização incompleto; nesse caso a utilização de perfusão pode ser imprescindível. Essa perfusão deve ser realizada utilizando-se diferentes fluxos de

infusão (HOPPER; WOODHOUSE; SEMPLE, 2003). Conforme demonstrado por Flynn et al. (2006), a combinação de diferentes vazões de perfusão nas porções fetal e materna de placentas humanas, removeu todo o conteúdo celular de forma satisfatória, sem gastos desnecessários de reagentes.

Em nosso trabalho ambos métodos - perfusão e imersão - removeram o conteúdo celular e garantiram o aspecto transparente das amostras, havendo diferenças apenas no tempo requerido para que tal característica fosse alcançada. Entretanto, o método de perfusão exigiu dispêndio muito maior de volume de soluções, o que contribuiu para a escolha do método de imersão. Apenas a infusão com fluxo 150ml/h foi utilizada neste estudo. Outros protocolos de infusão ainda requerem análises.

O aspecto gelatinoso, semitransparente e a diminuição das dimensões (comprimento, largura e espessura) do tecido decelularizado são características encontradas em grande parte dos biomateriais biológicos produzidos por técnica de decelularização (PAN et al., 2014; XU et al., 2014; GUAN et al., 2015; KAWASAKI et al., 2015). Após serem submetidas a esse processo, placentas se tornam mais friáveis e com coloração transparente devido à remoção celular (FLYNN; SEMPLE; WOODHOUSE, 2006), como observado em nossos resultados.

A solução enzimática (tripsina) utilizada no Protocolo II causou mais danos na arquitetura tridimensional da MEC, quando comparada com a associação entre EDTA e TRIS, no Protocolo I.

A preservação da estrutura tridimensional de biomateriais biológicos acelulares auxilia no suporte e desenvolvimento de novos tecidos (BADYLAK; FREYTES; GILBERT, 2009; BROWN; BADYLAK, 2014). Essa estrutura tridimensional pode ser comprometida quando se usa um protocolo com longos períodos de incubação com soluções enzimáticas, em especial a tripsina. Ela rompe ligações das células com a matriz, provocando alterações da MEC e destruição indiscriminada de suas proteínas (principalmente GAGs e elastina), afetando sua conformação original. Além disso, lavagens constantes para sua remoção do tecido ou até mesmo a utilização de soluções que possam inativar sua ação são necessárias (FLYNN; SEMPLE; WOODHOUSE, 2006; FAULK et al., 2014a; FU et al., 2014; XU et al., 2014).

Neste estudo, a desestruturação dos fragmentos decelularizados com o protocolo II pode ter ocorrido devido ao longo período (48 horas) de exposição à ação da enzima, ainda que um número maior de lavagens tenha sido realizada.

Concentrações menores e a adição de soluções que inativem a sua ação podem ser acrescentadas em futuros protocolos de modo a minimizar tais danos à MEC da placenta.

O uso isolado de um único método de decelularização pode não ser capaz de remover o conteúdo celular, sendo importante a associação entre um ou mais métodos. Somente os detergentes (SDS e Triton X-100) não foram suficientes para promover a decelularização das placentas caninas de forma eficaz, mesmo sob longos períodos de incubação. Placentas são órgão heterólogos e com muitas variações entre as espécies; sobretudo são tecidos com grande volume tanto em tamanho quanto em espessura (FLYNN; SEMPLE; WOODHOUSE, 2006; KAKABADZE; KAKABADZE, 2015). Logo, o uso de soluções adicionais para melhorar a remoção das células é necessário.

A concentração do detergente iônico SDS usado para a decelularização das placentas caninas neste trabalho foi de 1% como descrito em outros protocolos (KAKABADZE; KAKABADZE, 2015), sendo que logo no início do processo a remoção da maior quantidade de células dos tecidos da placenta, já pôde ser observada, porém não em sua totalidade. Com isso, a associação de outras soluções ao longo do protocolo (detergentes e soluções enzimáticas) como descrito em outros protocolos para placentas humanas (HOPPER; WOODHOUSE; SEMPLE, 2003; FLYNN; SEMPLE; WOODHOUSE, 2006) se fez necessário, uma vez que o SDS não foi capaz de remover todo conteúdo celular do tecido.

A organização tridimensional da MEC, combinada à sua composição química, são características únicas de cada tecido (BADYLAK; FREYTES; GILBERT, 2009). Sua manutenção tem sido crucial na determinação da resposta biológica à biomaterias biológicos produzidos a partir da decelularização de tecidos (BROWN et al., 2010; BROWN; BADYLAK, 2014).

A desestruturação da organização tridimensional da MEC remanescente pelo protocolo II foi observada em análises histológicas. No entanto com base na análise por microscopia eletrônica de varredura, ambos protocolos mantiveram certa organização arquitetônica das proteínas da matriz, assim como a presença de poros entre elas.

A remoção do DNA remanescente na matriz extracelular (após a ruptura da membrana celular) é tão importante quanto a preservação da estrutura tridimensional de biomateriais acelulares, sendo que para sua aplicação clínica é sugerida

concentração menor que 50ng/mg de matriz. Concentrações elevadas de DNA podem causar resposta inflamatória exacerbada após a implantação do biomaterial, comprometer a recelularização por células autólogas e até mesmo causar a sua rejeição. Em alguns casos essa resposta imunológica pode não ocorrer logo de imediato sendo necessário o acompanhamento durante anos após a implantação (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; KEANE; BADYLAK, 2014; GUAN et al., 2015).

Para a eliminação de DNA é comum o uso de endonucleases (DNAse e RNAse) nas etapas finais de protocolos de decelularização de placentas (HOPPER; WOODHOUSE; SEMPLE, 2003; FLYNN; SEMPLE; WOODHOUSE, 2006; BÖER et al., 2011; SCHNEIDER et al., 2015). Neste estudo, em consequência da restrita disponibilidade, a DNAse e RNAse não puderam ser utilizadas. Entretanto, vale ressaltar que a associação desse método enzimático corresponde à etapa imprescindível, caso o objetivo de uso das matrizes decelularizadas seja aplicações clínicas em bioengenharia de tecidos.

A composição química da matriz extracelular é determinada pela presença de glicoproteínas, proteoglicanas e outras moléculas que desempenham fundamental papel tanto no período embrionário quanto na homeostasia pós-natal, influenciando o comportamento e diferenciação celular. Além disso ela é responsável por manter as células e a funcionalidade do órgão, servindo como uma intrínseca rede de comunicação celular, que provê uma estrutura de suporte (FAULK et al., 2014b).

Os principais componentes encontrados na matriz extracelular de placentas são os colágenos tipo I, III, IV, V, VI, fibronectina e laminina (AMENTA et al., 1986). Para a identificação da constituição química dos tecidos decelularizados, as técnicas de proteômica e imunofluorescência foram realizadas. Esta última investigou a expressão de laminina, fibronectina, colágeno I e III nos tecidos decelularizados pelos protocolos I e II e seus respectivos grupos controles.

A composição e características estruturais que permitem o suporte e crescimento celular e consequente regeneração tecidual promovido por biomateriais biológicos decelularizados ainda não são totalmente conhecidas. Análises como a de proteômica podem contribuir para esse entendimento mais generalizado dos componentes de matrizes decelularizadas, suas interações e sinalizações com as células e demais componentes da MEC (CHANG et al., 2015; LI et al., 2015).

Os protocolos testes destinados para a análise de proteômica foram os nº 5 e nº 7 em que as placentas processadas não haviam sido congeladas previamente e sendo submetidas a ação dos detergentes SDS e Triton X-100. Fez-se necessário a escolha de tais protocolos para avaliação dos detergentes usados até então nas matrizes decelularizadas, identificando a sua composição de proteínas antes da associação com as demais soluções químicas e enzimáticas, descritas nos protocolos selecionados I e II.

Grande parte das proteínas identificadas pela análise de proteômica neste estudo, foram aquelas referentes ao citoesqueleto. Proteínas de matriz foram encontradas em menor quantidade, muito provavelmente pelo fato da tripsina (técnica *bottom-up*) não ter sido capaz de digerir as matrizes decelularizadas em sua totalidade. De fato, uma das dificuldades na identificação das proteínas da matriz extracelular é sua complexa organização estrutural e insolubilidade de seus componentes dificultando seu fracionamento. Outro agravante, são as grandes quantidades de proteínas citoplasmáticas e mitocondriais que dificultam a detecção das proteínas da MEC (LÜ et al., 2014; GUAN et al., 2015).

A técnica *bottom-up* para análise de proteômica (fragmentação das proteínas por digestão enzimática e posterior identificação dos peptídeos gerados pela espectrometria de massas – MS), apesar de simples, resulta em uma complexa mistura de peptídeos. Alta sensibilidade e eficiência de automação para a decodificação dessa mistura são necessárias, ressaltando ainda que pode ocorrer de nem todos os peptídeos serem observados e/ou lidos de maneira correta pela análise de MS, o que pode comprometer a identificação das proteínas presentes. Isto torna necessário ensaios mais acurados e específicos para confirmação da presença proteica (HAN; ASLANIAN; YATES, 2008), como a técnica de imunofluorescência.

A laminina é uma proteína presente na membrana basal da placenta, sendo mais marcada na superfície basal do trofoblasto. Sua expressão aumenta com o avançar da gestação (CHEN; APLIN, 2003) e apresenta correlação com outras proteínas estruturais da matriz placentária, tais como o colágeno tipo IV (AMENTA et al., 1986).

O colágeno tipo I, de diâmetro aproximado entre 30-35 nanômetros, associa-se à outros componentes estruturais da matriz, como os colágenos tipo III, V, VI e fibronectina, e possui distribuição variada, sendo observado principalmente no

estroma viloso e paredes de vasos sanguíneos (AMENTA et al., 1986; CHEN; APLIN, 2003).

O colágeno tipo III (diâmetro aproximado variando entre 15-20 nanômetros) também associa-se com a fibronectina e comumente apresenta-se entrelaçado com outras fibras de colágeno, como o do tipo I na MEC (AMENTA et al., 1986).

A fibronectina é uma proteína bastante abundante no estroma placentário, áreas abaixo da membrana basal do trofoblasto e paredes de vasos sanguíneos, tanto no início quanto no final da gestação (NANAIEV et al., 1991; CHEN; APLIN, 2003).

A marcação para as quatro proteínas testadas foi observada em ambas porções das placentas caninas. Tanto o grupo controle quanto o grupo decelularizado, apresentaram intensa marcação para colágeno tipo I e fibronectina. A laminina foi levemente marcada na porção materna processada pelo protocolo II, embora sua expressão tenha sido alta no protocolo I. Exceção se fez com o colágeno tipo III, sendo totalmente eliminado nas porções maternas decelularizadas pelos protocolos I e II. A localização exata dessas proteínas após a decelularização não pôde ser descrita, já que com a remoção celular perdem-se os pontos de referência de cada uma.

4.5 CONCLUSÃO

Estabelecer protocolo de decelularização de placentas caninas é um desafio devido à variabilidade individual do tecido, à suas diferentes dimensões (espessura, largura e tamanho) e também composição de matriz. Na decelularização de placentas caninas o detergente responsável pela remoção da maior quantidade de células foi o SDS na concentração de 1%, sendo necessário entretanto, a associação de outros métodos para otimizar essa eliminação, nas etapas seguintes dos protocolos.

O congelamento prévio das placentas sem prévia perfusão com água para retirada de sangue dos vasos sanguíneos, comprometeu a ação dos detergentes, exigindo maior período de tempo de incubação para remoção celular eficaz. O método de perfusão não demonstrou redução no tempo de decelularização quando comparado com método de imersão, no entanto, outras vazões de perfusão devem ser testadas na tentativa de alcançar menor período em exposição a esses detergentes.

Após a seleção de dois protocolos com base nas análises já descritas, pôde-se observar que o protocolo em que continha a associação com método enzimático de decelularização (incubação com 5mM EDTA + 0,05% tripsina + 0,5% antibiótico) foi o que melhor removeu conteúdo celular, diminuindo também a quantidade de DNA remanescente, porém com nítida desestruturação das proteínas de matriz. Oposto foi observado com o protocolo I (incubação com 5mM EDTA + 50mM TRIS + 0,5% antibiótico), em que a conformação estrutural da matriz placentária decelularizada foi preservada, porém sem a eliminação total das células do tecido como observado pelas análises histológicas.

Sendo assim, conclui-se que o melhor protocolo para decelularização das amostras de placentas caninas (com base em remoção de células e concentração de DNA remanescente) foi o Protocolo II. No entanto, faz-se necessário a sua otimização, de modo a alcançar melhor preservação da estrutura da matriz extracelular (diminuindo o tempo de exposição a tripsina e/ou usar soluções que possam inativar sua ação), maior remoção de conteúdo de DNA (associação no protocolo com endonucleases) e eliminação das proteínas do citoesqueleto encontradas na caracterização proteica das matrizes decelularizadas, antes de avaliações *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AMENTA, P. S.; GAY, S.; VAHERI, A.; MARTINEZ-HERNANDEZ, A. The extracellular matrix is an integrated unit: ultrastructural localization of collagen types I, III, IV, V, VI, fibronectin, and laminin in human term placenta. **Collagen and Related Research**, v. 6, n. 2, p. 125–52, jun. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3731745>>. Acesso em: 2 dez. 2015.
- BADYLAK, S. F.; FREYTES, D. O.; GILBERT, T. W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 1–13, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18938117>>. Acesso em: 9 jul. 2014.
- BÖER, U.; LOHRENZ, A.; KLINGENBERG, M.; PICH, A.; HAVERICH, A.; WILHELMI, M. The effect of detergent-based decellularization procedures on cellular proteins and immunogenicity in equine carotid artery grafts. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9730–9737, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944468>>. Acesso em: 7 out. 2015.
- BROWN, B. N.; BADYLAK, S. F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. **Translational Research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 163, n. 4, p. 268–85, abr. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4203714&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 nov. 2015.
- BROWN, B. N.; BARNES, C. A.; KASICK, R. T.; MICHEL, R.; GILBERT, T. W.; BEER-STOLZ, D.; CASTNER, D. G.; RATNER, B. D.; BADYLAK, S. F. Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, n. 3, p. 428–37, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961209009934>>. Acesso em: 1 set. 2015.
- CARALT, M. Present and Future of Regenerative Medicine: Liver Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 47, n. 8, p. 2377–2379, out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26518932>>. Acesso em: 28 out. 2015.
- CHANG, C. W.; DALGLIESH, A. J.; LÓPEZ, J. E.; GRIFFITHS, L. G. Cardiac extracellular matrix proteomics: Challenges, techniques, and clinical implications. **Proteomics. Clinical Applications**, 20 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26200932>>. Acesso em: 1 out. 2015.
- CHEN, C.-P.; APLIN, J. D. Placental extracellular matrix: gene expression, deposition by placental fibroblasts and the effect of oxygen. **Placenta**, v. 24, n. 4, p. 316–25, abr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657504>>. Acesso em: 27 nov. 2015.
- CHOI, J. S.; KIM, J. D.; YOON, H. S.; CHO, Y. W. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules. **Tissue Engineering. Part A**, v. 19, n. 3-4, p. 329–39, fev. 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3542901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 set. 2015.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–43, abr. 2011. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961211000895>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

DA PALMA, R. K.; CAMPILLO, N.; URIARTE, J. J.; OLIVEIRA, L. V. F.; NAVAJAS, D.; FARRÉ, R. Pressure- and flow-controlled media perfusion differently modify vascular mechanics in lung decellularization. **Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 49, p. 69–79, set. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26002417>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

DE KOCK, J.; CELEN, L.; DE SPIEGELAERE, W.; CASTELEYN, C.; CLAES, P.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V. Simple and quick method for whole-liver decellularization: a novel in vitro three-dimensional bioengineering tool? **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 6, p. 607–12, jun. 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21512802>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

FAULK, D. M.; CARRUTHERS, C. A.; WARNER, H. J.; KRAMER, C. R.; REING, J. E.; ZHANG, L.; D'AMORE, A.; BADYLAK, S. F. The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 183–93, jan. 2014a. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3857635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 ago. 2015.

FAULK, D. M.; JOHNSON, S. A.; ZHANG, L.; BADYLAK, S. F. Role of the extracellular matrix in whole organ engineering. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 8, p. 984–9, ago. 2014b. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24347365>>. Acesso em: 29 ago. 2015.

FLYNN, L.; SEMPLE, J. L.; WOODHOUSE, K. A. Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 79, n. 2, p. 359–69, nov. 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16883587>>. Acesso em: 2 dez. 2015.

FU, R.-H.; WANG, Y.-C.; LIU, S.-P.; SHIH, T.-R.; LIN, H.-L.; CHEN, Y.-M.; SUNG, J.-H.; LU, C.-H.; WEI, J.-R.; WANG, Z.-W.; HUANG, S.-J.; TSAI, C.-H.; SHYU, W.-C.; LIN, S.-Z. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. **Cell Transplantation**, v. 23, n. 4-5, p. 621–30, jan. 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24816454>>. Acesso em: 25 set. 2015.

GONZÁLEZ-ANDRADES, M.; CARRIEL, V.; RIVERA-IZQUIERDO, M.; GARZÓN, I.; GONZÁLEZ-ANDRADES, E.; MEDIALDEA, S.; ALAMINOS, M.; CAMPOS, A. Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas With Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences. **Translational Vision Science & Technology**, v. 4, n. 2, p. 13, abr. 2015. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4404970&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 set. 2015.

GUAN, Y.; LIU, S.; LIU, Y.; SUN, C.; CHENG, G.; LUAN, Y.; LI, K.; WANG, J.; XIE, X.; ZHAO, S. Porcine kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 56, p. 451–6, 1 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26249614>>. Acesso em: 1 set. 2015.

HAN, X.; ASLANIAN, A.; YATES, J. R. Mass spectrometry for proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 5, p. 483–90, out. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2642903&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 jan. 2016.

HOPPER, R. A.; WOODHOUSE, K.; SEMPLE, J. L. Acellularization of human placenta with preservation of the basement membrane: a potential matrix for tissue engineering. **Annals of Plastic Surgery**, v. 51, n. 6, p. 598–602, dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14646657>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

KAKABADZE, A.; KAKABADZE, Z. Prospect of using decellularized human placenta and cow placentome for creation of new organs: targeting the liver (part I: anatomic study). **Transplantation Proceedings**, v. 47, n. 4, p. 1222–7, maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26036559>>. Acesso em: 1 set. 2015.

KARCZEWSKI, M.; MALKIEWICZ, T. Scaffolds from surgically removed kidneys as a potential source of organ transplantation. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 325029, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4338377&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

KAWASAKI, T.; KIRITA, Y.; KAMI, D.; KITANI, T.; OZAKI, C.; ITAKURA, Y.; TOYODA, M.; GOJO, S. Novel detergent for whole organ tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 103, n. 10, p. 3364–73, out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25850947>>. Acesso em: 1 set. 2015.

KEANE, T. J.; BADYLAK, S. F. Biomaterials for tissue engineering applications. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 23, n. 3, p. 112–8, jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24994524>>. Acesso em: 22 jun. 2015.

KEANE, T. J.; SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 84, p. 25–34, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25791470>>. Acesso em: 5 ago. 2015.

KISO, Y.; YAMASHITA, A.; SASAKI, F.; YAMAUCHI, S. Maternal blood vascular architecture of the dog placenta during the second half of pregnancy. **The Japanese Journal of Animal Reproduction**, v. 36, n. 2, p. 120–126, 15 maio 1990. Disponível

em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd1977/36/2/36_2_120/_article>. Acesso em: 10 dez. 2015.

LI, Q.; UYGUN, B. E.; GEERTS, S.; OZER, S.; SCALF, M.; GILPIN, S. E.; OTT, H. C.; YARMUSH, M. L.; SMITH, L. M.; WELHAM, N. V.; FREY, B. L. Proteomic analysis of naturally-sourced biological scaffolds. **Biomaterials**, v. 75, p. 37–46, 8 out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26476196>>. Acesso em: 9 nov. 2015.

LU, H.; HOSHIBA, T.; KAWAZOE, N.; CHEN, G. Comparison of decellularization techniques for preparation of extracellular matrix scaffolds derived from three-dimensional cell culture. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 100, n. 9, p. 2507–16, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22623317>>. Acesso em: 11 set. 2015.

LÜ, W.-D.; ZHANG, L.; WU, C.-L.; LIU, Z.-G.; LEI, G.-Y.; LIU, J.; GAO, W.; HU, Y.-R. Development of an acellular tumor extracellular matrix as a three-dimensional scaffold for tumor engineering. **PloS One**, v. 9, n. 7, p. e103672, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4114977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 out. 2015.

MOMTAHAN, N.; POORNEJAD, N.; STRUK, J. A.; CASTLETON, A. A.; HERROD, B. J.; VANCE, B. R.; EATOUGH, J. P.; ROEDER, B. L.; REYNOLDS, P. R.; COOK, A. D. Automation of Pressure Control Improves Whole Porcine Heart Decellularization. **Tissue Engineering. Part C, Methods**, v. 21, n. 11, p. 1148–61, nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26077163>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

NANAEV, A. K.; RUKOSUEV, V. S.; SHIRINSKY, V. P.; MILOVANOV, A. P.; DOMOGATSKY, S. P.; DUANCE, V. C.; BRADBURY, F. M.; YARROW, P.; GARDINER, L.; D'LACEY, C. Confocal and conventional immunofluorescent and immunogold electron microscopic localization of collagen types III and IV in human placenta. **Placenta**, v. 12, n. 6, p. 573–95, jan. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1805200>>. Acesso em: 9 dez. 2015.

PAN, M. X.; HU, P. Y.; CHENG, Y.; CAI, L. Q.; RAO, X. H.; WANG, Y.; GAO, Y. An efficient method for decellularization of the rat liver. **Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi**, v. 113, n. 10, p. 680–7, out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849456>>. Acesso em: 1 set. 2015.

PEREA-GIL, I.; URIARTE, J. J.; PRAT-VIDAL, C.; GÁLVEZ-MONTÓN, C.; ROURA, S.; LLUCIÀ-VALLDEPERAS, A.; SOLER-BOTIJA, C.; FARRÉ, R.; NAVAJAS, D.; BAYES-GENIS, A. In vitro comparative study of two decellularization protocols in search of an optimal myocardial scaffold for recellularization. **American Journal of Translational Research**, v. 7, n. 3, p. 558–73, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4448195&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 jun. 2015.

RAFIGHDOUST, A.; SHAHRI, N. M.; BAHARARA, J. Decellularized kidney in the presence of chondroitin sulfate as a natural 3D scaffold for stem cells. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 18, n. 8, p. 788–98, ago. 2015. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4633462&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17 nov. 2015.

SÁNCHEZ, P. L.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. E.; COSTANZA, S.; CLIMENT, A. M.; MOSCOSO, I.; GONZALEZ-NICOLAS, M. A.; SANZ-RUIZ, R.; RODRÍGUEZ, H.; KREN, S. M.; GARRIDO, G.; ESCALANTE, J. L.; BERMEJO, J.; ELIZAGA, J.; MENARGUEZ, J.; YOTTI, R.; PÉREZ DEL VILLAR, C.; ESPINOSA, M. A.; GUILLEM, M. S.; WILLERSON, J. T.; BERNAD, A.; MATESANZ, R.; TAYLOR, D. A.; FERNÁNDEZ-AVILÉS, F. Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts. **Biomaterials**, v. 61, p. 279–89, ago. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26005766>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

SCHNEIDER, K. H.; AIGNER, P.; HOLNTHONER, W.; MONFORTE, X.; NÜRNBERGER, S.; RÜNZLER, D.; REDL, H.; TEUSCHL, A. H. Decellularized human placenta chorion matrix as a favorable source of small-diameter vascular grafts. **Acta Biomaterialia**, 30 set. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26432442>>. Acesso em: 8 out. 2015.

SOTO-GUTIERREZ, A.; ZHANG, L.; MEDBERRY, C.; FUKUMITSU, K.; FAULK, D.; JIANG, H.; REING, J.; GRAMIGNOLI, R.; KOMORI, J.; ROSS, M.; NAGAYA, M.; LAGASSE, E.; STOLZ, D.; STROM, S. C.; FOX, I. J.; BADYLAK, S. F. A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. **Tissue Engineering. Part C, Methods**, v. 17, n. 6, p. 677–86, jun. 2011. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3103054&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

TSUCHIYA, T.; BALESTRINI, J. L.; MENDEZ, J.; CALLE, E. A.; ZHAO, L.; NIKLASON, L. E. Influence of pH on extracellular matrix preservation during lung decellularization. **Tissue Engineering. Part C, Methods**, v. 20, n. 12, p. 1028–36, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735501>>. Acesso em: 23 out. 2015.

XIANG, J.-X.; ZHENG, X.-L.; GAO, R.; WU, W.-Q.; ZHU, X.-L.; LI, J.-H.; LV, Y. Liver regeneration using decellularized splenic scaffold: a novel approach in tissue engineering. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International : HBPD INT**, v. 14, n. 5, p. 502–8, out. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26459726>>. Acesso em: 23 out. 2015.

XU, H.; XU, B.; YANG, Q.; LI, X.; MA, X.; XIA, Q.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; WU, Y.; ZHANG, Y. Comparison of Decellularization Protocols for Preparing a Decellularized Porcine Annulus Fibrosus Scaffold. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86723, 24 jan. 2014. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3901704&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 out. 2015.

ZHOU, P.; HUANG, Y.; GUO, Y.; WANG, L.; LING, C.; GUO, Q.; WANG, Y.; ZHU, S.; FAN, X.; ZHU, M.; HUANG, H.; LU, Y.; WANG, Z. Decellularization and Recellularization of Rat Livers With Hepatocytes and Endothelial Progenitor Cells. **Artificial Organs**, 4 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26637111>>. Acesso em: 6 dez. 2015.

5 CONCLUSÕES

Placentas são responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção do feto durante toda a gravidez, com importantes características imunoregulatórias. Devido a sua grande variabilidade entre as espécies podem ser classificadas levando em consideração os seguintes aspectos: 1) forma macroscópica (cotiledonária, discoide, difusa ou zonária); 2) interação materno-fetal (epiteliocorial, endotelicorial, sinepiteliocorial ou hemocorial – esta última com três variações hemo-monocorial, hemo-dicorial ou hemo-tricorial); ou ainda 3) de acordo com as barreiras materno-fetais (pregueada, lamelar, trabecular, vilosa ou labiríntica). A placenta canina é classificada então como, zonária, endotelicorial e lamelar. A composição de sua matriz extracelular possui proteínas com importante papel na sinalização e direcionamento celular imprescindíveis para a remodelação endometrial durante todo o período gestacional.

Devido a sua composição de matriz, elas despertam o interesse da bioengenharia de tecidos. Com sua complexa organização de matriz, espessura e variabilidade de tecido, para a criação de protocolo de decelularização de placentas caninas foi necessária a associação de diferentes métodos de decelularização (químicos, físicos e enzimáticos). Análises iniciais realizadas com dez protocolos distintos comprovaram que neste estudo, o método de imersão e perfusão promoveram remoção celular satisfatória e o congelamento prévio das placentas aumentou o tempo requerido de exposição aos detergentes. Após serem selecionados dois protocolos (Protocolo I e II), observou-se que ambos removeram consideravelmente as células do tecido e preservaram a expressão de fibronectina e colágeno tipo I e, em menor extensão, laminina e colágeno tipo III. O protocolo com uso do método enzimático (tripsina) removeu todo conteúdo celular, afetando também arranjo estrutural de toda a matriz.

REFERÊNCIAS

- AZHIM, A.; SYAZWANI, N.; MORIMOTO, Y.; FURUKAWA, K.; USHIDA, T. The use of sonication treatment to decellularize aortic tissues for preparation of bioscaffolds. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, n. 1, p. 130–141, 2 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384523>>. Acesso em: 7 out. 2015.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, v. 15, n. 1, p. 13–21, mar. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282005000100006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 5 dez. 2015.
- BEAUDET, J. M.; MANSUR, L.; JOO, E. J.; KAMHI, E.; YANG, B.; CLAUSEN, T. M.; SALANTI, A.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J. Characterization of human placental glycosaminoglycans and regional binding to VAR2CSA in malaria infected erythrocytes. **Glycoconjugate Journal**, v. 31, n. 2, p. 109–16, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3946866&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 nov. 2015.
- BÖER, U.; LOHRENZ, A.; KLINGENBERG, M.; PICH, A.; HAVERICH, A.; WILHELMI, M. The effect of detergent-based decellularization procedures on cellular proteins and immunogenicity in equine carotid artery grafts. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9730–9737, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944468>>. Acesso em: 7 out. 2015.
- BURK, J.; ERBE, I.; BERNER, D.; KACZA, J.; KASPER, C.; PFEIFFER, B.; WINTER, K.; BREHM, W. Freeze-Thaw Cycles Enhance Decellularization of Large Tendons. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 20, n. 4, p. 276–284, abr. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3968887&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 out. 2015.
- CARALT, M.; UZARSKI, J. S.; IACOB, S.; OBERGFELL, K. P.; BERG, N.; BIJONOWSKI, B. M.; KIEFER, K. M.; WARD, H. H.; WANDINGER-NESS, A.; MILLER, W. M.; ZHANG, Z. J.; ABECASSIS, M. M.; WERTHEIM, J. A. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. **American Journal of Transplantation**: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, v. 15, n. 1, p. 64–75, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25403742>>. Acesso em: 11 ago. 2015.
- CHEN, C.-P.; APLIN, J. D. Placental extracellular matrix: gene expression, deposition by placental fibroblasts and the effect of oxygen. **Placenta**, v. 24, n. 4, p. 316–25, abr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657504>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–43, abr. 2011. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961211000895>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

DALTIN, D. **Tensoativos**: química, propriedades e aplicações. São Paulo: Blucher, 2011.

DE CASTRO BRÁS, L. E.; RAMIREZ, T. A.; DELEON-PENNELL, K. Y.; CHIAO, Y. A.; MA, Y.; DAI, Q.; HALADE, G. V.; HAKALA, K.; WEINTRAUB, S. T.; LINDSEY, M. L. Texas 3-step decellularization protocol: looking at the cardiac extracellular matrix. **Journal of Proteomics**, v. 86, p. 43–52, 28 jun. 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3879953&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 set. 2015.

ENDERS, A.; BLANKENSHIP, T. Comparative placental structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 38, n. 1, p. 3–15, 14 jun. 1999. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837743>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

FAULK, D. M.; CARRUTHERS, C. A.; WARNER, H. J.; KRAMER, C. R.; REING, J. E.; ZHANG, L.; D'AMORE, A.; BADYLAK, S. F. The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 183–93, jan. 2014a. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3857635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 ago. 2015.

FAULK, D. M.; JOHNSON, S. A.; ZHANG, L.; BADYLAK, S. F. Role of the extracellular matrix in whole organ engineering. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 8, p. 984–9, ago. 2014b. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24347365>>. Acesso em: 29 ago. 2015.

FLYNN, L.; SEMPLE, J. L.; WOODHOUSE, K. A. Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 79, n. 2, p. 359–69, nov. 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16883587>>. Acesso em: 2 dez. 2015.

FU, R.-H.; WANG, Y.-C.; LIU, S.-P.; SHIH, T.-R.; LIN, H.-L.; CHEN, Y.-M.; SUNG, J.-H.; LU, C.-H.; WEI, J.-R.; WANG, Z.-W.; HUANG, S.-J.; TSAI, C.-H.; SHYU, W.-C.; LIN, S.-Z. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. **Cell Transplantation**, v. 23, n. 4-5, p. 621–30, jan. 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24816454>>. Acesso em: 25 set. 2015.

GARDIN, C.; RICCI, S.; FERRONI, L.; GUAZZO, R.; SBRICOLI, L.; DE BENEDICTIS, G.; FINOTTI, L.; ISOLA, M.; BRESSAN, E.; ZAVAN, B. Decellularization and Delipidation Protocols of Bovine Bone and Pericardium for Bone Grafting and Guided Bone Regeneration Procedures. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0132344, jan. 2015. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4507977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 ago. 2015.

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675–83, jul. 2006a. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206001682>>. Acesso em: 16 jul. 2014.

GONZÁLEZ-ANDRADES, M.; CARRIEL, V.; RIVERA-IZQUIERDO, M.; GARZÓN, I.; GONZÁLEZ-ANDRADES, E.; MEDIALDEA, S.; ALAMINOS, M.; CAMPOS, A. Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas With Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences. **Translational Vision Science & Technology**, v. 4, n. 2, p. 13, abr. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4404970&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 set. 2015.

GRANDO MATTUELLA, L.; POLI DE FIGUEIREDO, J. A.; NÖR, J. E.; DE ARAUJO, F. B.; MEDEIROS FOSSATI, A. C. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in the pulp of human primary and young permanent teeth. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 12, p. 1408–12, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18037047>>. Acesso em: 3 dez. 2015.

GUAN, Y.; LIU, S.; LIU, Y.; SUN, C.; CHENG, G.; LUAN, Y.; LI, K.; WANG, J.; XIE, X.; ZHAO, S. Porcine kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 56, p. 451–6, 1 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26249614>>. Acesso em: 1 set. 2015.

HASHIMOTO, Y.; FUNAMOTO, S.; SASAKI, S.; NEGISHI, J.; HONDA, T.; HATTORI, S.; NAM, K.; KIMURA, T.; MOCHIZUKI, M.; KOBAYASHI, H.; KISHIDA, A. Corneal Regeneration by Deep Anterior Lamellar Keratoplasty (DALK) Using Decellularized Corneal Matrix. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0131989, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4498638&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 out. 2015.

HELLSTRÖM, M.; EL-AKOURI, R. R.; SIHLBOM, C.; OLSSON, B. M.; LENGQVIST, J.; BÄCKDAHL, H.; JOHANSSON, B. R.; OLAUSSON, M.; SUMITRAN-HOLGERSSON, S.; BRÄNNSTRÖM, M. Towards the development of a bioengineered uterus: comparison of different protocols for rat uterus decellularization. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 12, p. 5034–42, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25169258>>. Acesso em: 13 ago. 2015.

HOPPER, R. A.; WOODHOUSE, K.; SEMPLE, J. L. Acellularization of human placenta with preservation of the basement membrane: a potential matrix for tissue engineering. **Annals of Plastic Surgery**, v. 51, n. 6, p. 598–602, dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14646657>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

KAKABADZE, A.; KAKABADZE, Z. Prospect of using decellularized human placenta and cow placentome for creation of new organs: targeting the liver (part I: anatomic

study). **Transplantation Proceedings**, v. 47, n. 4, p. 1222–7, maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26036559>>. Acesso em: 1 set. 2015.

KAWASAKI, T.; KIRITA, Y.; KAMI, D.; KITANI, T.; OZAKI, C.; ITAKURA, Y.; TOYODA, M.; GOJO, S. Novel detergent for whole organ tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 103, n. 10, p. 3364–73, out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25850947>>. Acesso em: 1 set. 2015.

KEANE, T. J.; SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 84, p. 25–34, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25791470>>. Acesso em: 5 ago. 2015.

KHORRAMIROUZ, R.; SABETKISH, S.; AKBARZADEH, A.; MUHAMMADNEJAD, A.; HEIDARI, R.; KAJBAFZADEH, A.-M. Effect of three decellularisation protocols on the mechanical behaviour and structural properties of sheep aortic valve conduits. **Advances in Medical Sciences**, v. 59, n. 2, p. 299–307, set. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1896112614000613>>. Acesso em: 12 ago. 2015.

KOCH, H.; HAMMER, N.; OSSMANN, S.; SCHIERLE, K.; SACK, U.; HOFMANN, J.; WECKS, M.; BOLDT, A. Tissue Engineering of Ureteral Grafts: Preparation of Biocompatible Crosslinked Ureteral Scaffolds of Porcine Origin. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 89, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4477215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 out. 2015.

LIN, H.; SUN, G.; HE, H.; BOTSFORD, B.; LI, M.; ELISSEEFF, J. H.; YIU, S. C. Three-dimensional culture of functional adult rabbit lacrimal gland epithelial cells on decellularized scaffold. **Tissue Engineering Part A**, p. ten.TEA.2015.0286, 28 set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26414959>>. Acesso em: 8 out. 2015.

LOJUDICE, F. H.; SOGAYAR, M. C. Células-tronco no tratamento e cura do diabetes mellitus. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 19–21, fev. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232008000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 5 dez. 2015.

LÜ, W.-D.; ZHANG, L.; WU, C.-L.; LIU, Z.-G.; LEI, G.-Y.; LIU, J.; GAO, W.; HU, Y.-R. Development of an acellular tumor extracellular matrix as a three-dimensional scaffold for tumor engineering. **PloS One**, v. 9, n. 7, p. e103672, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4114977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 out. 2015.

MALLIS, P.; GONTIKA, I.; POULOGIANNPOULOS, T.; ZOIDAKIS, J.; VLAHOU, A.; MICHALOPOULOS, E.; CHATZISTAMATIOU, T.; PAPASSAVAS, A.; STAVROPOULOS-GIOKAS, C. Evaluation of Decellularization in Umbilical Cord Artery. **Transplantation Proceedings**, v. 46, n. 9, p. 3232–3239, nov. 2014.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25420867>>. Acesso em: 7 out. 2015.

MANCUSO, L.; GUALERZI, A.; BOSCHETTI, F.; LOY, F.; CAO, G. Decellularized ovine arteries as small-diameter vascular grafts. **Biomedical Materials (Bristol, England)**, v. 9, n. 4, p. 045011, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25050540>>. Acesso em: 23 out. 2015.

MELO, E.; GARRETA, E.; LUQUE, T.; CORTIELLA, J.; NICHOLS, J.; NAVAJAS, D.; FARRÉ, R. Effects of the Decellularization Method on the Local Stiffness of Acellular Lungs. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 20, n. 5, p. 412–422, maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24083889>>. Acesso em: 7 out. 2015.

NAGATA, S.; HANAYAMA, R.; KAWANE, K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. **Cell**, v. 140, n. 5, p. 619–30, 5 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211132>>. Acesso em: 9 jan. 2015.

NEREM, R. M. Cell-based therapies: from basic biology to replacement, repair, and regeneration. **Biomaterials**, v. 28, n. 34, p. 5074–7, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689607>>. Acesso em: 5 dez. 2015.

NIKNEJAD, H.; PEIROVI, H.; JORJANI, M.; AHMADIANI, A.; GHANAVI, J.; SEIFALIAN, A. M. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **European Cells & Materials**, v. 15, p. 88–99, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18446690>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

NONAKA, P. N.; CAMPILLO, N.; URIARTE, J. J.; GARRETA, E.; MELO, E.; DE OLIVEIRA, L. V. F.; NAVAJAS, D.; FARRÉ, R. Effects of freezing/thawing on the mechanical properties of decellularized lungs. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 102, n. 2, p. 413–9, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23533110>>. Acesso em: 7 out. 2015.

OLIVEIRA, A. C.; GARZÓN, I.; IONESCU, A. M.; CARRIEL, V.; CARDONA, J. de la C.; GONZÁLEZ-ANDRADES, M.; PÉREZ, M. del M.; ALAMINOS, M.; CAMPOS, A. Evaluation of Small Intestine Grafts Decellularization Methods for Corneal Tissue Engineering. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66538, 14 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3682956&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 out. 2015.

PAN, M. X.; HU, P. Y.; CHENG, Y.; CAI, L. Q.; RAO, X. H.; WANG, Y.; GAO, Y. An efficient method for decellularization of the rat liver. **Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi**, v. 113, n. 10, p. 680–7, out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849456>>. Acesso em: 1 set. 2015.

PELLEGATA, A. F.; ASNAGHI, M. A.; STEFANI, I.; MAESTRONI, A.; MAESTRONI, S.; DOMINIONI, T.; ZONTA, S.; ZERBINI, G.; MANTERO, S. Detergent-enzymatic decellularization of swine blood vessels: insight on mechanical properties for vascular tissue engineering. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 918753, jan. 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3705825&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 out. 2015.

PETERSEN, T. H.; CALLE, E. A.; COLEHOUR, M. B.; NIKLASON, L. E. Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds. **Cells, Tissues, Organs**, v. 195, n. 3, p. 222–31, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3696368&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 out. 2015.

PRIVÉ, G. G. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 41, n. 4, p. 388–97, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202307000102>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

ROA, I.; SMOK S, C.; PRIETO G, R. Placenta: Anatomía e Histología Comparada. **International Journal of Morphology**, v. 30, n. 4, p. 1490–1496, dez. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022012000400036&lng=es&nrm=iso&tlng=es>. Acesso em: 23 out. 2015.

SANTOSO, E. G.; YOSHIDA, K.; HIROTA, Y.; AIZAWA, M.; YOSHINO, O.; KISHIDA, A.; OSUGA, Y.; SAITO, S.; USHIDA, T.; FURUKAWA, K. S. Application of detergents or high hydrostatic pressure as decellularization processes in uterine tissues and their subsequent effects on in vivo uterine regeneration in murine models. **PloS One**, v. 9, n. 7, p. e103201, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4109986&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16 out. 2015.

SCHNEIDER, K. H.; AIGNER, P.; HOLNTHONER, W.; MONFORTE, X.; NÜRNBERGER, S.; RÜNZLER, D.; REDL, H.; TEUSCHL, A. H. Decellularized human placenta chorion matrix as a favorable source of small-diameter vascular grafts. **Acta Biomaterialia**, 30 set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26432442>>. Acesso em: 8 out. 2015.

SEDDON, A. M.; CURNOW, P.; BOOTH, P. J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1666, n. 1-2, p. 105–17, 3 nov. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273604001610>>. Acesso em: 12 jul. 2014.

SOUSA, S. M. G.; SILVA, T. L. Demineralization effect of EDTA, EGTA, CDTA and citric acid on root dentin: a comparative study. **Brazilian Oral Research**, v. 19, n. 3, p. 188–192, set. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242005000300006&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 15 jan. 2016.

SYED, O.; WALTERS, N. J.; DAY, R. M.; KIM, H.-W.; KNOWLES, J. C. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 12, p. 5043–54, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25173840>>. Acesso em: 1 set. 2015.

TABUCHI, M.; NEGISHI, J.; YAMASHITA, A.; HIGAMI, T.; KISHIDA, A.; FUNAMOTO, S. Effect of decellularized tissue powders on a rat model of acute myocardial infarction. **Materials Science and Engineering: C**, v. 56, p. 494–500, 1 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26249619>>. Acesso em: 8 out. 2015.

TOTONELLI, G.; MAGHSOUDLOU, P.; GEORGIADES, F.; GARRIBOLI, M.; KOSHY, K.; TURMAINE, M.; ASHWORTH, M.; SEBIRE, N. J.; PIERRO, A.; EATON, S.; DE COPPI, P. Detergent enzymatic treatment for the development of a natural acellular matrix for oesophageal regeneration. **Pediatric Surgery International**, v. 29, n. 1, p. 87–95, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23124129>>. Acesso em: 7 out. 2015.

TSUCHIYA, T.; BALESTRINI, J. L.; MENDEZ, J.; CALLE, E. A.; ZHAO, L.; NIKLASON, L. E. Influence of pH on extracellular matrix preservation during lung decellularization. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 20, n. 12, p. 1028–36, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735501>>. Acesso em: 23 out. 2015.

WRONA, E. A.; PENG, R.; BORN, H.; AMIN, M. R.; BRANSKI, R. C.; FREYTES, D. O. Derivation and characterization of porcine vocal fold extracellular matrix scaffold. **The Laryngoscope**, 15 set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26371887>>. Acesso em: 23 out. 2015.

XIANG, J.-X.; ZHENG, X.-L.; GAO, R.; WU, W.-Q.; ZHU, X.-L.; LI, J.-H.; LV, Y. Liver regeneration using decellularized splenic scaffold: a novel approach in tissue engineering. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International: HBPD INT**, v. 14, n. 5, p. 502–8, out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26459726>>. Acesso em: 23 out. 2015.

XU, H.; XU, B.; YANG, Q.; LI, X.; MA, X.; XIA, Q.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; WU, Y.; ZHANG, Y. Comparison of Decellularization Protocols for Preparing a Decellularized Porcine Annulus Fibrosus Scaffold. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86723, 24 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3901704&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 out. 2015.

YOERUEK, E.; BAYYOUNG, T.; MAURUS, C.; HOFMANN, J.; SPITZER, M. S.; BARTZ-SCHMIDT, K.-U.; SZURMAN, P. Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model. **Acta Ophthalmologica**, v. 90, n. 3, p. e206–10, maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22136520>>. Acesso em: 23 out. 2015.

ZHENG, M. H.; CHEN, J.; KIRILAK, Y.; WILLERS, C.; XU, J.; WOOD, D. Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v. 73, n. 1, p. 61–7, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15736287>>. Acesso em: 17 jul. 2015.

ZHENG, X.-L.; XIANG, J.-X.; WU, W.-Q.; WANG, B.; LIU, W.-Y.; GAO, R.; DONG, D.-H.; LV, Y. Using a decellularized splenic matrix as a 3D scaffold for hepatocyte cultivation in vitro: a preliminary trial. **Biomedical Materials (Bristol, England)**, v. 10, n. 4, p. 045023, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26290516>>. Acesso em: 21 ago. 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A - PROTOCOLO DE DESIDRATAÇÃO DA PLACENTAS

Reagentes	Tempo
Álcool 70%	Overnight
Álcool 80%	30 minutos
Álcool 90%	30 minutos
Álcool 95%	30 minutos
Álcool 100%	30 minutos
Álcool 100%	30 minutos
Xilol I	30 minutos
Xilol II	30 minutos
Parafina	2 horas
Inclusão em parafina	

APÊNDICE B – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA (HE)

Reagentes	Tempo
Xilol I	15 minutos
Xilol II	15 minutos
Álcool 100%	3 minutos
Álcool 100%	3 minutos
Álcool 95%	3 minutos
Álcool 70%	3 minutos
Água corrente	5 minutos
Hematoxilina	5 minutos
Água corrente	1 banho
Álcool 95%	1 banho
Álcool 100%	2 banhos
Álcool 100%	2 banhos
Xilol-álcool	1 minuto
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Montagem das lâminas com Permunt	

APÊNDICE C – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DE TRICRÔMIO DE MASSON

Reagentes	Tempo
Xilol I	15 minutos
Xilol II	15 minutos
Álcool 100%	3 minutos
Álcool 90%	3 minutos
Álcool 70%	3 minutos
Água corrente	4 minutos
Hematoxilina	4 minutos
Água corrente	3 minutos
Solução A*	10 minutos
Água corrente	3 banhos
Solução B**	15 minutos
Água corrente	2 banhos
Solução C***	15 minutos
Água corrente	3 banhos
Ácido acético	5 minutos
Água corrente	3 banhos
Álcool 70%	1 banho
Álcool 90%	1 banho
Álcool 100%	3 banhos
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Montagem das lâminas com Permount	

* Solução A : 1g de Fucsina Ácida + 1 ml de Ácido Acético + 100ml de água destilada

** Solução B : 1g de Ácido Fosfomolibdico + 100ml de água destilada

*** Solução C : 2,5g de azul de anilina + 2,5ml de Ácido Acético + 100ml de água destilada.

APÊNDICE D – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DE PICROSIRIUS

Reagentes	Tempo
Xilol I	20 minutos
Xilol II	20 minutos
Álcool 100%	2 minutos
Álcool 100%	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 85%	2 minutos
Álcool 70%	2 minutos
Solução de Picrosirius	20 minutos
Água corrente	2 banhos
Álcool 70%	1 minuto
Álcool 85%	1 minuto
Álcool 95%	1 minuto
Álcool 100%	1 minuto
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Montagem das lâminas com Permunt e análise em luz polarizada	

APÊNDICE E – PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Reagentes	Tempo
Lavagem com água destilada em ultrassom	24 minutos
Álcool 70%	<i>Overnight</i>
Álcool 80%	5 minutos
Álcool 80%	5 minutos
Álcool 90%	5 minutos
Álcool 90%	5 minutos
Álcool 100%	10 minutos
Álcool 100%	10 minutos
Álcool 100%	10 minutos
Ponto Crítico	
Metalização	
Leitura	

APÊNDICE F – PROTOCOLO PARA TÉCNICA DE IMUNOFLUORÊSCENCIA

Reagentes	Tempo
Secagem das lâminas em temperatura ambiente	1 hora
Fixação com acetona fria dentro da geladeira	10 minutos
Secagem em temperatura ambiente	20 minutos
Bloqueio de ligação inespecífica com TBS* + BSA 2%	1 hora
Incubação com anticorpo primário dentro da geladeira	<i>Overnight</i>
Lavagem com TBS + BSA 0,2% em temperatura ambiente	5 minutos
Lavagem com TBS + BSA 0,2% em temperatura ambiente	5 minutos
Lavagem com TBS + BSA 0,2% em temperatura ambiente	5 minutos
Incubação com anticorpo secundário	1 hora
Lavagem com TBS + BSA 0,2%	5 minutos
Lavagem com TBS + BSA 0,2%	5 minutos
Lavagem com TBS + BSA 0,2%	5 minutos
Incubação com DAPI (1:10.000)	10 minutos
Lavagem com TBS 1x em temperatura ambiente	5 minutos
Lavagem com TBS 1x em temperatura ambiente	5 minutos
Lavagem com TBS 1x em temperatura ambiente	5 minutos
Montagem das lâminas com Glicerol diluído em PBS 1x (1:1) vedadas com esmalte	

* TBS 1x = 8g de NaCl + 0,2g de KCl + 3g de TRIS diluído em 1 litro de água destilada. Ajustar o pH para 7,8.