ANA LÍDIA JACINTHO DELGADO

Descelularização de coração suíno: caracterização e quantificação
estereológica da matriz extracelular do ventrículo esquerdo

São Paulo
2020

ANA LÍDIA JACINTHO DELGADO

Descelularização de coração suíno: caracterização e quantificação
estereológica da matriz extracelular do ventrículo esquerdo

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

Orientador:

Prof. Dr. Maria Angelica Miglino

São Paulo

2020

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. 3920 FMVZ	<p>Delgado, Ana Lídia Jacintho</p> <p>Descelularização de coração suíno: caracterização e quantificação estereológica da matriz extracelular do ventrículo esquerdo / Ana Lídia Jacintho Delgado. – 2020. 77 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.</p> <p>1. <i>Scaffold</i>. 2. Descelularização. 3. Matriz extracelular. I. Título.</p>
-----------------	--

Certificado da Comissão de Ética (obrigatório)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Descelularização de coração suíno", protocolada sob o CEUA nº 1166080618 (00 005398), sob a responsabilidade de **Maria Angélica Miglino e equipe; Ana Lídia Jacintho Delgado** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2018.

We certify that the proposal "Decellularization of swine heart", utilizing 10 Swines (males and females), protocol number CEUA 1166080618 (00 005398), under the responsibility of **Maria Angélica Miglino and team; Ana Lídia Jacintho Delgado** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2018** a **02/2020**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Suínos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **8 a 10 meses**

N: **10**

Linhagem: **SRD**

Peso: **120 a 160 kg**

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados na Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 01 de abril de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: DELGADO, Ana Lúcia Jacintho

Título: **Descelularização de coração suíno:** caracterização e quantificação estereológica da matriz extracelular do ventrículo esquerdo

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: _____

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado ao meu avô Mário Jacintho (in memoriam) e a minha avó Aparecida Manzano Sanches Jacintho, por sempre acreditarem em mim e nunca me abandonado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família: Rosana Valéria Sanches Jacintho, José Odair Romeiro Delgado e José Eduardo Jacintho Delgado por me apoiarem e me ajudarem a realizar este sonho. Não é fácil estar longe de vocês, mas acredito que esse sacrifício tenha valido a pena. E também ao meu companheiro de vida, Eduardo Lopes Julião, por todo carinho e atenção em todos os momentos. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que tornou esse projeto (132454/2018-1) possível mesmo em tempos difíceis e aterrorizantes.

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino pela orientação deste trabalho e a todo tempo dedicado para discutir novas ideias.

Agradeço também à Profa. Dra. Celina Almeida Furlanetto Mançanares pela amizade e pelos ensinamentos desde a iniciação científica. Obrigada por acreditar em mim e me apoiar nesta carreira de pesquisadora.

Aos amigos da Pós Graduação: Adriana, João, Andressa, Ana Clara, Ana Carol, Anaelise, Carla, Júlia, Letícia, Luana, Renata, MA e Marisol. Vocês fizeram os meus dias mais felizes, mesmo quando o dia virava noite e depois madrugada e amanhecia de novo. Cada protocolo de imuno se tornava mais leve na companhia de vocês... Obrigada por todo suporte desde sempre: desde às pizzas durante a eterna jornada quanto aos momentos de paz e sabedoria.

Às minhas alunas Anna e Karol que sempre estavam dispostas a aprender e me tornaram uma pessoa melhor. Me orgulho das cientistas que vocês estão se tornando e agradeço por poder ensinar o pouco que sei à vocês.

Às amigas CRUSPIANAS: Adriana, Denise, Babi, Dri, Paty, Vivi e Débora. Vocês ajudaram esse período a ser mais leve. Obrigada por dividirem a casa, o café, o chá, as risadas, os sambas e cervejas. Obrigada por ouvirem meu desabafo, por me acolherem e por terem sido uma família. Obrigada por tudo!

Aos amigos de São Paulo Lara, Felipe e Taís, por cada café e cada desabafo nessa vida corrida. Vocês acreditaram em mim mais do que a mim mesma e não me deixaram desistir.

À Profa. Dra. Taís Sasahara, ao Prof. Durvanei Augusto Maria e Prof Dr José Roberto Kfoury Jr por compartilharem comigo um pouco da vivência e experiência

deste meio acadêmico. Agradeço também a cada colega que passou por mim durante esse período na anatomia, pois tanto direta quanto indiretamente vocês me fizeram ser uma pessoa melhor e a enxerga as situações de todos os ângulos possíveis.

Às minhas eternas professoras (hoje amigas), Eliana e Leilane, que me aconselham desde sempre, e sempre estão dispostas a me ajudar nos desafios da pós e da vida. Obrigada por estarem sempre presente, mesmo com muitos km de distância...

Obrigada a cada pessoa que esteve presente em momentos tão agoniantes e reconfortantes nesse período de intenso aprendizado e perseverança.

“ Trabalhe em silêncio e deixe que o sucesso faça barulho! ”

RESUMO

DELGADO, A. L. J. **Descelularização de coração suíno**: caracterização e quantificação estereológica da matriz extracelular do ventrículo esquerdo. 2020. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

As doenças cardiovasculares são responsáveis pela maior causa de mortes do mundo todo, e em casos como infarto agudo do miocárdio, o tratamento padrão ouro é o transplante do órgão. O número de doadores cresceu no país nos últimos anos, ainda não consegue suprir a demanda. Neste contexto, a medicina regenerativa vem ganhando espaço, mais precisamente na produção de órgãos e tecidos a partir da técnica de descelularização, onde todas as células e fatores imunogênicos são retirados, mantendo apenas a arquitetura tridimensional, formada a partir de matriz extracelular (MEC). A MEC é um microambiente composto principalmente por proteínas estruturais, como por exemplo colágeno e elastina, proteínas de adesão e também os glicosaminoglicanos (GAGs), responsáveis pela substância amorfa. Ela não é responsável apenas pela arquitetura do tecido, mas também é responsável por todo suporte de comunicação, sinalização e estruturação. Embora inúmeros trabalhos venham estudando os componentes da MEC, faz-se necessário quantificá-los para melhor compreensão e sua aplicação. A MEC cardíaca é composta, na sua maioria por colágeno e elastina, elementos que fornecem estrutura mecânica do órgão. Neste trabalho objetivou-se caracterizar corações suínos descelularizados como um scaffold e quantificar estereologicamente, por meio de colorações específicas, como o colágeno e glicosaminoglicano totais, além de avaliar a complacência do órgão. A descelularização foi testada com formas de canulação diferentes, adotando a canulação pela artéria aorta, realizada a perfusão retrógrada em 25 dias, com sódio dodecil sulfato (SDS) a 1%, focando na maior retenção possível da estrutura da MEC. Em relação à sua composição, os corações descelularizados não apresentaram diferenças significativas quanto à complacência e ao valor de colágeno total, enquanto houve a diminuição dos GAGs; Essa diminuição nos corações decelularizados pode ser justificada pelo uso do SDS, já que são moléculas que possuem características higroscópica. Esses resultados reforçam a ideia de que o nosso protocolo de descelularização foi eficiente em relação à retenção das proteínas da MEC.

Palavras-chave: Descelularização. Matriz Extracelular. *Scaffold*.

ABSTRACT

DELGADO, A.L.J. **Decellularization of the porcine heart:** characterization and stereological quantification of the extracellular matrix of the left ventricle. 2020. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Cardiovascular diseases are responsible for the biggest cause of death worldwide, and in cases such as acute myocardial infarction, the gold standard treatment is organ transplantation. The number of donors has grown in the country in recent years, still unable to meet the demand. In this context, regenerative medicine has been gaining space, more precisely in the production of organs and tissues using the decellularization technique, where all cells and immunogenic factors are removed, maintaining only the three-dimensional architecture, formed from extracellular matrix (ECM). MEC is a microenvironment mainly composed of structural proteins, such as collagen and elastin, adhesion proteins and also glycosaminoglycans (GAGs), responsible for the amorphous substance. She is not only responsible for the architecture of the tissue, but is also responsible for all communication, signage and structuring support. Although numerous studies have been studying the components of MEC, it is necessary to quantify them for better understanding and their application. Cardiac ECM is mostly composed of collagen and elastin, elements that provide the organ's mechanical structure. This work aimed to characterize decellularized pig hearts as a scaffold and to quantify stereologically, through specific stains, such as total collagen and glycosaminoglycan, in addition to assessing the organ's compliance. Decellularization was tested with different forms of cannulation, adopting cannulation through the aortic artery, performed a retrograde perfusion in 25 days, with 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), focusing on the greatest possible retention of the ECM structure. Regarding their composition, decellularized hearts did not show significant differences regarding compliance and total collagen value, while there was a decrease in GAGs; This decrease in decellularized hearts can be justified by the use of SDS, since they are molecules that have hygroscopic characteristics. These results reinforce the idea that our decellularization protocol was efficient in relation to the retention of MEC proteins.

Keywords: Decellularization. Extracellular matrix. Scaffold.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura 1 - Diagnóstico topográfico	31
--	----

Artigo 2

Figura 1 - Análise macroscópica	43
Figura 2 - Análise microscópica	44

Artigo 3

Figura 1 - Processo de descelularização	52
Figura 2 - Esquema de amostragem aleatória	53
Figura 3 - Desenho experimental - Complacência	56
Figura 4 - Análise macroscópica	58
Figura 5 - Análise microscópica	58
Figura 6 - Imunohistoquímica	60
Figura 7 - Imunofluorescência	60
Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura	61
Figura 9 - Quantificação de colágeno total	61
Figura 10 - Quantificação de glicosanimoglicanos (GAGs) total	62
Figura 11 - Quantificação de DNA genômico remanescente	63
Figura 12 - Recelularização	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de protocolos de descelularização	41
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
	2.1 ANATOMIA CARDÍACA COMPARADA	16
	2.2 BIOGENHARIA TECIDUAL	16
	2.3 MATRIZ EXTRACELULAR	18
	2.4 <i>SCAFFOLD</i>	19
3	OBJETIVOS	21
	3.1 OBJETIVO GERAL	21
	3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	21
4	ARTIGO 1	22
5	ARTIGO 2	38
6	ARTIGO 3	49
6	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, as doenças cardiovasculares são as que mais causam mortes. De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (Opas), as Doenças Cardiovasculares (DCV), mataram cerca de 17 milhões de pessoas em 2016, as quais foram vítimas de acidentes cardiovasculares isquêmicos (AVI) e acidente vascular encefálico (AVE). Nestes casos o transplante cardíaco parece ser uma saída em potencial para resolver esses problemas, uma vez que essas doenças são diagnosticadas tardiamente, diminuindo a chance de uma melhora baseada no tratamento medicamentoso. No entanto, a demanda de órgãos ainda é baixa quando comparada a procura, limitando o número de pacientes. Sendo assim, surge a bioengenharia tecidual, a qual é uma área de pesquisa voltada à desenvolver e manipular tecidos para o progresso da medicina regenerativa, facilitando a regeneração e reparação dos danos. Ela surgiu como grande alternativa para o transplante de órgãos, já que é possível substituir os tecidos injuriados, recriando tecidos funcionais (KAIGLER; MOONEY, 2001). Carvalho et al., 2010 reuniram informações acerca deste assunto e verificaram que ao longo dos últimos anos têm-se explorado muito essa área, devido à complexidade e variedade de tecidos, subsidiando um grande avanço nesta área com a utilização de biomateriais.

Os biomateriais são capazes de devolver à área que foi lesionada suas atividades biológicas (LEONEL, 2016). Eles podem ser classificados quanto à origem e se são materiais biológicos ou sintéticos (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a; GRANDO MATTUELLA et al., 2007; NEREM, 2007; LOJUDICE; SOGAYAR, 2008) e são elaborados de acordo com a necessidade terapêutica, com o objetivo de desempenhar funções específicas e/ou mimetizar o órgão/tecido a ser reparado. No entanto, essa mimetização pode não ser totalmente fiel quando biomateriais sintéticos são utilizados, já que há certa dificuldade de se reproduzir perfeitamente a nível microscópico a estrutura desse órgão e/ou tecido (LEONEL, 2016; LÜ et al., 2014; XIANG et al., 2015).

Neste contexto, surgiu a descélularização, técnica para qual são retiradas todas as células de um órgão ou tecido, mantendo sua arquitetura tridimensional, com a composição a partir de matriz extracelular (MEC), um dos principais elementos de reestruturação das celular.

Baseado nessas informações, sugere-se o modelo experimental de coração suíno para viabilizar a produção de *scaffolds*, produzindo biomateriais que podem ser capazes de auxiliar a medicina regenerativa, avaliando a composição da MEC quando submetida à diferentes protocolos de descelularização, visto que válvulas suínas (aórtica e mitral) já vem sendo utilizadas largamente no xenotransplante em humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA CARDÍACA COMPARADA

O coração é um órgão conhecido como uma bomba propulsora, sendo ele dividido em quatro cavidades: átrio direito e esquerdo; ventrículo direito e esquerdo. O lado direito recebe todo o sangue que vem do corpo e o bombeia para os pulmões, permitindo que ele seja oxigenado; enquanto o lado esquerdo é responsável por bombear este sangue oxigenado para todo os outros órgãos e partes do corpo. Entre os átrios e ventrículos existe uma estrutura intitulada valva, sendo a valva tricúspide entre o átrio e ventrículo direito e valva bicúspide entre o átrio e ventrículo esquerdo. São essas estruturas responsáveis por evitar o refluxo sanguíneo durante a sístole, mantendo a contração rítmica (GUYTON; HALL, 2006).

Anatomicamente o coração suíno se assemelha muito com o coração humano, apenas apresenta uma exceção quando comparados, por possuir a veia azigus direita, a qual é responsável por drenar o sistema intercostal no seio coronário (SWINDLE; ADAMS, 1988). O sistema coronário é semelhante a 90% da população humana em anatomia e função, não havendo preexistência de vasos colaterais no miocárdio (SARMENTO 2009 apud BLOOR; WHITE; ROTH, 1992). O suplemento sanguíneo do sistema condutor se origina no septo arterial posterior e é predominantemente direito como no homem (GARDNER; JOHNSON, 1988). Outra semelhança anatômica é a presença de uma “*vaso vasorum*”, assim como sua histologia análoga. Esses dados comprovam a similaridade hemodinamicamente entre o suíno e o humano no que diz respeito à função cardíaca (SARMENTO, 2009).

Baseado nessas informações, o estudo do ventrículo esquerdo faz-se necessário devido a sua aplicação clínica, tanto para o tratamento quanto para o diagnóstico de doenças cardíacas, de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2009);

2.2 BIOGENHARIA TECIDUAL

Na primeira reunião da National Science Foundation em 1988 surgiu o termo bioengenharia tecidual, definido, de acordo com Shalak & Fox (1988) como:

“A aplicação dos princípios e métodos da engenharia e ciências da vida na compreensão da relação estrutura-função em condições normais e patológicas dos tecidos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para sua reparação e regeneração”

É uma especialidade multidisciplinar, unindo os princípios das ciências biológicas e das engenharias que está em constante desenvolvimento, pois aplica todo o conhecimento dessas grandes áreas para desenvolver substitutos viáveis que mantenham, melhorem ou restaurem a função tecidual (LANGER; VACANTI, 1993; PAULA et al., 2009).

Neste contexto, a bioengenharia tecidual surgiu como grande alternativa para o transplante de órgãos, já que é possível substituir os tecidos injuriados, recriando tecidos funcionais (KAIGLER; MOONEY, 2001). Carvalho et al., (2010) reuniram informações acerca deste assunto e verificaram que ao longo dos últimos anos têm-se explorado muito essa área, devido à complexidade e variedade de tecidos, subsidiando um grande avanço na área de medicina regenerativa. Sendo assim, é necessário a utilização de biomateriais capazes de devolver à área que foi lesionada suas atividades biológicas (LEONEL, 2016). Eles podem ser classificados quanto à origem e se são materiais biológicos ou sintéticos (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006a; GRANDO MATTUELLA et al., 2007; NEREM, 2007; LOJUDICE; SOGAYAR, 2008).

Sabe-se que os biomateriais são elaborados de acordo com a necessidade terapêutica, com o objetivo de desempenhar funções específicas e/ou mimetizar o órgão/tecido a ser reparado. No entanto, essa mimetização pode não ser totalmente fiel quando biomateriais sintéticos são utilizados, já que há certa dificuldade de se reproduzir perfeitamente a nível microscópico a estrutura desse órgão e/ou tecido (LEONEL, 2016; LÜ et al., 2014; XIANG et al., 2015).

Estes biomateriais têm sido comumente produzidos pela descelularização, já que os materiais acelulares obtidos ainda mantêm características semelhantes ao tecido/órgão original, facilitando a integração

quando implantado in vivo (LEONEL, 2016; BÖER et al., 2011; PELLEGRATA et al., 2013; WRONA et al., 2015).

Os suínos se assemelham morfofisiologicamente aos humanos, sendo uma fonte potencial de órgãos para o xenoenxerto e xenotransplante. Apresentam vantagens por possuírem os órgãos com as dimensões apropriadas para os seres humanos, além de procriarem em cativeiro, pode ser criado em ambientes que diminuem o risco de zoonoses e a doação de órgãos é aceitável do ponto de vista ético e cultural no Brasil (CUNHA, 2018).

2.3 MATRIZ EXTRACELULAR

Sabemos que os tecidos são formados por células, e ao redor delas existe um material produzido por elas mesmas, estabelecendo uma interação e influenciando em suas atividades. Este material forma uma espécie de rede, constituído por mistura complexa de proteínas, moléculas e glicanos que desempenham papéis fundamentais, e é denominado matriz extracelular (MEC). Assim como os tipos teciduais a MEC se difere, havendo uma variação na sua composição e organização, de acordo com a sua localização (ALTEI, 2014).

As principais proteínas que constituem a MEC são as proteínas fibrosas, o colágeno e a elastina. Diferentes tipos de colágenos são conhecidos, de acordo com a sua distribuição e função específica. Geralmente, colágeno e elastina possuem função de resistência a tensão, suporte e elasticidade, assim como relata Almeida e Pires (2014). O colágeno está presente em 90% do peso seco de tecidos e órgãos e é responsável por manter a integridade estrutural dos mesmos (HUSSEY, DZIKI & BADYLAK, 2018); Também há outras macromoléculas que compõem a MEC, as cadeias de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (por exemplo: sulfato de condroitina, heparina e ácido hialurônico), que formam uma espécie de gel onde ficam as proteínas fibrosas. Os proteoglicanos podem ser agrupados em diversas famílias, e todos eles possuem um núcleo repleto de glicosaminoglicanos (tendo uma importante função na sinalização celular, ligados à modulação e proliferação celular). Há também as moléculas de adesão, como as lamininas, fibronectinas e tenascina, que funcionam como moléculas “cola” para reforçar esta rede estrutural. É importante dizer que muitas dessas moléculas possuem mais de uma função,

como por exemplo as estruturais (HUSSEY, DZIKI & BADYLAK, 2018; ALBERTS et al., 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

Podemos chamar a MEC de microambiente celular, formado por vários tipos de macromoléculas, de acordo com Lima (2017), já que a ultraestrutura e a composição da MEC são fatores que influenciam as características das células residentes, sendo uma estrutura muito dinâmica, desde o período de desenvolvimento embrionário, quanto em variações relacionadas a doenças, fornecendo indicações bioquímicas e biofísicas (KEANE; BADYLAK, 2015; BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003). Sendo assim, é importante ressaltar que a MEC não garante apenas a arquitetura do tecido, mas também fornece todo o suporte (comunicação, sinalização e estruturação), assim como descreve Divoux e Clément (2011) e Faulk et al., (2013). Dadas estas características, a MEC representa o material ideal para *scaffold* biológico natural, assim como foi descrito por Keane e Badylak (2015).

A MEC cardíaca é constituída, majoritariamente, de proteínas, como colágeno e elastina, as quais fornecem uma estrutura mecânica para o posicionamento e o funcionamento 3D das células do músculo cardíaco (cardiomiócitos). As propriedades mecânicas da MEC cardíaca podem ser alteradas por lesão ou diminuídas por fatores ambientais e idade. Quando isso ocorre, é necessário reparar cirurgicamente ou substituir o coração danificado. Diversas estratégias têm sido propostas para encontrar alternativas aos transplantes cardíacos humanos (HODGSON et al., 2017).

Dentre essas estratégias, os biomateriais descelularizados vêm sendo estudados para tratar as doenças cardiovasculares, através da utilização do próprio *scaffold* implantado e a injeção de um hidrogel a partir da MEC (UNGERLEIDER et al., 2015).

2.4 SCAFFOLD

A reparação de um órgão ou tecido vêm sendo estudada desde os tempos primórdios, relatado pelo uso de ouro na reconstrução de defeitos cranianos desde 2000 anos antes de Cristo. Tradicionalmente há duas formas de reparo: 1. Enxerto de tecido e transplante de órgãos e 2. Substituição de

material aloplástico ou sintético. Ambas formas possuem limitações, uma vez que o enxerto é restrito, principalmente, pela quantidade limitada de material; e os materiais sintéticos acabam não se integrando tão bem ao hospedeiro, falhando com o tempo. A engenharia de tecidos surgiu para lidar com essas limitações, incluindo diversas abordagens, como transplantar células, genes ou proteínas dentro de um material degradável e poroso, conhecido como *scaffold* (HOLLISTER, 2005).

Um *scaffold* pode ser definido como suporte, arcabouço ou apoio, gerando um microambiente apropriado para as células se desenvolverem semelhantes ao tecido original (BURG et al., 2000; GOMES et al., 2003). Para que este meio seja apropriado, é necessário que contenha MEC, uma vez que fornecem a estrutura adequada, guiando a formação de novos tecidos (GOLDBERG et al., 2003).

Atualmente, os *scaffolds* são produzidos a partir da MEC de várias espécies tanto alogênica quanto xenogênica, sendo que estes são afetados pelo estado do doador. Outro ponto importante é que o local desta fonte também tem uma grande influência sobre as propriedades do material, sendo preciso a adequação do processo de descélularização para que os *scaffolds* se tornem viáveis (KEANE & BADYLAK, 2015).

De acordo com Gilbert, Sellaro e Badylak (2006) a descélularização consiste na remoção eficiente de todo o material celular e nuclear, causando mínimos efeitos adversos na composição, atividade biológica e integridade mecânica na MEC remanescente. Os métodos de descélularização mais comuns utilizam basicamente três tipos de agentes diferentes: físicos, químicos e enzimáticos. Na maioria dos casos, os tratamentos físicos não são suficientes para retirar todas as células do tecido, sendo preciso combinar com um tratamento químico e/ou enzimáticos, que são capazes de romper a membrana plasmática e as ligações inter e extracelulares (OSÓRIO JÚNIOR et al., 2012; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

Os *scaffolds* são utilizados para o cultivo in vitro e posteriormente podem ser implantados no local lesionado, utilizando o próprio organismo para a regeneração in vivo (O'BRIEN, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir *scaffolds* cardíacos para futuras aplicações clínicas.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Estabelecer o processo de descelularização, avaliando diferentes concentrações de detergente;
- ✓ Caracterizar e comparar as estruturas do coração suíno antes e após a descelularização, por meio das colorações de hematoxilina e eosina (HE), Picrossírius red, Métodos de Weigert-Van Gieson, Alcian Blue, Tricromo de Masson e Ferro Coloidal pela microscopia de luz;
- ✓ Identificar proteína específicas de matriz extracelular com os anticorpos anti-colágeno I, anti-laminina subunidade alfa-2, anti-elastina por meio da análise imunohistoquímica;
- ✓ Quantificar colágeno e glicosaminoglicanos totais existentes por meio da análise estereológica;
- ✓ Avaliar a complacência do órgão antes e depois do processo de descelularização;
- ✓ Verificar o DNA geômico remanescente dos corações controles e descelularizados;

4 ARTIGO 1

O CORAÇÃO DE HUMANOS E SUÍNOS DOMÉSTICOS: UMA ABORDAGEM COMPARATIVA E SUAS IMPLICAÇÕES CLÍNICAS – REVISÃO DE LITERATURA

Ana Lídia Jacintho Delgado, Henrique Inhauser Riceti Magalhães, Maurício Oliveira da Silva, Adriana Raquel de Almeida da Anunciação, Marisol Leon Cabrera, Ana Clara Bastos Rodrigues, Maria Angélica Miglino

RESUMO

O modelo suíno está sendo utilizado desde meados de 1980, devido a sua similaridade biológica com a espécie humana, principalmente quando diz respeito ao sistema cardiovascular. A escolha de uma espécie para experimentação científica é muito importante no intuito de proporcionar maior praticidade e veracidade nos resultados. Assim, este modelo é tido como o que melhor se assemelha as situações fisiológicas, cirúrgicas e até mesmo transplantes. Sabendo que as doenças cardiovasculares são responsáveis pelo maior número de mortes ao redor do mundo, o infarto agudo do miocárdio (IAM) é de destaque neste quesito. O IAM ocorre quando uma artéria coronária é obstruída, não levando o oxigênio necessário para o tecido cardíaco, sendo irreversível quando não diagnosticado precocemente. Neste contexto, o modelo suíno é utilizado para que técnicas sejam avaliadas e validadas e futuramente sejam aplicadas em humanos. O objetivo desta revisão é reunir informações acerca da vascularização cardíaca comparada, subsidiando dados para os estudos com infarto agudo do miocárdio.

Palavras-chave: Doenças cardiovasculares, Infarto agudo do miocárdio, Modelo Suíno.

Abstract

The swine model has been in use since the mid 1980s, due to its biological similarity with the human species, especially when it comes to the cardiovascular system. The choice of a species for scientific experimentation is very important in order to provide greater practicality and accuracy in the results. Thus, this model is considered to best resemble physiological, surgical and even transplant situations. Knowing that cardiovascular diseases are responsible for the highest number of deaths worldwide, acute myocardial infarction (AMI) is prominent in this regard. AMI occurs when a coronary artery is occluded and does not carry the necessary oxygen to the heart tissue and is irreversible when not diagnosed early. In this context, the swine model is used for techniques to be evaluated and validated and applied to humans in the future. The aim of this review is to gather information on comparative cardiac vascularization, supporting data for studies with acute myocardial infarction.

Keywords: Acute Myocardial Infarction, Swine Model ,Cardiovascular Diseases

Introdução

Segundo estimativa recente, acredita-se que o número de óbitos humanos por doença arterial coronariana chegue a aproximadamente 40 milhões no ano de 2020, configurando-se, ainda, como a doença de maior mortalidade em nível mundial (ISHITANI et al., 2006). No Brasil, ainda que em constante redução ao longo dos últimos anos (de 120,4/100.000 habitantes em 2000 para 92/100.000 habitantes em 2013), as afecções cardíacas isquêmicas assumiram como a principal causa de morte dentre todas as doenças cardiovasculares possíveis (GUIMARÃES et al., 2015), as quais foram responsáveis por 29,8% dos falecimentos em território nacional no ano de 2013, a principal causa de morte no país (SBC; SBH; SBN, 2016).

Não por menos, a falência cardíaca tem se tornado um dos principais campos da pesquisa científica aplicada (FIELD, et al., 2010), entretanto, a implementação de novas modalidades farmacêuticas e técnicas terapêuticas diretamente em pacientes humanos é considerada antiética e, por vezes, até mesmo improdutiva, uma vez que existe uma grande heterogeneidade genética e diferentes estilos de vida entre os pacientes, por exemplo. Neste sentido, o uso de modelos animais surge como a alternativa mais viável para o preenchimento destas lacunas, especialmente durante os ensaios pré-clínicos (LELOVAS, KOSTOMITSOPOULOS; XANTHOS, 2014).

Para Dixon e Spinale (2009), embora os estudos com pequenos modelos animais, como os roedores, promovam uma compreensão sobre as bases celular e molecular da biologia cardiovascular, o conhecimento sobre os mecanismos e bases biológicas ainda é falho na extrapolação de resultados para humanos. Existem diferenças intrínsecas em termos de frequência cardíaca, consumo de oxigênio, duração do potencial de ação, e reversão espontânea da fibrilação ventricular induzida experimentalmente no ritmo sinusal normal, só para citar algumas (WINFREE, 1994; GREENE; BENSON, 2002; HAGHIGHI et al., 2003; GINIS et al., 2004). Assim, a necessidade de escolha de uma espécie que assemelhe-se com precisão da anatomia e fisiologia cardiovasculares humana é soberana (LELOVAS, KOSTOMITSOPOULOS; XANTHOS, 2014), o que caracteriza, portanto, o suíno doméstico como modelo de eleição para tais experimentos (PLATT et al., 2002; VIDOTTI et al., 2008; PINTO et al., 2016).

A partir da sua utilização dentro de laboratórios, um avanço significativo na produção de conhecimento já foi alcançado, principalmente no que tange à remodelação do ventrículo esquerdo e extensão da área afetada após isquemia

miocárdica (PINTO et al., 2016). Também são relacionadas terapias com transplante de células-tronco (MIN et al., 2012; LI et al., 2013) e uso de fatores de crescimento angiogênicos em pacientes infartados (DIXON; SPINALE, 2009), o que demonstra o seu papel vital, até mesmo, em pesquisas translacionais (SWINDLE et al., 2012).

Desta forma, objetivou-se realizar uma revisão de literatura que aborde comparativamente a anatomia do coração de humanos e suínos domésticos, subsidiando uma compreensão mais profunda sobre a conformação e irrigação deste órgão em ambas as espécies; como o mesmo se comporta durante o infarto agudo do miocárdio; e porque/como os resultados obtidos com suídeos auxiliam na ascensão da medicina moderna.

Considerações gerais sobre a anatomia cardíaca

O período de embriogênese marca o surgimento de duas unidades distintas que são formadas concomitantemente: os órgãos circulatórios e o tecido sanguíneo. Nesta fase, aglomerados de células mesenquimais da camada mais externa, organizadas na parede do saco vitelínico, se comprimem e se difundem morfofuncionalmente como um endotélio, demarcando regiões pelas quais os hemocitoblastos irão preenchendo, flutuando em um plasma fluido (DYCE, 2019).

Disposto no centro do mediastino da cavidade torácica (mais especificamente no mediastino médio ou cardíaco), o coração dos animais domésticos é o órgão muscular central, tetracavitário, que atua como duas bombas combinadas (esquerda e direita) de sucção e pressão, determinando funcionalmente o circuito sanguíneo e linfático por decorrência da diferença de pressão originadas pela sístole e diástole. Sua morfologia varia entre as espécies, porém, há muitos aspectos em comum. As camadas (de interna para externamente) são compostas pelo endocárdio, revestimento endotelial liso; miocárdio, músculo cardíaco; e epicárdio, o qual se une firmemente ao músculo cardíaco através do pericárdio seroso (GETTY, 1975; DYCE, 2019).

Geometricamente, o coração aparenta a forma de um cone irregular, e a sua ancoragem se faz através dos vasos da base; as superfícies atrial e auricular, margens e o ápice permanecem definitivamente francas no saco pericárdico. Tal estrutura é estritamente uma saculação serosa fechada que, ao se fixar no coração, torna-se estritamente invaginada, reduzindo o seu lume a uma mera fenda capilar. A disposição

do órgão é assimétrica, onde o eixo maior (do centro da base ao ápice) fica situado ventrocaudalmente (GETTY, 1975; KÖNIG, 2016; DYCE, 2019).

A base cardíaca (hilo) dirige-se dorsocranialmente, e sua porção mais alta está localizada na conexão dos terços dorsal e mediano do diâmetro dorsoventral da cavidade torácica; nesta região, estão organizados os átrios direito e esquerdo, por onde desembocam as veias cavas cranial e caudal e as veias pulmonares, respectivamente. No antímero direito, a margem cardíaca é extremamente convexa, e se curva em sentido ventrocaudal. Já no antímero esquerdo, a margem é mais curta e praticamente vertical. As superfícies atrial (direita, diafragmática – face atrial) e auricular (esquerda, esternocostal – face auricular) são convexas e pleiteadas por sulcos que indicam a separação do órgão em quatro cavidades: os dois átrios mais cranialmente e distintos entre si pelo septo interatrial, e os dois ventrículos mais caudalmente, também distintos entre si pelo septo interventricular, orientado obliquamente. A região do septo situada dorsalmente às válvulas é designada de atrioventricular. O ápice dispõe-se centralmente, balizando dorsalmente o esterno (GETTY, 1975).

Entre os átrios e os ventrículos, encontra-se o sulco coronário, o qual representa o limite entre as duas câmaras craniais e as duas câmaras caudais. Através de uma circunferência, ele cinge quase que completamente o coração, onde termina, de maneira descontínua, na ascendência do tronco pulmonar, originando os sulcos interventricular paraconal e circunflexo. Nestes sulcos, estão contidos os vasos arterial e venoso que irrigam e perfundem o órgão. O plano lateral do antímero esquerdo denuncia o sulco interventricular paraconal, que externamente margeia e delimita as duas câmaras ventriculares, sendo a direita, cranioventralmente, e a esquerda, caudodorsalmente; ele provém do sulco coronário, caudalmente à origem do tronco pulmonar, descendo paralelamente até a borda caudal. De maneira oposta, o plano lateral do antímero direito aponta o sulco interventricular subsinuoso; ele se ocasiona ao nível do sulco coronário ventral na arrematação da veia cava caudal em direção ao ápice cardíaco (GETTY, 1975).

A irrigação cardíaca

Conforme já apresentado anteriormente, as doenças cardiovasculares caracterizam-se como a principal causa de óbitos em todo o mundo, sendo, as afecções coronárias, a condição mais frequentemente observada (CLAES et al.,

2008). A cada caso específico, o conhecimento anatômico da circulação coronariana é essencial para que se estabeleça a região do tecido afetado, o prognóstico esperado e a terapêutica mais adequada (STANDRING, 2010), seja durante a realização de procedimentos imagiológicos, intervenções hemodinâmicas e/ou procedimentos cirúrgicos (CAVALCANTI et al., 1995).

Segundo Borelli (2014), a vascularização cardíaca pode ser segmentada em um sistema coronariano esquerdo e um sistema coronariano direito, que tendem a se encontrar em suas extremidades definindo um círculo longitudinal (em animais não humanos; transversal em humanos) que contorna a base do coração através do sulco coronário; e/ou definindo um círculo transversal (em animais não humanos; sagital em humanos) que converge para a região do ápice do coração através dos sulcos interventriculares paraconal e subsinuoso (anterior e posterior em humanos). Desta forma, destes dois “círculos” partem todas as artérias direcionadas ao órgão; o primeiro cedendo ramos ascendentes atriais e descendentes ventriculares; e o segundo cedendo apenas ramos ventriculares aos variados segmentos miocárdicos (BORELLI, 2014).

As duas artérias coronárias, uma esquerda e uma direita, originam-se diretamente da base da artéria aorta (GETTY, 1986; BATISTA; PORTO; MOLINA, 2011) a partir, respectivamente, dos óstios coronários esquerdo e direito (NETTER, 2008; STANDRING, 2010; MOORE; DALLEY; AGUR, 2011; GÓMEZ; BALLESTEROS, 2013; GÓMEZ; BALLESTEROS, 2014; KÖNIG; LIEBICH, 2016). O sangue à aqui direcionado, aproximadamente 10% do volume total em sístole ventricular esquerda (SHUMMER et al., 1981), é proveniente de um refluxo aórtico que não retorna ao órgão visto o fechamento da valva aórtica e, portanto, é direcionado à nutrição do tecido cardíaco (HURST et al., 1981).

A artéria coronária esquerda, após se estender pelo espaço definido entre a artéria tronco pulmonar e a aurícula esquerda, chega ao sulco coronário para, em humanos (SPALTEHOLZ; SPANNER, 2006; STANDRING, 2010; MOORE; DALLEY; AGUR, 2011), bifurcar-se no ramo interventricular anterior e na artéria circunflexa esquerda em 54,7% (BAPTISTA et al., 1991), 59,58% (BATISTA; PORTO; MOLINA, 2011) 61,3% (FALCI JÚNIOR; CABRAL; PRATES, 1993) ou 92% (ABUCHAIM et al., 2009) dos casos. Respectivamente, tais estruturas posicionam-se no sulco interventricular anterior em sentido ao ápice e região posterior do coração; e no sulco coronário até a face diafragmática deste mesmo órgão (MOORE; DALLEY; AGUR,

2011), irrigando a maior parte do ventrículo esquerdo e, mesmo que discretamente, o ventrículo direito (WILLIAMS et al., 1995).

Um segundo padrão de distribuição da artéria coronária esquerda consiste da trifurcação da mesma, dando-se origem aos ramos intermédio e interventricular anterior, e à artéria circunflexa esquerda, já sendo relatado nas proporções de 8% (ABUCHAIM et al., 2009), 36,18% (BATISTA; PORTO; MOLINA, 2011), 38,7% (FALCI JÚNIOR; CABRAL; PRATES, 1993) e 45,3% dos humanos estudados (BAPTISTA et al., 1991). Esta variação parece desempenhar um papel de irrigação suplementar em casos de obliteração vascular (PAULA, 1972).

No suíno doméstico, estas duas conformações de distribuição arterial também estão presentes, porém, nas proporções de 79% [raças Landrace e Large White] (JORDÃO et al., 1999), 79% [raças Pietrain, Landrace Belga e grandes raças mistas] (GÓMEZ; BALLESTEROS, 2014) e 80% [raça Landrace] (MOURA JÚNIOR et al., 2008) para a bifurcação em artéria circunflexa esquerda [percorrendo o sulco coronário] e ramo interventricular paraconal da artéria coronária esquerda [percorrendo o sulco de mesmo nome]; e 20% (JORDÃO et al., 1999), 20% (MOURA JÚNIOR et al., 2008) e 21% (GÓMEZ; BALLESTEROS, 2014) para a trifurcação em artéria circunflexa esquerda e ramos diagonal e interventricular paraconal.

Digno de nota é a indefinição quanto ao nome utilizado para a terceira ramificação proveniente da trifurcação da artéria coronária esquerda, hora tratada como intermédio em humanos (BAPTISTA et al., 1991; FALCI JÚNIOR; CABRAL; PRATES, 1993; ABUCHAIM et al., 2009; BATISTA; PORTO; MOLINA, 2011), hora tratado como diagonal em suínos (JORDÃO et al., 1999; MOURA JÚNIOR et al., 2008; GÓMEZ; BALLESTEROS, 2014). Mais recentemente, Borges et al. (2019) utilizaram a denominação de ramo oblíquo em um estudo envolvendo Javalis, de forma inédita, é o único que se apoia inteiramente nos termos indicativos de posição e direção para a nomeação da referida estrutura.

Já no que tange à artéria coronária direita, em humanos, ela segue a partir de sua origem em sentido anterior à direita, emitindo ramos à área entre a aurícula direita e artéria tronco pulmonar. Em seguida, ela percorre o sulco coronário e emite os ramos marginal direito (MOORE; DALLEY; AGUR, 2011) e para o cone arterioso, finalizando, em cerca de 72% (ABUCHAIM et al., 2009) ou 75% dos casos, na condição de ramo interventricular posterior (WILLIAMS et al., 1995), repousado no sulco de mesmo nome (MOORE; DALLEY; AGUR, 2011).

Em suínos domésticos, a artéria coronária direita também percorreu o sulco coronário e sempre foi responsável por emitir o seu ramo marginal (MOURA JÚNIOR et al., 2008). Também em 100% dos casos (MOURA JÚNIOR et al., 2008; SAHNI et al., 2008; GÓMEZ; BALLESTEROS, 2013), ou em 96,7% (VIEIRA et al., 2008), esta artéria deu origem ao ramo interventricular subsinuoso, que também percorre o sulco de mesmo nome e irriga os ventrículos direito e esquerdo, porém a partir de sua face direita (MOURA JÚNIOR et al., 2008; GÓMEZ; BALLESTEROS, 2013).

Dominância coronariana

O estudo de Schlesinger (1940) criou o conceito de dominância coronariana, determinando se esta será direita ou esquerda, dependendo de qual das artérias coronárias irá fornecer o ramo que atinja e ultrapasse a *Crux cordis*. Para a espécie humana, Zoll (1951) descreveu em seu estudo coronariográfico que, essas dominâncias são descritas nas mesmas proporções para o ramo do cone dos casos com origem direta da aorta. Notou-se também que os suínos possuíam a mesma similaridade, uma vez que não há o desenvolvimento de anastomoses coronarianas na maioria dos casos.

Didio e Wakefield (1975) descreveram que a dominância direita foi observada em 73.5%, a balanceada em 7.1 % e esquerda em 19.4%. FALCI JÚNIOR e PRATES (1994) atribuíram que no caso de uma artéria interventricular anterior extrapolar o ápice cardíaco, emitindo os ramos septais posteriores, mesmo com o ramo interventricular posterior procedente da coronária direita, a dominância deveria ser classificada como esquerda.

Em 1995, Kyriakidis e colaboradores expuseram que as diferenças anatômicas entre homens e mulheres é de suma importância no que diz respeito ao controle e evolução de doenças coronarianas nos pacientes mensurados.

Observando alguns pacientes nos quais a artéria coronária direita apresentava uma maior distribuição, Nerantzis e colaboradores (1996) recomendaram o termo de verdadeira dominância direita para os corações que apresentassem um ramo interventricular posterior e outro marginal no ventrículo esquerdo. Nestes casos, um infarto da artéria coronária direita causaria uma isquemia da parede póstero-lateral e insuficiência mitral. Esta forma havia sido observada em 38% dos corações estudados. Tais resultados somaram com os encontrados por Adams e Treasure (1985), os quais relataram a dominância direita em 90% dos casos, citando que o

ramo interventricular posterior tem sua origem antes da *Crux cordis* em 32% dos casos, seguindo posteriormente o trajeto no sulco interventricular posterior. Ambos autores atribuíram que esta forma deveria ser reconhecida para se ter um melhor resultado no tratamento cirúrgico.

Com relação ao método de avaliação de perfusão do tecido cardíaco, Vasko, Gutelius e Sabiston (1961) descreveram uma maior incidência de dominância esquerda. Quando avaliados pela arteriografia, 48% apresentaram dominância direita, enquanto que esquerda e balanceada foram iguais. Mandarin (1990) também descreve que a massa cardíaca irrigada pela coronária esquerda era maior. Weaver e colaboradores (1986) estudaram corações suínos e consideraram a circulação e distribuição dos ramos superponível à humana, considerando o suíno como melhor modelo experimental para os estudos condizentes a circulação coronariana, com dominância esquerda.

Didio e Rodrigues (1983) preconizaram segmentos anátomos-cirúrgicos, de acordo com a distribuição dos principais ramos, apresentando 3 segmentos da porção direita do coração, sendo eles: cone, marginal direito e interventricular posterior; e 4 segmentos da porção esquerda: interventricular anterior, lateral, marginal esquerdo e ventricular posterior. Esta segmentação cardíaca é de suma importância para delimitar a área de ressecção de ventrículos esquerdo em cirurgias de ventriculectomia parcial visando o tratamento de miocardiopatia dilatada, onde a ligação do ramo marginal e suas veias satélites causariam uma área de isquemia, indicando o local da ressecção (DIDIO et al., 1998).

Quando considerados os suínos domésticos, Sahni et al. (2008), Moura Júnior et al. (2008) e Gómez e Ballesteros (2015) reportaram que a dominância direita foi observada em todos os exemplares estudados. Além desta, com uma porcentagem de 96,7%, Vieira et al. (2008) citam ainda uma dominância balanceada em 3,3% espécimes, e Weaver et al. (1986) relatam 17% e 5% de casos com dominância balanceada e do tipo esquerda, respectivamente, em 75 corações. Também já foram reportadas dominâncias subtipadas em suínos Duroc, Landrace e Mongrel, sendo a forma balanceada a mais frequente [42,2%], porém, com valores muito próximos ao tipo direito [40%] (PINTO et al., 2016).

Infarto Agudo do Miocárdio

A irrigação sanguínea do coração em humanos é estabelecida por três artérias principais: descendente anterior (DA), coronária direita (CD) e circunflexa (CX) (GORDELS et al. 2008, apud FERREIRA et al., 2016). O IAM ocorre quando o fluxo sanguíneo coronariano é diminuído, conforme citado anteriormente. Para entender melhor sobre o IAM e seu diagnóstico, Mansur e colaboradores (2006) explicaram como o eletrocardiograma (ECG) é efetuado, medindo os impulsos elétricos do coração, permitindo a identificação de possíveis cardiopatias. A análise correta deste exame é de suma importância para identificar o local de IAM, como relatado por (PESARO, SERRANO JUNIOR e NICOLAU, 2004).

Para análise topográfica das manifestações isquêmicas do ECG, utilizando as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2016):

- a) Parede anterosseptal – derivações V1, V2 e V3.
- b) Parede anterior – derivações V1, V2, V3 e V4.
- c) Parede anterior localizada – derivações V3, V4 ou V3-V5.
- d) Parede anterolateral – derivações V4 a V5, V6, D1 e a VL.
- e) Parede anterior extensa – V1 a V6, D1 e a VL.
- f) Parede lateral baixa – derivações V5 e V6.
- g) Parede lateral alta – D1 e a VL.
- h) Parede inferior – D2, D3 e a VF.

Essas variações topográficas são melhores visualizadas na Figura 1.

Figura 1: Diagnóstico topográfico (FIGUINHA, 2014).

No ECG, o infarto inferior é caracterizado se o supradesnivelamento do segmento ST em D3 for maior que em D2 e houver infradesnivelamento em D1 e aVL maior do que 1 mm, evidenciando alguma lesão na coronária direita.

Quando há a associação com supradesnivelamento de V4R, é possível dizer que o ventrículo direito está envolvido no IAM. A artéria CX é envolvida quando houver supradesnivelamento em D1, aVL, V5,V6 e infra em V1,V2 e V3. O infarto anterior com supradesnivelamento em V1, V2 e V3, se o supradesnivelamento for maior que 2,5 mm em V1. Se houver infradesnivelamento associado em D2 e D3 a maior probabilidade é em uma lesão proximal da DA (PESARO, SERRANO JUNIOR e NICOLAU, 2004).

Embora este exame seja de baixo custo e fácil acesso, ele pode ser realizado tardiamente, não havendo nenhum tipo de intervenção farmacológica e cirúrgica efetiva, uma vez que o coração possui uma capacidade pequena de se reparar e regenerar (CUI, YANG & LI, 2016). Apesar das taxas de sobrevivência em pessoas afetadas pelo IAM estar aumentando devido à melhora dos cuidados da saúde, a verdadeira recuperação depende da restauração do fluxo sanguíneo e da função cardíaca.

Considerações Finais

Todas as informações acerca do modelo suíno colaboram para o entendimento que, de fato, este ainda é um modelo atual, sendo de suma importância para o melhor entendimento do IAM e suas implicações terapêuticas. Os estudos relacionados a vascularização cardíaca comparada se fez necessário para nossa abordagem, tendo em vista que o IAM ainda é uma doença que deve ser diagnosticada previamente para seguir com os tratamentos.

Referências

ABUCHAIM, D. S. C. et al. Dominância coronariana em corações humanos em moldes por corrosão.

ADAMS, J.; TREASURE, T. Variable anatomy fo the right coronary artery supply to the left ventricle. *Thorax*. V. 40, n. 8, p. 618 - 620. 1985..

ANDRADE, J. M. (2006). Anatomia coronária com angiografia por tomografia computadorizada multicorte. *Radiologia Brasileira*, 39(3), 233-36.

BAPTISTA C.A.C.S. 1986. Distribuição dos ramos das artérias coronárias na superfície ventricular do coração humano. Tese de Mestrado, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo. 193p.

BAPTISTA, C. A.; DIDIO, L. J.; PRATES, J. C. Types of division of the left coronary artery and the

BATISTA, A. V. S.; PORTO, E. A.; MOLINA, G. P. Estudo da anatomia da artéria coronária esquerda e suas variações: perspectivas de nova classificação. *Revista Saúde & Ciência*, v. 2, n. 1, 1-11, 2011.

BORELLI, V. Contribuição ao estudo da vascularização arterial do coração de gatos (*Felis domestica* – Línnaeus 1758). *Journal of the Health Sciences Institute*, v. 32, n. 3, p. 299-303, 2014.

BORGES, T. R. J.; RIBEIRO, L. A.; ROMÃO, F. B.; MAGALHÃES, H. I. R.; LUZ, M. M.; BARCELOS, J. B.; SANTOS, L. A.; SILVA, F. O. C. Origin and distribution of the coronary arteries of boars. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine and Animal Sciences*, v. 55, n. 4, p. 1-9, 2019.

CAVALCANTI, J. S.; DE LUCENA OLIVEIRA, M.; PAIS E MELO, A. V. JR.; BALABAN, G.; DE ANDRADE OLIVEIRA, C. L.; DE LUCENA OLIVEIRA, E. Anatomic variations of the coronary arteries. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 65, n. 6, p. 489-481, 1995.

CLAES, E.; GARCÍA HERRERA, C. M.; GUINEA TORTUERO, G. V.; BERNAL MARCOS, J. M.; REVUELTA SOBA, J. M.; ELICES CALAFAT, M. Análisis mecánico de un bypas coronario termino-terminal. *An. Mec. Fract*, v. 25, n. 2, p. 11-16, 2008

CUI, Zhi; YANG, Baofeng; LI, Ren-Ke - Application of Biomaterials in Cardiac Repair and Regeneration. *Engineering*. . ISSN 20958099. 2:1 (2016) 141–148.

DIDIO, L. J. A.; JATENE, F. B.; ASSAD, R. S.; CHAGAS, A. C. P.; MONTEIRO, R.; FREITAS, R. R.; ABDUCH, M. C. D.; JATENE, A. D. Anatomical surgical segmentectomy of the left ventricle for systematized partial resection of the heart: an experimental study. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc*. V. 13, n. 4, p. 368-374. 1998.

DIDIO, L. J. A.; WAKEFIELD, T. W. Coronary arterial predominance or balanceon the Surface of Human Cardiac Ventricles. *Anat. Anz. Bd*. V. 137, n.1, p. 147-158, 1975.

DIDIO, L. J.A.; RODRIGUES, H. Cardiac segments in the human heart. *Anat.Clin.* V. 5, n. 1, p. 115-124, 1983.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Análise e Emissão de Laudos Eletrocardiográficos. *Arq Bras Cardiol* 2016; 93 (3 supl.2) 1-19

DIXON J.A.; SPINALE F.G. Large Animal Models of Heart Failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice. *Circ. Heart Fail.* v, 2, n. 3, p. 262-271, 2009.

FALCI JÚNIOR, R.; CABRAL, R. H.; PRATES, N.E.V. B. Anatomia das artérias coronárias. *Rev. med.*, 1993; 72(1/4): 21-4.

FALCI, R. J.; PRATES, N. E. V. Anatomia das artérias coronárias. *Rev. Med.* V.72, n. 1, p. 21 -24, 1994.

FALCI, R. J.; PRATES, N. E. V. Anatomia das artérias coronárias. *Rev. Med.* V.72, n. 1, p. 21 -24, 1994.

FERREIRA, Ana Rita Pereira Alves; SILVA, Manuel Vaz da; MACIEL, Julia. Eletrocardiograma no Infarto Agudo do Miocárdio: O que Esperar?. *Int. j.cardiovasc. sci.(Impr.)*, v. 29, n. 3, p. f: 198-l: 209, 2016..

FIELD JM, HAZINSKI MF, SAYRE MR, CHAMEIDES L, SCHEXNAYDER SM, HEMPHILL R, SAMSON RA, KATTWINKEL J, BERG RA, BHANJI F, CAVE DM, JAUCH EC, KUDENCHUK PJ, NEUMAR RW, PEBERDY MA, PERLMAN JM, SINZ E, TRAVERS AH, BERG MD, BILLI JE, EIGEL B, HICKEY RW, KLEINMAN ME, LINK MS, MORRISON LJ, O'CONNOR RE, SHUSTER M, CALLAWAY CW, CUCCHIARA B, FERGUSON JD, REA TD, VANDEN HOEK TL. Part 1. Executive summary: American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 122:S640–S656, 2010.

FIGUINHA, F. Áreas eletricamente inativas. Disponível em: <https://cardiopapers.com.br/curso-basico-de-eletrocardiograma-parte-12-areas-inativas/> acesso em dezembro de 2018.

GETTY, R. Sisson/Grossman. Anatomia dos animais domésticos, 5ª edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1986, 2000p.

GINIS I, LUO Y, MIURA T, THIES S, BRANDENBERGER R, GERECHT-NIR S, AMIT M, HOKE A, CARPENTER MK, ITSKOVITZ-ELDOR J, RAO MS. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 269:360–380, 2004.

GÓMEZ, F.A.; BALLESTEROS, L.E. Anatomic Study of the Right Coronary Artery in Pigs. Feature Review in Comparison with the Human Artery. *International Journal of Morphology*, v. 31, n. 4, 2013.

GÓMEZ, F.A.; BALLESTEROS, L.E. Evaluation of coronary dominance in pigs; a comparative study with findings in human hearts. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2015; 67(3): 783-789.

GÓMEZ, F.A.; BALLESTEROS, L.E. Morphologic expression of the left coronary artery in pigs. An approach in relation to human heart. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, v. 29, n. 2, p. 214-220, 2014.

GORGELS AP, ENGELEN DJ, WELLENS HJ. The Electrocardiogram in acute myocardial infarction. In: Fuster V, O'Rourke A, Walsh RA, Poole-Wilson P. *Hurst's - the heart*. 12th ed. New York: The McGraw-Hill Companies; 2008. p.1351-60.

GREENE SA, BENSON GJ. 2002. Porcine anesthesia, p 273–274. In: Greene SA, editor. *Veterinary anesthesia and pain management secrets*. Philadelphia (PA): Hanley and Belfus ramus diagonalis of the human heart. *Japanese Heart Journal*, v. 32, n. 3, p. 323-335, 1991.

GUIMARÃES RM, ANDRADE SS, MACHADO EL, BAHIA CA, OLIVEIRA MM, JACQUES FV. Diferenças regionais na transição da mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil, 1980 a 2012. *Rev Panam Salud Publica*. 2015;37(2):83-9

HAGHIGHI K, KOLOKATHIS F, PATER L, LYNCH RA, ASAHI M, GRAMOLINI AO, FAN GC, TSIAPRAS D, HAHN HS, ADAMOPOULOS S, LIGGETT SB, DORN GW, 2ND, MACLENNAN DH, KREMASTINOS DT, KRANIAS EG. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest* 111:869–876, 2003.

HURST, J.W.; LOGUE, R.B.; SCHLANT, R.C.; WENGER, N.K. O coração – artérias e veias. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981. 920p.

ISHITANI LH, FRANCO GC, PERPÉTUO IH, FRANÇA E. Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil. *Rev Saude Publica*. 2006;40(4):684-91.

JORDÃO, M. T.; BERTOLINI, S. M. M. G.; AREAS JÚNIOR, J. H. S.; PRATES, N. E. V. B. Anatomic study of the diagonal arteries in hearts of pigs. *Revista Chilena de Anatomia*, v. 17, n. 1, 1999.

KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. *Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido*, 5ª edição, Editora Artmed, Porto Alegre, 2016, p.464-466.

KYRIAKIDIS, M; PANAGHIOTIS. P.; ANDROULAKIS, A.; ANTONOPOULOS,A.; APOSTOLOPOULOS T.; BARBETSEAS, J.; VYSSOULIS, G; TOUTOUZAS, P. Sex differences in the anatomy of coronary artery disease. *J. Clin. Epidemiol*. V. 48, n. 6, p. 723 - 730.1995.

LELOVAS, P. P., KOSTOMITSOPOULOS, N. G., & XANTHOS, T. T. (2014). A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 53(5), 432-438, 2014.

LI X., ZHANG F., SONG G., GU W.; CHEN M. 2013. Intramyocardial injection of pig pluripotent stem cells improves left ventricular function and perfusion: a study in a porcine model of acute myocardial infarction. PLoS ONE 8(6):e66688.

MATTARAIA, V.G.M.; VIDOTTI, C.A. & DAMY, S.B. Suínos como modelos experimentais. Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Vol. 1 (2012) - Fascículo 4

MIN J.Y., SULLIVAN M.F., YANG Y., ZHANG J.P., CONVERSO K.L., MORGAN J.P.; XIAO Y.F. 2002. Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. Ann. Thoracic. Surg. 74(5):1568-1575.

MOORE KL, DALLEY AF, AGUR AMR. Anatomia orientada para a clínica. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2011

MOURA JUNIOR, P. C. et al . Estudo anatômico das artérias coronárias de suínos Landrace. Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro , v. 28, n. 2, p. 103-107, Feb. 2008 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2008000200002&lng=en&nrm=iso>. Access on 06 Jan. 2019.

MOURA JUNIOR, P.C. et al. Estudo anatômico das artérias coronárias de suínos Landrace. Pesq. Vet. Bras, 2008; 28(2): 103-107.

NERANTZIS, C. E.; PAPACHRISTOS, J. E.; VOUDRIS, V. A.; INFANTIS, G. P.; KORO Xenides, G.T. Functional dominance of the right coronary artery: incidence in the human heart. Clin. Anat. V. 9 n. 10, p. 10-13. 1996

NETTER, F. H. Atlas de Anatomia Humana, Editora Elsevier, 2008, p. 204-212. ORTALE, J. R., MECIANO FILHO, J., PACCOLA, A. M., LEAL, J. G. P. G., & SCARANARI, C. A. (2005). Anatomia dos ramos lateral, diagonal e ântero-superior no ventrículo esquerdo do coração humano. Rev Bras Cir Cardiovasc, 20(2), 149-58.

PAULA, W. Estudo estatístico sobre irrigação coronariana no coração humano em brancos e negros. Folha Clínica Biológica, v. 1, n. 1, p. 18-40, 1972.

PESARO, A. E. P.; SERRANO, C. V.; NICOLAU, J. C. Infarto agudo do miocárdio: síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. Rev Assoc Med Bras, v. 50, n. 2, p. 214-20, 2004.

PINTO, M. G. F. et al. Patterns of arterial vascularization in swine hearts. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 36, n. 5, p. 417-422, 2016.

PLATT J., DISESA V., GAIL D.; MASSICOT-FISHER J. 2002. Recommendations of the National Heart, Lung, and Blood Institute Heart and Lung Xenotransplantation Working Group. Circulation 106:1043. Rev. Bras. Cir. Cardiovasc., 2009; 24(4): 514-518.

SAHNI, D. et al. Anatomy & distribution of coronary arteries in pig in comparison with man. The Indian Journal of Medical Research, 2008; 127(6): 564.

SCHLESSINGER, M. J. Significant variations in the anatomic pattern of the coronary vessels. *Blood Heart Circul.* V. 13, n. 1, p. 93-97, 1940.

SHUMMER, A.; WILKENS, H.; VOLLMERHAUS, B.; HABERMEHL, K. H. *The Circulatory System, the Skin and the Cutaneous Organs of the Domestic Mammals.* Berlin, Verlag Paul Parey, 1981.

Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC); Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH); Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN). 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol.* 2016;107(3 supl. 3):1-83.

SPALTEHOLZ W, SPANNER R. *Anatomia humana: atlas e texto.* São Paulo: Roca; 2006.

STANDRING S. *Gray's Anatomia.* 40a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.

SWINDLE M.M., MAKIN A., HERRON A.J., CLUBB JR F.J.; FRAZIER K.S. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet. Pathol.* 49(2):344-356, 2012.

VASKO, J. S.; GUTELIUS, J.; SABISTON, D. C. A study of predominance of human coronary arteries determined by arteriographic and perfusion technics. *Amer. J. Cardiol.* V. 8, n. 2, p. 379-384. 1961.

VIDOTTI, A. P. et al. Vascularização arterial da região do nó sinoatrial em corações suínos: origem, distribuição e quantificação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 2, p. 113-118, 2008.

VIEIRA, T. H. M.; MOURA JUNIOR, P. C.; VIEIRA, S. R. C.; MOURA P. R.; SILVA, N. C.; WAFAR, G. C.; RUIZ, C. R.; WAFAR, E. Anatomical indicators of dominance between the coronary arteries in swine. *Morphologie*, v. 92, n. 296, p. 3-6, 2008. doi: 10.1016/j.morpho.2008.04.005.

WEAVER, M. E.; PANTELY, G. A.; BRISTON, J. D.; LADLEY, H. D. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovascular Research*, v. 20, n. 12, p. 907-917, 1986. doi: 10.1093/cvr/20.12.907.

WILLIAMS PS, WARWICK R, DYSON M, BANNISTER LH. *Gray anatomia.* 37ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

WINFREE AT. 1994. Electrical turbulence in 3-dimensional heart muscle. *Science* 266:1003–1006.

ZOLL, P M. Normal and pathological anatomy of the coronaries. *Trans. Amer. Coll. Cardiol.* V. 1, n. 1, p. 29 - 43, 1951

5 ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES FORMAS DE CANULAÇÃO PARA DESCELULARIZAÇÃO DE CORAÇÃO SUÍNO INTEIRO

Ana Lídia Jacintho Delgado, Renata Kelly da Palma, Andressa Daronco Cereta, Adriana Raquel de Almeida da Anunciação, Ana Clara Bastos Rodrigues, Marisol León Cabrera, Henrique Inhauser Riceti Magalhães, Daniela Evangelista Leite, Maria Angélica Miglino

RESUMO

A bioengenharia de tecidos compreende uma abordagem pioneira para pesquisa e desenvolvimento de biomateriais para medicina regenerativa. Essa técnica consiste em remover todas as células do tecido ou de todo o órgão, preservando as propriedades extracelulares da matriz, como fibronectinas, lamininas, elastina e principalmente fibras de colágeno. Aqui, objetivamos estabelecer um protocolo fácil e de baixo custo para a descellularização do coração suíno inteiro. Sete corações suínos, de ambos os sexos e idade de aproximadamente 8 meses, foram canulados por aorta ou vasos coronários, lavados com tampões EDTA (0,01%) ou PBS (0,1M), perfundidos com 2% ou 4% de concentração de SDS na bomba de biorreator com as medidas de perfusão de 10, 50 e 400 mL/min. Os *scaffolds* de corações descellularizados foram primeiramente analisados macroscopicamente quanto à sua aparência translúcida. Em seguida, foi realizada análise microscópica para avaliar sua qualidade estrutural. Foi padronizado um protocolo que parece macroscopicamente eficiente, mas microscopicamente agressivo à matriz extracelular, fornecendo novas informações sobre concentração, volume e pressão do processo de descellularização do órgão inteiro.

Palavras-chave: Bioengenharia tecidual, Descellularização, Matriz Extracelular, *Scaffold*.

Abstract

Tissue bioengineering comprises a pioneering approach to research and development of biomaterials for regenerative medicine. This technique consists of removing all cells from the tissue or from the whole organ, preserving the extracellular matrix properties, for example as fibronectins, laminins, elastin and mainly collagen fibers. Here, we aim to establish an easy and low protocol for decellularization of the entire porcine heart. Seven hearts, sex and age of approximately 8 months, were cannulated by aorta or coronary vessels, washed with EDTA (0.01%) or PBS (0.1 M), perfused with 2% or 4% SDS concentration in the pump bioreactor with perfusion measurements of 10, 50 and 400 ml / min. Decellularized heart scaffolding was analyzed macroscopically for its translucent appearance. Then, a microscopic analysis was performed to assess its structural quality. It has been standardized as a protocol that appears macroscopically efficient, but microscopically aggressive to the extracellular matrix, providing new information on the concentration, volume and pressure of the decellularization process of the entire organ.

Keywords: Bioengineering tissue; Decellularization; Extracellular Matrix; *Scaffold*

Introdução

Um grande número de estudos sobre descelularização aplicados à bioengenharia de tecidos foram realizados para otimizar o tempo desse processo e manter a maior parte da matriz extracelular (MEC) intacta. É importante enfatizar que os métodos de descelularização removem todo o material celular (CRAPO & BADYLAK, 2011; BROWN et al., 2011; KEANE, SWINEHART & BADYLAK, 2015; KAWECKI et al., 2018), e ainda estão longe de permanecer com a MEC intactos. Sendo assim, a escolha do método a ser usado é muito importante para ser eficaz de acordo com o órgão ou tecido que será descelularizado.

Dois padrões primordiais devem ser seguidos para realizar a descelularização: a remoção do maior número de componentes celulares e a retenção da estrutura nativa. Nos corações, as técnicas de descelularização são descritas e aprimoradas desde 2008, quando Ott et al removeram todas as células do coração de ratos inteiros. Esse processo foi realizado por perfusão, deixando apenas o *scaffold* disponível. É no *scaffold* que novas células podem ser inseridas.

No coração de suínos, muitos estudos sobre a estrutura da MEC são caracterizados, uma vez que os porcos têm maior semelhança anatômico-fisiológica, se considerarmos sua hemodinâmica (BLOOR, WHITE & ROHT 1992 apud SARMENTO 2009). O objetivo deste artigo é descrever um novo método de descelularização para coração de suínos, por perfusão retrógrada, para gerar ECM cardíaca. A decelularização foi confirmada por métodos histológicos e avliação macroscópica.

Metodologia

Descelularização - Macroscopia

Dez corações suínos, de ambos os sexos, com peso aproximado de 300g foram obtidos no matadouro da cidade de São José do Rio Pardo-SP, em conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal 1166080618. Esses corações foram congelados a -80°C por pelo menos 24 horas para armazenamento e auxílio da lise celular. Três corações foram utilizados para o nosso controle experimental (macroscopia e microscopia). Três principais formas de canulação foram testadas: em primeiro lugar, o coração do porco foi canulado pelas artérias coronárias. Essas artérias foram canuladas por sonda uretral (Mark Med comprimento 40 cm e

calibre 04). Cada coração foi colocado no aparelho Harvard Peristaltic Pump - Havard Appatarus e o processo foi iniciado com ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA) como um agente anticoagulante para limpar os vasos, sendo perfundido 10 ml / min por 20 minutos. Depois disso, o dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1% foi perfundido em 50 mL / min; Todos os dias o coração era lavado com água destilada e re-perfundia a SDS; esse processo foi realizado em 25 dias. Segundo, a aorta foi canulada com um tubo de silicone, com fluxo constante de 50mL / min, 1x solução salina tamponada com fosfato (PBS) e água destilada por 20min e SDS a 2% por 24 horas; esse processo se repete e foi realizado em 15 dias. Em terceiro lugar, a aorta foi canulada com um tubo de silício e o coração foi colocado em uma proveta de 5L contendo 4L de PBS 0.1M a 400 mL / min cada por 30 minutos, foi reciculado com uma bomba peristáltica (Harvard Peristaltic Pump - Havard Appatarus). Depois disso, a água Milliq foi perfundida no mesmo sistema. Quatro litros de SDS a 4% foram perfundidos através da vasculatura do miocárdio a 400mL / min por 24 horas. Esse processo se repetiu por 6 dias. Foi perfundido Triton X-100 a 1% seguido de PBS 0.1M e água Milliq por 24 horas, para ajudar na remoção de detritos celulares e resíduos químicos em todos os protocolos. Os corações foram avaliados macroscópicos e selecionados para microscópicos. Esses dados podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1: Tipos de protocolos usados- Tipo de perfusão, Primeira Lavagem, Concentração de SDS, Lavagens Diárias, Volume da Perfusão, Tempo de Protocolo e Número de amostras. Fonte: DELGADO, 2019.

Tipo de Perfusão	Primeira Lavagem	Concentração de SDS	Lavagens Diárias	Volume de Perfusão	Tempo de Protocolo	Número de Amostras
Coronárias	EDTA (0,01%)	2%	Água	10 mL/min	25 dias	2
Aorta	EDTA (0,01%)	2%	PBS + água destilada	50 mL/min	15 dias	2
Aorta	PBS (1x)	4%	PBS + água Milliq	400 mL/min	6 dias	3

Histologia - Microscopia

Esse processo seguiu a técnica SURS: amostragem sistemática, uniforme e aleatória (NYENGAARD & GUNDERSEN, 1992), para que as informações de macroscopia e microscopias sejam imparciais e mais precisas e confiáveis. Essa técnica é conhecida como estereologia e definida como "um conjunto de procedimentos baseados em geometria e probabilidade que, uma vez que medidas ou elementos estereológicos pontuam em uma imagem plana em uma estrutura tridimensional, produz informações sobre características na estrutura original" (SILVA, 2007). Então, capturamos três corações nativos (controle) e três corações decelularizados e cortamos em 5-6 seções transversais perpendiculares ao eixo ápice-base, com 2 cm de espessura e selecionamos todas as partes que continham ventrículo esquerdo. Para esta amostragem, colocamos uma grade com sistema de pontos em cada fatia e contamos cada ponto que tocou o lúmen e a parede do ventrículo esquerdo. Com um punch de biópsia de 6 mm, coletamos quatro amostras em cada fatia, que nos resultou em blocos de tecidos.

As amostras foram divididas em conjunto, cada um com 6 fragmentos e cada um com 2 lâminas, totalizando 12 lâminas controle e 12 unidades decelularizadas; foram fixados em paraformaldeído tamponado a 4% por 48 horas e congelados lentamente em meio Tissue-Tek OCT (# 4583-1, Sakura-Torrance, EUA), seccionados em micrótomo de criostato (CM1520, Leica) e transferidos para lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina (# p8920, Sigma-Saint Louis, EUA). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), Picrosirius e Ferro Coloidal para avaliação da presença de núcleos e estruturas da MEC (BRANCROFT & GAMBLE, 2008). Para Picrosirius, as lâminas foram observadas ao microscópio polarizado e as fibras de colágeno foram classificadas de acordo com Velindandla et al. (2014) como birrefringência verde a verde-amarela, representando as fibras finas e dispersas, enquanto a birrefringência amarelo-laranja é representada pelas fibras grossas e compactas.

Resultados

Em primeiro lugar, vemos o aspecto macroscópico do coração suíno, sendo o grupo de descelularização com SDS a 4% canulado pela aorta se mostrou um método mais eficiente, uma vez que o tecido cardíaco aparece "transparente". Foi possível observar alterações de cor e formato durante o processo de descelularização, resultante da infusão de detergente. A mudança de cor pode ser explicada porque todas as células foram removidas do tecido, deixando com aspecto translúcido; em relação ao seu formato, durante o processo de perfusão é esperado um aumento no tamanho do órgão, devido ao choque hipotônico decorrente das lavagens com água e PBS. É importante enfatizar que diferentes soluções foram testadas para remover todos os coágulos, como o EDTA adaptado de Wainwright et al. (2010) e PBS (HODGSON et al., 2017). Esses resultados estão presentes na figura 1.

Figura 1: Análise macroscópica. Em A, coração nativo (controle). Em B, coração canulado pelas coronárias, com perfusão de SDS 2%. A seta indica que os vasos da base foram descelularizados, enquanto o destaque mostra que a remoção de células não foi concluída. Em C, o coração foi canulado pela aorta, perfundido com SDS 2%. A seta mostra o início da descelularização, enquanto partes destacadas mostram pontos de necrose. Em D, coração completamente descelularizado, com SDS 4%. Barra 2 cm. Fonte: DELGADO, 2019

É muito importante avaliar o processo de descelularização para adotar o melhor método para esse fim, tentando reduzir os danos causados a MEC. Com o protocolo estabelecido, repetimos esse processo por perfusão retrógrada pela aorta, com SDS a 4% para avaliar as características histológicas da MEC. Os fragmentos foram selecionados por estereologia e processados. Utilizamos a estereologia para minimizar o erro e promover a aleatoriedade na amostragem histológica (GUNDERSEN, 1986; MUHLFELD et al., 2009; SASAHARA, 2010). Os resultados podem ser observados na imagem 2.

Figura 2: Análise microscópica. Em A, por meio da coloração HE, há a presença de núcleos celulares (seta). Em B, picrosírius e C picrosírius com luz polarizada. Na seta, há a diferença de birrefringência. Em D, ferro coloidal (FC), glicosaminoglicanos em azul (seta) e colágeno vermelho. Em E, há a ausência de núcleos celulares, F picrosírius e G picrosírius com luz polarizada, com destaque para birrefringência (seta) onde amarelo são fibras finas de colágeno e vermelho fibras mais espessas. Em H, os glicosaminoglicanos (azul) evidenciado pela seta. Barra 100µm. Fonte: DELGADO, 2019.

Discussão

O presente estudo é muito relevante nos estudos de MEC, uma vez que o coração de suíno é mais semelhante ao coração humano em sua morfologia e função. Sabemos que as doenças cardíacas são responsáveis por matar muitas pessoas por ano em todo o mundo e o transplante cardíaco é a melhor escolha em alguns casos. Neste ponto é importante para definir e classificar doenças cardíacas como isquêmica (causada pela falta de oxigênio que chega ao coração) e terminal (quando o coração não pode ter o processo reversível). Esse problema é resultado da incapacidade de regeneração dos cardiomiócitos, perdidos por infarto do miocárdio (DARIOLLI, 2015). Nesse contexto, incontáveis protocolos de descelularização têm sido estudados e aplicados em diferentes tipos de tecidos e órgãos, como pulmão (PALMA et al., 2015), rim (GUAN et al., 2015), fígado (ZHOU et al., 2015), placentas (BARRETO et al., 2017; LEONEL, 2016) até o coração (OTT et al., 2005; PEREA et al., 2015; GUYETTE et al., 2015) para o futuro, esses órgãos possam ser reparados. Nosso trabalho demonstrou que um protocolo parece eficiente para descelularizar todo o órgão, otimizando o tempo e diminuindo o uso de detergente.

O principal objetivo de qualquer processo de descelularização é manter todos os componentes da MEC, sem danos ou perda de tecido após o uso de detergente

(GILBERT et al., 2006; CRAPO et al., 2011, GILBERT et al., 2012), isso não parece ser totalmente possível. Então, tentamos encontrar uma maneira de minimizar essa perda e, para avaliar esses critérios de classificação, usamos análises quantitativas e qualitativas.

A análise quantitativa abrange diferenças macroscópicas, como a coloração do tecido até a alteração do formato, sendo as primeiras característica a serem avaliadas. Quando tentamos reproduzir protocolos já descritos na literatura (GUYETTE et al., 2014; HE & CALLANAN, 2012), constatamos que os processos não foram eficientes. As artérias coronárias (direita e esquerda) foram canuladas para realizar a descelularização "de dentro para fora", irrigando o endocárdio com aumento da concentração de detergente (0,5 - 2%), fluxo constante de 10mL / min, a fim de garantir os componentes da MEC. Nesse caso, lavamos com EDTA (0,01%) para substituir a água heparinizada, atuando como anticoagulante, removendo todo o sangue e possíveis coágulos. Macroscopicamente, em algumas partes, esse órgão apresentou partes descelularizadas, como por exemplo nos vasos da base, no entanto, algumas partes apresentaram necrose. Esse protocolo levou 25 dias, implicando na qualidade do ECM.

No momento em que foi realizada perfusão retrógrada pela aorta, seguindo os mesmos parâmetros descritos anteriormente, diminuimos o tempo de protocolo, pois aumentamos a vazão para 50mL / min e esse processo durou 15 dias. Não decelularizamos todo o órgão, mesmo que essa concentração estivera muito bem descrita na literatura (GUYETTE et al., 2015). Acredita-se que lavagens previamente definidas e concentração de detergente não sejam suficientes para remover todos os componentes celulares.

Resolvemos então aumentar a concentração de detergente por 2 vezes (SDS a 4%) e a taxa de fluxo para 400mL / min. Nesse caso, a aorta foi canulada e a primeira lavagem foi realizada com PBS 0.1M seguido pela água Milliq, causando nas células um choque hipotônico, facilitando a ação do detergente, acrescentando aos estudos de WAINWRIGHT et al., 2009; DUAN et al., 2011; GUYETTE et al., 2014 PALMA et al, 2015; JOHNSON et al., 2016; DA PALMA et al., 2018. Em nosso estudo, esse protocolo foi mais eficiente, possibilitando a análise microscópica (ver resultados da microscopia).

A diferença nos grupos controle e descelularizado foi notável em relação à presença de núcleos celulares, por meio da coloração com HE; com o protocolo de

ferro coloidal foi possível verificar a presença de colágenos e glicosaminoglicanos após a descelularização; A cor do Picrosirius nos permitiu ver os tamanhos das fibras de colágeno. Esses resultados afirmam que o processo de descelularização parece ter sido realizado, de acordo com os dados encontrados na literatura (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). No entanto, sugere novos estudos sobre a concentração de detergente em relação à MEC. Embora a alta concentração de SDS tenha sido bem delineada na literatura (HOGDSON et al., 2017), mostramos que ela removeu muito além das células, também removendo componentes do MEC. Novos experimentos estão sendo realizados e serão comparados posteriormente.

Conclusão

Até o momento, foi possível evidenciar a remoção das células por meio da técnica de coloração HE, bem como a presença de colágeno e glicosaminoglicanos por ferro coloidal e coloração por Picrosirius. Essas informações reforçam que a concentração de detergente utilizado foi muito agressiva e não apresentou todos os componentes da MEC de maneira esperada, subsidiando informações para novos estudos em andamento, que estão sendo realizados com menores concentrações de detergente, para tornar a MEC viável, para ser utilizado e avaliado como *scaffold* recelularizado e também na produção de hidrogel desse MEC descelularizado.

Referências

BARRETO, R. D. S. N., ROMAGNOLLI, P., MESS, A. M., & MIGLINO, M. A. (2018). Decellularized bovine cotyledons may serve as biological scaffolds with preserved vascular arrangement. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 12(4), e1880-e1888.

BLOOR, C. M.; WHITE, F. C.; ROTH, D. M. The pig as a model of myocardial ischemia and gradual coronary occlusion. In: SWINDER, M. M. (Ed.). *Swine as models in biomedical research*, Ames, IA: Iowa State University Press, 1992. p. 163-175.

BROWN BN, FREUND JM, HAN L, RUBIN JP, REING JE, JEFFRIES EM, WOLF MT, TOTTEY S, BARNES CA, RATNER BD, BADYLAK SF. Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix. *Tissue Part C Methods* 2011;17:411–421.

- CRAPO PM , GILBERT TW , BADYLAK SF. Uma visão geral dos processos de descelularização de tecidos e órgãos inteiros . *Biomateriais* 2011 ; 32 : 3233 - 3243 .
- DA PALMA, R. K., CAMPILLO, N., URIARTE, J. J., OLIVEIRA, L. V., NAVAJAS, D., & FARRÉ, R. (2015). Pressure-and flow-controlled media perfusion differently modify vascular mechanics in lung decellularization. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 49, 69-79.
- DA PALMA, R. K., FRATINI, P., SCHIAVO MATIAS, G. S., CERETA, A. D., GUIMARÃES, L. L., ANUNCIAÇÃO, A., DE OLIVEIRA, L., FARRE, R., ... MIGLINO, M. A. (2018). Equine lung decellularization: a potential approach for in vitro modeling the role of the extracellular matrix in asthma. *Journal of tissue engineering*, 9, 2041731418810164. doi:10.1177/2041731418810164
- DARIOILLI, R. (2015). *Efeito aditivo do transplante de células-troncos adultas sobre a perfusão cardíaca pós-infarto em porcos tratados com beta-bloqueador e inibidor da enzima conversora de angiotensiva* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- GILBERT TW, SELLARO TL, BADYLAK SF. Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials*, 27: 3675–3683.2006.
- GILBERT, T. W. (2012). Strategies for tissue and organ decellularization. *Journal of cellular biochemistry*, 113(7), 2217-2222.
- GUAN, Y., LIU, S., LIU, Y., SUN, C., CHENG, G., LUAN, Y., ... & ZHAO, S. (2015). Porcine kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 56, 451-456.
- GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, v. 147, n. 3, p.229–63, 1987.
- GUYETTE, J. P., CHAREST, J. M., MILLS, R. W., JANK, B. J., MOSER, P. T., GILPIN, S. E., ... & GAUDETTE, G. R. (2016). Bioengineering human myocardium on native extracellular matrix novelty and significance. *Circulation research*, 118(1), 56-72.
- GUYETTE, J. P., GILPIN, S. E., CHAREST, J. M., TAPIAS, L. F., REN, X., & OTT, H. C. (2014). Perfusion decellularization of whole organs. *Nature protocols*, 9(6), 1451.
- HE, M; CALLANAN, A. Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 19, n. 3, p. 194-208, 2012.
- HODGSON, M. J., KNUTSON, C. C., MOMTAHAN, N., & COOK, A. D. (2017). Extracellular matrix from whole porcine heart decellularization for cardiac tissue engineering. *Methods in Molecular Biology*, 1-8.
ideal para recelularização.

JOHNSON, T. D., HILL, R. C., DZIECIATKOWSKA, M., NIGAM, V., BEHFAR, A., CHRISTMAN, K. L., & HANSEN, K. C. (2016). Quantification of decellularized human myocardial matrix: a comparison of six patients. *PROTEOMICS–Clinical Applications*, 10(1), 75-83.

KEANE TJ, SWINEHART IT, BADYLAK SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods* 2015;84:25–34.

LEONEL, Luciano César Pereira Campos. **Produção e caracterização de biomateriais acelulares bioativos obtidos a partir da decelularização de placentas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NYENGAARD, J. R.; GUNDERSEN, H. The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform, random sections from small specimens. *Journal of Microscopy*, v. 165, p. 427-431, 1992.

OTT, H. C., MATTHIESEN, T. S., GOH, S. K., BLACK, L. D., KREN, S. M., NETOFF, T. I., & TAYLOR, D. A. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine*, 14(2), 213.

PEREA-GIL, I., URIARTE, JJ, PRAT-VIDAL, C., GÁLVEZ-MONTÓN, C., ROURA, S., LLUCIÀ-VALLDEPERAS, A., SOLER-BOTIJA, C., FARRÉ, R., NAVAJAS, D.,... BAYES-GENIS, A. (2015). Estudo comparativo in vitro de dois protocolos de descelularização em busca de um esqueleto miocárdico

SARMENTO, C. A. P. Estimativa do número de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em suínos (*Sus scrofa*) (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

SASAHARA, Tais Harumi de Castro. **Efeitos da neurotoxina MPTP na estrutura do miocárdio de camundongos C57/BL**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SILVA, A.G.P. Introdução à estereologia. 2007. Disponível em: <http://www.aulas.e-agps.info/estereologia/estereologia.pdf> acesso em dezembro de 2018.

VELIDANDLA S, GAIKWAD P, EALLA KKR, BHORGONDE KD, HUNSINGI P, KUMAR A. Histochemical analysis of polarizing colors of collagen using Picrosirius Red staining in oral submucous fibrosis, **Journal of international oral health : JIOH**, 6: 33–8. 2014.

WAINWRIGHT, J. M., CZAJKA, C. A., PATEL, U. B., FREYTES, D. O., TOBITA, K., GILBERT, T. W., & BADYLAK, S. F. (2009). Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 16(3), 525-32.

6 ARTIGO 3

QUANTIFICAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DO VENTRÍCULO ESQUERO DE CORAÇÕES SUÍNOS DESCCELULARIZADOS E AVALIAÇÃO DA COMPLACÊNCIA DO ÓRGÃO ANTES E APÓS O PROCESSO DE DESCCELULARIZAÇÃO

Ana Lúcia Jacintho Delgado, Leticia Lopes Guimarães, Renata Kelly da Palma, Henrique Inhauser Riceti Magalhães, Eduardo Amaro Lebre Jr, Marisol León Cabrera, Andressa Daronco Cereta, Ana Clara Bastos Rodrigues, Luana Félix de Melo, Carla Maria Figueiredo de Carvalho Miranda, Ana Claudia de Oliveira Carreira Nishiyama, Taís Harumi de Castro Sasahara, Maria Angelica Miglino

RESUMO

A descclularização ocorre quando todas as células são removidas de um órgão ou tecido, mantendo apenas sua estrutura tridimensional, formada por matriz extracelular (MEC). Esta área está inserida na engenharia de tecidos para o progresso da medicina regenerativa uma vez que os produtos obtidos da descclularização são denominados *scaffolds* e destinam-se a desempenhar as funções de órgãos ou tecidos com funções prejudicadas. Sabe-se que os porcos possuem uma imensa semelhança morfofuncional com os humanos, o presente estudo com corações suínos descclularizaos como *scaffold* foi realizado neste trabalho. Nosso objetivo foi descclularizar o coração de suíno, tornando-o viável como *scaffold*, descrevendo um novo protocolo de descclularização, mantendo a conformidade do órgão. O ventrículo esquerdo foi a unidade avaliada, calculando seu volume a partir da estereologia, a qual também foi possível quantificar o volume total de colágeno e glicosaminoglicanos em porcentagem da MEC. Os resultados mostraram que embora o volume ventricular esquerdo tenha reduzido durante o processo, os componentes da MEC foram mantidos, validando-o como um *scaffold* promissor nas aplicações clínicas

PALAVRAS-CHAVE: Descclularização. Engenharia de Tecidos. Matriz Extracelular. *Scaffold*.

ABSTRACT

Decellularization occurs when all cells are removed from an organ or tissue, maintaining only its three-dimensional structure, formed by extracellular matrix (MEC). This area is inserted in tissue engineering for the progress of regenerative medicine since the products obtained from decellularization are called scaffolds and are intended to perform the functions of organs or tissues with impaired functions. It is known that pigs have an immense morphofunctional resemblance to humans, the present study with decellularized swine hearts as scaffold was carried out in this work. Our objective was to decellularize the pig heart, making it viable as a scaffold, describing a new decellularization protocol, maintaining the organ's compliance. The left ventricle was the unit evaluated, calculating its volume based on stereology, which was also possible to quantify the total volume of collagen and glycosaminoglycans as a percentage of ECM. The results showed that although the left ventricular volume decreased during the process, the ECM components were maintained, validating it as a promising scaffold in clinical applications.

Keywords: Decellularization. Extracellular matrix. Scaffold. Tissue Engineering

Introdução

O processo de descelularização vêm sendo explorado nos últimos anos por ser capaz de gerar produtos (*scaffolds*) que podem ser, posteriormente, recelularizados resultando no auxílio da construção/reparação de tecidos e órgãos. Esta pode ser uma alternativa para pacientes que estão em filas de transplantes, já que a esta técnica tende a minimizar a fila e possibilita o uso de células do próprio paciente, diminuindo também o índice de rejeição.

O estudo da descelularização ainda é importante para que a recelularização seja bem definida, com as células ocupando de forma uniforme esse *scaffold*, já que há a necessidade de uma ótima distribuição das células no mesmo, para gerar um bom suporte mecânico para o crescimento celular (MIGLINO et al., 2019); além disso, o estudo sobre a complacência do órgão possui grande relevância quando levamos em consideração a sua aplicação clínica.

Sabemos que as doenças cardiovasculares são responsáveis pela maior causa de mortes no mundo e o transplante cardíaco ainda é a única saída viável para a melhor qualidade de vida. Embora o número de doadores no Brasil tenha crescido nos últimos anos, ainda não é possível suprir a demanda. Essas informações reforçam os estudos na bioengenharia para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos *scaffolds* para o uso clinicamente funcional.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o *scaffold* proveniente da descelularização e quantificar estruturas pertinentes à recelularização, em especial os colágenos – que são proteínas fibrilares – e os glicosaminoglicanos (GAGs) – que dão suporte à matriz extracelular (MEC) e as células – para que futuramente esses produtos possam suprir as necessidades dos pacientes.

Metodologia

Descelularização - Macroscopia

Sete corações suínos com peso aproximado de 300g foram obtidos no matadouro da cidade de São José do Rio Pardo- SP, em conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal 1166080618. Esses corações foram congelados a -80°C por pelo menos 24 horas para armazenamento e auxílio da lise celular. Quatro corações foram utilizados para o nosso controle experimental (macroscopia e microscopia, enquanto os outros três foram canulados pela artéria aorta (Figura 1) e colocados em aparelho experimental (Harvard Peristaltic Pump - Harvard Apparatus) e o processo foi iniciado com PBS 0.1M para limpeza dos vasos sendo perfundido 200 ml/min durante 20 minutos, seguido de água destilada sob os mesmos parâmetros. Depois disso, o dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1% foi perfundido em 400 mL / min. Todos os dias o coração foi lavado com água destilada e re-perfundido com SDS; esse processo foi realizado em 20 dias. Foi perfundido Triton X-100 a 1% seguido de PBS 0.1M e água MilliQ por 24 horas, para ajudar na remoção de detritos celulares e resíduos químicos em todos os protocolos. Os corações foram avaliados macroscópicos e selecionados para microscópicos.

Figura 1: Processo de descelularização de coração suíno inteiro. Fonte: DELGADO, 2019.

Histologia - Microscopia

Esse processo seguiu a técnica SURS: amostragem sistemática, uniforme e aleatória (NYENGAARD & GUNDERSEN, 1992), para que as informações de macroscopia e microscopia sejam imparciais, mais precisas e confiáveis. Essa técnica é conhecida como estereologia e definida como "um conjunto de procedimentos baseados em geometria e probabilidade que, uma vez que medidas ou elementos

estereológicos pontuam em uma imagem plana em uma estrutura tridimensional, produz informações sobre características na estrutura original" (SILVA, 2007). Então, separamos os quatro corações nativos (controle) e três corações decelularizados e cortamos em 5-6 seções transversais perpendiculares ao eixo ápice-base, com 2 cm de espessura e selecionamos todas as partes que continham ventrículo esquerdo. Para esta amostragem, colocamos uma grade com sistema de pontos em cada fatia e contamos cada ponto que tocou o lumem e a parede do ventrículo esquerdo. Com um punch de biópsia de 6 mm, coletamos três amostras em cada fatia, que nos resultou em blocos de tecidos (Figura 2).

Figura 2: Esquema de amostragem aleatória do ventrículo esquerdo. Fonte: DELGADO, 2019.

As amostras foram divididas em conjuntos de blocos de tecidos e congelados lentamente em meio Tissue-Tek OCT (# 4583-1, Sakura-Torrance, EUA), seccionados em micrótomo de criostato (CM1520, Leica) e transferidos para lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina (# p8920, Sigma-Saint Louis, EUA), fixados em paraformaldeído 4%. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), Picrosirius red, Tricromo de Masson, Método de Weigert-Van Gieson e Ferro Coloidal para avaliação da presença de núcleos e estruturas da MEC (BRANCROFT & GAMBLE, 2008). Para Picrosirius, as lâminas foram observadas ao microscópio polarizado e as fibras de colágeno foram classificadas de acordo com Velindandla et al. (2014) como birrefringência verde a verde-amarela, representando as fibras finas e dispersas, enquanto a birrefringência amarelo-laranja é representada pelas fibras grossas e compactas.

Para a estimativa do volume do ventrículo esquerdo (VE), utilizou-se o Princípio de Cavalieri, aplicando as seguintes fórmulas:

$$V(P) = \sum pp \times a(p) \times t$$

$$V(L) = \sum pl \times a(p) \times t$$

Onde;

V (P): volume da parede do ventrículo esquerdo

$\sum pp$: somatório de pontos que tocaram a parede do VE

a(p): área por ponto: 0,4 cm (para a parede do VE)

t: espessura do corte: 2cm

V(L): volume do lúmen.

$\sum pl$: somatório dos pontos que tocaram o lúmen.

a(p): área por ponto: 0,25cm (para o lúmen do VE)

t: espessura do corte: 2 cm

O volume do VE foi obtido pela soma de V(P) e V(L). O coeficiente de erro do Princípio de Cavalieri foi estimado de acordo com Gundersen et al. (1999).

Para a estimativa do volume total de colágeno e GAGs da MEC foi utilizado um sistema de pontos que foi sobreposto sobre as secções histológicas amostradas seguindo o padrão SURS, onde a fração dos volumes foram calculadas a partir da fórmula:

$$Vv(col) = \sum Pcol / \sum Pframe$$

Onde:

$\sum Pcol$: somatória de pontos que tocaram a área de colágeno caracterizada pela coloração de Picrossírius e GAGs pela coloração de Alcian Blue

$\sum Pframe$: somatória de pontos que tocaram a região de interesse (VE).

Posteriormente, estas frações de volume (colágenos e GAGs) foram multiplicada pelo volume do ventrículo esquerdo (controle e descelularizado).

Imunohistoquímica

As amostras foram congeladas lentamente em meio Tissue-Tek OCT (# 4583-1, Sakura-Torrance, EUA), seccionados em micrótomo de criostato (CM1520, Leica) e transferidos para lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina (# p8920, Sigma-Saint Louis, EUA), fixados em paraformaldeído 4%. A peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio em água destilada durante 30 minutos no escuro. A interação da proteína não específica foi bloqueada com 2% de albumina de soro de

cabra, em solução tampão de fosfato (PBS, NaCl 136,9 mM, KCl 4, 8 mM, 14,8 mM de KH_2PO_4 e NaOH 8,7 mM, pH 7,2) durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpos primários: anti-colágeno I (# 600-401-103S, 1: 100, Rockland - Limerick, EUA), subunidade anti-laminina alfa-2 (# bs-8561R, 1: 100, Bioss Antibodies - Woburn, EUA) e anti-elastina (Abcam ab9519/ *Mouse Polyclonal*/ 1:100) durante a noite em câmara úmida a 4 graus Celsius. Para os controles negativos, foi utilizado IgG anti-camundongo irrelevante (# M5284, Sigma) ou IgG anti-coelho (# ab27478, Abcam-Cambridge, Reino Unido) nas mesmas condições, para substituir o anticorpo primário. A reação foi detectada por um kit Dako Advance HRP que inclui o anticorpo secundário (# K6068, Dako - Carpinteria, EUA) e a cor desenvolvida com DAB (# K3468, Dako). As lâminas serão ligeiramente contra-coradas com hematoxilina. Entre cada passo após a incubação do anticorpo, as lâminas foram lavadas em PBS contendo 0,2% de BSA. Finalmente, as lâminas foram montadas e visualizadas em um microscópio Nikon Eclipse 80I.

Imunofluorescência

As amostras foram inicialmente congeladas lentamente em meio Tissue-Tek OCT (# 4583-1, Sakura-Torrance, EUA) a -150°C . Cortes histológicos de 12 μm de espessura foram realizados usando criostato (CM1520, Leica). As lâminas foram fixadas em PFA 4% por 10 minutos, secadas a temperatura ambiente por 5 minutos e incubadas em PBS (solução salina fosfatada) + 10% de soro de cabra por 1 hora e incubadas com anticorpo primário anti-colágeno I (# 600-401-103S, 1: 100, Rockland - Limerick, EUA) e anti-elastina (Abcam ab9519/ *Mouse Polyclonal*/ 1:100) overnight a 4°C em câmara escura e úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas (3x, 5 minutos cada) com PBS + 1% soro de cabra a temperatura ambiente, incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora, protegido da luz. As lâminas foram lavadas em solução de PBS (3x, 5 minutos), incubadas com DAPI (1:10.000) por 10 minutos a temperatura ambiente e lavadas novamente com PBS (3x, 5 minutos), montadas em glicerol: PBS (1:1) e analisadas em microscópio confocal (FV1000 Olympus IX81, Japão) com objetivas de 200x e 400x, em 5 campos microscópios diferentes, e com microscópio de luz com fluorescência Nikon Eclipse E- 80i, do Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem - CADI- FMVZ-USP.

DAPI

As amostras nativas e descelularizadas foram congeladas lentamente em meio Tissue-Tek OCT (# 4583-1, Sakura-Torrance, EUA), seccionados em micrótomo de criostato (CM1520, Leica) com cortes de 12 μm e transferidos para lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina (# p8920, Sigma-Saint Louis, EUA), fixados em acetona por 20 minutos, incubadas com 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) por 15 minutos, lavadas em PBS 1X (3x de 3 min), montadas e avaliadas em microscópio de fluorescência (Nikon 80i).

Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras nativas e descelularizadas foram fixadas em Karnovski 1:1 (glutaraldeído 2,5% : paraformaldeído 4%) durante 48 horas, lavadas em um banho de ultra-som e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (SEM® - Hatfield, EUA) por 90 minutos. As amostras também foram desidratadas em uma crescente série de etanóis sob agitação vigorosa, depois secas usando um secador de ponto crítico automatizado (EM CPD300, Leica), transferidas para stubs e metalizadas com ouro (# K550, Emitech - Ashford, Reino Unido). As amostras foram analisadas e fotografadas em um microscópio eletrônico de varredura Leo 435 VP.

Complacência do órgão

Para esta avaliação, selecionamos os três corações do grupo experimental para verificar a complacência do órgão antes e após o processo de descelularização. Os corações foram acoplados em um sistema experimental (Figura 3) que continha um manômetro, uma proveta e uma bomba peristáltica, ligados entre si. A cada 20 ml de água injetada no órgão, a pressão foi aferida e documentada para posteriores interpretações.

Figura 3: Desenho experimental para análise de complacência do órgão. Fonte: DELGADO, 2019.

Quantificação de DNA gênômico remanescente

O DNA genômico foi isolado de 50mg de corações controles e decelularizados utilizando o *Illustra Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram digeridas com Proteinase K e tampão de lise do kit a 56 °C por 2h. As amostras de gDNA purificadas foram analisadas em espectrofotômetro a 260nm (Nanodrop, Thermo Scientific).

Recelularização

As células fibroblastos foram obtidas do projeto aprovado pelo CEUA Nº 4318311018 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As amostras de músculo esquelético equino foram obtidos do músculo bíceps femoral e cultivadas in vitro pela técnica de explante em meio MEM/ALPHA modificado (LGC Biotecnologia, BR30007-05), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina.). Para caracterização dos fibroblastos foi realizada o cultivo de 50.000 células em placa celular de 24 poços e no 7º dia de cultivo foram fixadas em PFA 4% durante 20 minutos e lavadas em PBS 1x (3x de 3 min). O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com albumina sérica bovina (BSA) 10%, diluída em PBS 1X durante 1 hora e incubação em anticorpo primário anti-vimentina (Genetex GTX 35160/ Mouse Ployclonal/ 1:100), marcador específico para fibroblastos, mantidos a 4°C *overnight*. Posteriormente, as células foram lavadas em PBS 1x (3x de 3 min), incubadas em anticorpo secundário (Alexa Fluor), lavadas novamente, incubadas em DAPI (10 minutos), lavadas e montadas. As lâminas foram avaliadas em microscópio de fluorescência (Nikon 80i).

Após caracterizados, os fibroblastos foram incubados em fragmentos de 1x1cm dos *scaffolds* provenientes do ventrículo esquerdo descclularizado, na concentração de 50.000 células por poço em placa não aderente, cultivados por 24, 42 e 72 horas para análise por microscopia eletrônica de varredura e por 4, 6 e 8 dias para marcação nuclear por DAPI.

Resultados

Macroscopia

O processo de descelularização é constatado, primeiramente, com a aparência “translúcida” do órgão, pois a medida que as células são retiradas, ele perde sua coloração original; além de ter o seu formato alterado, como na figura 4.

Figura 4: Análise macroscópica da descelularização. À esquerda coração nativo (antes do processo de descelularização) e à direita coração descelularizado aos 25 dias. Barra 2cm. Fonte: DELGADO, 2019.

Microscopia – histologia, IHQ e IF.

Após concluída a avaliação microscópica, o coração foi submetido à amostragem SURS, onde os fragmentos foram selecionados de formas aleatórias para a histologia. Três corações foram descelularizados e quatro foram mantidos como controle. Cada coração nos deu 9 fragmentos de VE e, destes 9, 2 fragmentos de cada coração foram selecionados: 1 ficou apenas para a histologia enquanto o outro ficou apenas para a imunohistoquímica (IHQ) / imunofluorescência (IF). Esses blocos nos deram um conjunto de lâminas - 6 para a histologia (Figura 5) - HE, Picrossírius, Ferro Coloidal, Tricromo de Massom, Alcian Blue e Método de Weigert-Van Gieson; 6 para imunomarcacão – que foi dividido em 3 laminas para IHQ (Figura 6) Para localização de proteínas específicas de MEC como colágeno tipo 1, elastina

e 3 lâminas para IF, comprovando a existência de colágeno tipo 1 e elastina (Figura 7).

Figura 5: Análise microscópica do processo de descelularização. Núcleos evidenciado nas setas em A por meio da coloração HE e em B (seta) ausência de núcleos celulares. Em C, pela coloração de Ferro Coloidal, glicosaminoglicanos são destacados (seta) no coração nativo e em D, colágeno (seta) na amostra de coração descelularizado. A coloração de Tricromo de Masson (E) mostra as fibras intercelulares em vermelho no coração nativo, enquanto em E destaque para o colágeno em azul no coração descelularizado. No método de Weigert-Van Gieson, o coração nativo (G) apresenta fibras colágenas em vermelho (seta) e outros elementos celulares em amarelo, enquanto o coração descelularizado (H) destaque para o colágeno em vermelho (seta). Em I, núcleos celulares destacado pelo DAPI, enquanto em J não é visível. A coloração de Alcian Blue destaca os glicosaminoglicanos (setas – K e L). Em M, coloração específica de colágeno com picrosirius red sob a luz refletida e em M' sob luz polarizada em corações controle. N (luz refletida) e N' (luz polarizada) evidência de colágenos de fibras mais espessas, de acordo com a birrefringência vermelha (corações descelularizados). Fonte: DELGADO, 2019.

Figura 6: Imunomarcção positiva para presença de colágeno tipo I (A e E), elastina (B e F) e laminina (C e G) tanto para corações controle quanto para corações descelularizados, respectivamente. Em D e H, nenhuma marcação foi realizada para o controle do experimento. Fonte: DELGADO, 2020.

Figura 7: Imunomarcção positiva para os anticorpos colágeno tipo 1 (A-C) para coração controle (nativo) e descelularizado (D-F) e elastina G-I para controle e J-L para descelularizado. Fonte: DELGADO, 2020.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Depois da avaliação histológica, amostras de coração controle (nativo) e descelularizado foram observados ultraestruturalmente pela MEV.

Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura, evidenciando a presença de células no controle e a ausência delas no descelularizado. Fonte: DELGADO, 2019.

Estimativa do Volume Ventricular Esquerdo, Colágeno Total e GAGs

Para quantificar o volume total de colágeno (Figura 9) e GAGs (Figura 10), utilizou-se teste T para corações controle e descelularizado. O coeficiente de variação foi menor que 1, conferindo credibilidade à amostragem,.

Figura 9: Colágeno total. Densidade em volume percentual de Colágeno Total em coração controle e descelularizados Fonte: DELGADO, 2020.

Figura 10: GAGs total Densidade em volume percentual de de GAGs em corações controle e descelularizados. Fonte: DELGADO, 2020.

Complacência do Órgão

Figura 11: Complacência. Relação do volume injetado no órgão e a pressão exercida sobre ele, tanto no coração antes quanto depois de ser descelularizado (gráfico de dispersão). A análise estatística pelo teste T não mostrou diferenças significativas entre eles. Fonte: DELGADO, 2020.

Quantificação de DNA genômico remanescente

O resultado da quantificação de DNA genômico remanescente se mostrou dentro do esperado, conforme os parâmetros descritos por Crapo et al. 2003 (Figura 12).

Figura 12: Mensuração de DNA em amostras de corações controle (nativo) e descelularizados. Fonte: DELGADO, 2020.

Recelularização

Figura 13: Análise MEV de coração nativo (A) e recelularizado com fibroblasto por 24 horas (B), 48 horas (C) e 72 horas (D). Análise DAPI da recelularização com 4 dias (E), 6 dias (F) e 8 dias (G). Caracterização das células incubadas com Vimentina (H-J) (proteína específica para fibroblasto). Imunomarcacção de Laminina, (K-M) a qual é marcador específico de membrana basal, do scaffold recelularizado,

Discussão

As doenças cardiovasculares são responsáveis pela maior causa de mortes no mundo, de acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 2017), destacando-se as doenças coronarianas, com o maior índice de prevalência, seguida por acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca. A evolução natural das doenças cardíacas resulta na insuficiência cardíaca em estágio terminal, sendo o transplante a única opção terapêutica, porém, como fatores limitantes, observa-se o número de doadores menor que o número de pacientes na fila de espera; ocorrência de rejeição aguda do órgão pós-transplante, além de complicações nas terapias imunossupressoras (TAYLOR et al., 2019).

Sendo assim, a engenharia de tecidos representa uma terapia promissora, principalmente quanto aos enxertos xenogênicos, que podem ser obtidos a partir do processo de descelularização, a qual é uma técnica capaz de remover os componentes celulares, ao mesmo tempo em que preserva a arquitetura tridimensional da matriz extracelular (MEC), (HEATH, 2019). Neste contexto, a técnica de descelularização e recelularização é tida como propícia, tendo em vista a qualidade do produto ao final do processo, principalmente quando relacionado ao transplante cardíaco, uma vez que a recelularização e a maturação deste órgão possa ser realizado com as células-tronco do próprio paciente, reduzindo a necessidade do uso de fármacos imunossupressores a longo prazo e, conseqüentemente, a rejeição do órgão ou enxerto (HILLEBRANDT et al., 2019).

Inúmeros protocolos foram descritos na literatura para se obter um biomaterial cardíaco adequado (OTT et al., 2008; AKHYARI et al., 2011; GUYETTE et al., 2014), e no presente estudo encontramos a necessidade de adequação do protocolo de descelularização para um experimento eficiente, minimizando as grandes perdas da MEC para que, enfim, os colágenos e glicosaminoglicanos totais fossem estimado. Nosso protocolo demorou cerca de 25 dias para que a descelularização ocorresse, enquanto alguns autores fizeram em menos tempo (WAINWRIGHT et al., 2009; MOMTAHAN et al., 2015; SANCHÉZ et al., 2015; LEE et al., 2017).

A descelularização de um órgão inteiro exige o conhecimento da densidade celular, espessura do tecido e os agentes de descelularização utilizados (HERRERA et al., 2019) (físico, químico ou enzimático, além de uma associação entre eles) para que torne a MEC descelularizada viável, preservando os componentes biologicamente

ativos para modular o nicho celular, permitindo migração, adesão, proliferação e diferenciação celular. No protocolo desenvolvido neste trabalho, utilizamos o controle da perfusão com SDS, um detergente iônico que é amplamente utilizado para tecidos densos, já que são efetivos na solubilização de membranas citoplasmáticas e nucleares (GILBERT, SELLARO e BADYLAK, 2006; HEATH, 2019).

De acordo com Crapo e colaboradores (2003), alguns parâmetros foram preconizados para qualificar se o tecido está descelularizado: a MEC não deve conter mais que 50 ng de DNA/ mg de peso seco, fragmentos de DNA não devem exceder 200 pb e nenhum componente nuclear deve estar visível. Assim, várias técnicas de descelularização são empregadas e o nosso estudo se mostrou como um bom protocolo experimental a ser seguido para avaliação da MEC descelularizada. A quantidade de DNA genômico remanescente do nosso grupo experimental estava dentro do padrão esperado.

Verificou-se a ausência de núcleos celulares por meio da coloração HE, colágeno pelas colorações de Tricromio de Masson, Picrossírius e Método de Wierget-Van Gieson; e, também, a presença de glicosaminoglicanos pelas colorações de Ferro Coloidal e Alcian Blue. Com isso foi possível estimar o volume de colágeno total e GAGs ocupado no ventrículo esquerdo. Como descrito previamente, utilizamos como unidade de estudo o ventrículo esquerdo (VE), para que estas análises pudessem ser o mais fiel quando idealizadas para as aplicações clínicas deste *scaffold*, uma vez que o VE a parte funcional de maior importância médica em intervenções cirúrgicas.

A complacência do órgão, mensuração da capacidade de expansão e retorno ao estado inicial, é de suma importância na avaliação do *scaffold*, já que as cirurgias cardíacas são consideradas de grande porte e necessitam de cuidados intensivos no pós-operatório (FONSECA, VIEIRA & AZZOLIN 2014). Bona (2015) ainda relata que ocorre a redução da complacência mesmo após um transplante cardíaco de sucesso, devido ao uso de fármacos imunossupressores. Neste experimento, avaliou-se a complacência do órgão antes e após o processo de descelularização, onde não foram observadas diferenças significativas entre os corações ambos, reforçando a ideia de um *scaffold* ideal para futuras aplicações clínicas.

Antes de avaliar o processo de descelularização macroscopicamente, decidimos obter informações acerca da complacência do órgão, mensurando a capacidade do mesmo se expandir e voltar ao seu estado inicial. É de suma importância este tipo de avaliação do *scaffold*, já que as cirurgias cardíacas são

consideradas de grande porte e necessitam de cuidados intensivos no pós-operatório (FONSECA, VIEIRA & AZZOLIN 2014). Bona (2015) ainda relata que ocorre a redução da complacência mesmo após um transplante cardíaco de sucesso, devido ao uso de fármacos imunossupressores. Nossos resultados foram promissores neste experimento, não demonstrando diferenças significativas entre os corações antes e após o processo de descelularização. Esta informação reforça a ideia de um *scaffold* ideal para futuras aplicações clínicas, sendo possível a avaliação microscópica desta MEC.

Por meio das análises de imunohistoquímica (IHQ), visualizou-se imunomarcagem positiva para Colágeno tipo I, Elastina e Laminina, o que comprova uma marcação bem específica e a localização destas proteínas no tecido, já que esse resultado é proveniente de uma ligação adequada entre o antígeno e o anticorpo; enquanto na imunofluorescência (IF) também verificou-se uma maior sensibilidade e especificidade dos mesmos anticorpos, o que nos confirma que o *scaffold* manteve essas proteínas da MEC.

A MEC é formada por uma rede de macromoléculas tridimensionais composta por proteínas estruturais (colágenos e elastina), proteoglicanos, proteínas de adesão celular (fibronectina, laminina e outras glicoproteínas) (HILLEBRANDT et al., 2019). O colágeno fornece força às estruturas da MEC enquanto a elastina confere elasticidade mecânica (HEATH, 2019). Já os proteoglicanos são moléculas formadas a partir de glicosaminoglicanos (GAGs), que se ligam covalentemente em feixes proteicos e são responsáveis pela substância amorfa da MEC (SOUZA & PINHAL, 2011).

O colágeno representa o principal componente nos tecidos e órgãos conjuntivos, sendo, também, a proteína mais abundante presente nos mamíferos. Embora haja mais de 20 tipos diferentes de colágenos, 3 deles são bem descritos na literatura no que diz respeito à órgãos descelularizados, sendo eles os colágenos tipos I, III e IV (BROWN et al., 2006; TAYLOR et al., 2018). O colágeno tipo I é a forma mais abundante encontrada no corpo, enquanto o colágeno tipo IV está localizado na membrana basal, e é responsável por fornecer sinais bioativos para as células endoteliais. Já o colágeno tipo III é encontrado nos tecidos e órgão expansíveis, como por exemplo a pele, pulmões e no sistema cardiovascular (HERRERA et al., 2019).

A análise estereológica realizada neste trabalho mostrou que o colágeno total no tecido cardíaco nativo (Controle) foi cerca de 38% do volume total do VE, enquanto

no coração descelularizado foi 30%, sugerindo que o processo de descelularização utilizado preservou as fibras colágenas, mesmo durante sucessivas lavagens com SDS, água destilada e PBS. Infere-se também que este seria um bom biomaterial para recelularização, já que manteve grande parte da sua estrutura tridimensional. Quanto aos GAGs, seu volume total no VE controle foi de % enquanto no coração descelularizado foi de %. Essa informação é extremamente necessária, tendo em vista o importante papel dos GAGs nas interações e processos biológicos, tais como a regulação da atividade de moléculas sinalizadoras, proliferação celular, controle do tráfego de células e moléculas, correceptores, adesão e migração celular, seletividade da membrana basal e resposta imune (SOUZA e PINHAL, 2010).

De acordo com esses resultados obtidos, realizou-se um protocolo de recelularização, a fim de confirmar a qualidade do *scaffold* cardíaco quanto a sua capacidade das células aderirem, para posterior aplicação clínica. Como já descrito por Robertson et al 2014, é provável que o nosso *scaffold* tenha preservado os sinais biológicos associados à MEC, como foi comprovado anteriormente pelas análises de IHQ e IF. A escolha de fibroblasto equino baseou-se no fato de ser uma célula com facilidade de isolamento e alta capacidade de proliferação. A associação das células com a MEC do *scaffold* pode ser comprovada por meio das análises de microscopia eletrônica de varredura, do qual após 24 horas de incubação destas células já foi possível visualizar uma monocamada de células aderidas na superfície do *scaffold*. O mesmo resultado foi visto nas incubações de 48 e 72 horas. Soma-se a este resultado a presença de núcleos marcados por DAPI, na avaliação de 4, 6 e 8 dias. Dessa forma pode-se afirmar que o *scaffold* produzido a partir de corações suínos descelularizados possuem capacidade de serem recelularizados, possibilitando sua aplicação futura na medicina regenerativa.

Considerações finais

Embora o processo de descelularização tenha demorado mais do que os descritos previamente na literatura, nosso protocolo se mostrou eficiente quanto a reter as estruturas da MEC. A estimativa em porcentagem de estruturas da MEC se faz necessário para que o *scaffold* seja tratado de maneira adequada, para manter uma melhor adesão e proliferação celular.

Referências

AKHYARI, P., AUBIN, H., GWANMESIA, P., BARTH, M., HOFFMANN, S., HUELSMANN, J., ... & LICHTENBERG, A. The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 9, p. 915-926, 2011.

ARENAS-HERRERA, J. E., KO, I. K., ATALA, A., & YOO, J. J. Decellularization for whole organ bioengineering. **Biomedical materials**, v. 8, n. 1, p. 014106, 2013.

BONA, Renata Luisa. Comportamento de parâmetros metabólicos, biomecânicos e eletromiográficos na caminhada de indivíduos portadores de insuficiência cardíaca e transplantados cardíacos. 2015.

BROWN, B., LINDBERG, K., REING, J., STOLZ, D. B., & BADYLAK, S. F. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. **Tissue engineering**, v. 12, n. 3, p. 519-526, 2006

CRAPO, P. M., MEDBERRY, C. J., REING, J. E., TOTTEY, S., VAN DER MERWE, Y., JONES, K. E., & BADYLAK, S. F. Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix. **Biomaterials**, v. 33, n. 13, p. 3539-3547, 2012.

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

DE SOUZA, Renan Salvioni; DA SILVA PINHAL, Maria Aparecida. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 36, n. 1, 2011.

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

GUYETTE, J. P., GILPIN, S. E., CHAREST, J. M., TAPIAS, L. F., REN, X., & OTT, H. C. Perfusion decellularization of whole organs. **Nature protocols**, v. 9, n. 6, p. 1451, 2014.

HEATH, D. E. A Review of Decellularized Extracellular Matrix Biomaterials for Regenerative Engineering Applications. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, v. 5, n. 2, p. 155-166, 2019.

HILLEBRANDT, K. H., EVERWIEN, H., HAEP, N., KESHI, E., PRATSCHKE, J., & SAUER, I. M. Strategies based on organ decellularization and recellularization. **Transplant International**, v. 32, n. 6, p. 571-585, 2019.

LEE, P. F., CHAU, E., CABELLO, R., YEH, A. T., SAMPAIO, L. C., GOBIN, A. S., & TAYLOR, D. A. Inverted orientation improves decellularization of whole porcine hearts. **Acta biomaterialia**, v. 49, p. 181-191, 2017.

MIGLINO, M.A., MASSARI, C.H.A., FERREIRA, A. DELGADO, A.L.J. ASSUNÇÃO, M.P., CABRERA, M.L. Anatomia cardíaca aplicada à medicina veterinária [recurso eletrônico] / Catia Helena de Almeida Lima Massari ; Maria Angélica Miglino ; colaboração de Adriano Ferreira da Silva et al. -- São Paulo : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2019.

MOMTAHAN, N., POORNEJAD, N., STRUK, J. A., CASTLETON, A. A., HERROD, B. J., VANCE, B. R., ... & COOK, A. D. Automation of pressure control improves whole porcine heart decellularization. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 21, n. 11, p. 1148-1161, 2015.

Organização Pan-Americana de Saúde. Doenças cardiovasculares. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096> acesso em dezembro de 2020.

OTT, H. C., MATTHIESEN, T. S., GOH, S. K., BLACK, L. D., KREN, S. M., NETOFF, T. I., & TAYLOR, D. A. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. **Nature medicine**, v. 14, n. 2, p. 213-221, 2008.

ROBERTSON, M. J., DRIES-DEVLIN, J. L., KREN, S. M., BURCHFIELD, J. S., & TAYLOR, D. A. Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix. **PloS one**, v. 9, n. 2, 2014.

SÁNCHEZ, P. L., FERNÁNDEZ-SANTOS, M. E., COSTANZA, S., CLIMENT, A. M., MOSCOSO, I., GONZALEZ-NICOLAS, M. A., ... & ESCALANTE, J. L. Acellular human heart matrix: a critical step toward whole heart grafts. **Biomaterials**, v. 61, p. 279-289, 2015.

TAYLOR, D. A., HOCHMAN-MENDEZ, C., ELGALAD, A., & SAMPAIO, L. C. Whole-heart scaffolds—how to build a heart. In: **Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One**. Woodhead Publishing, 2019. p. 617-642.

TAYLOR, D. A., SAMPAIO, L. C., CABELLO, R., ELGALAD, A., PARIKH, R., WOOD, R. P., ... & LEE, P. F. Decellularization of whole human heart inside a pressurized pouch in an inverted orientation. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 141, p. e58123, 2018.

WAINWRIGHT, J. M., CZAJKA, C. A., PATEL, U. B., FREYTES, D. O., TOBITA, K., GILBERT, T. W., & BADYLAK, S. F. (2010). Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(3), 525-532.

WEYMANN, A., LOGANATHAN, S., TAKAHASHI, H., SCHIES, C., CLAUS, B., HIRSCHBERG, K., ... & SZABÓ, G. Development and evaluation of a perfusion decellularization porcine heart model. **Circulation Journal**, v. 75, n. 4, p. 852-860, 2011.

6 CONCLUSÕES

Embora seja amplamente descrito na literatura os processos de descelularização do coração suíno inteiro, ainda se faz necessário estudos acerca de melhores adaptações para que o *scaffold* seja bem caracterizado. Desde a escolha do processo até a finalização dele, temos que reter a maior quantidade de estruturas possíveis para que a recelularização seja um sucesso; assim como entender a dinâmica da MEC frente aos experimentos também é de suma importância para que a mesma consiga ser utilizada futuramente; também se faz necessário compreender e estimar a quantidade de componentes remanescentes como um diferencial na interação das células e também frente aos estímulos recebidos; para melhor esclarecer a interação da célula-MEC no processo de recelularização.

REFERÊNCIAS

- ABUCHAIM, Décio Cavalet Soares. Estudo da anatomia das artérias coronárias humanas. 2000.
- ADAMS, J.; TREASURE, T. Variable anatomy of the right coronary artery supply to the left ventricle. *Thorax*. V. 40, n. 8, p. 618 - 620. 1985.
- ALMEIDA, L.M.; PIRES, C. *Biologia celular : estrutura e organização molecular*. 1. ed. -São Paulo : Érica, 2014.
- ALTEI, W.F. A matriz extracelular (2014). Disponível em: <<http://www.m3c.ufscar.br/pt-br/difusao/matriz-extracelular>>, acesso em novembro de 2017.
- BADYLAK SF, TAYLOR D, UYGUN K. 2011, Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13: 27–53.
- BAPTISTA C.A.C.S. 1986. Distribuição dos ramos das artérias coronárias na superfície ventricular do coração humano. Tese de Mestrado, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo. 193p.
- BLOOR, C. M.; WHITE, F. C.; ROTH, D. M. The pig as a model of myocardial ischemia and gradual coronary occlusion. In: SWINDER, M. M. (Ed.). *Swine as models in biomedical research*, Ames, IA: Iowa State University Press, 1992. p. 163-175.
- 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 maio de 2018.
- BRANCROFT JD, GAMBLE M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th edn. Elsevier, Philadelphia. 2008.
- BURG, K.J. et al. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.21, n.23, 2347-2359, 2000.
- CRAPO PM, GILBERT TW, BADYLAK SF. 2011, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials*, 32: 3233–3243.
- CUNHA, M. Departamento Técnico Ourofino Agronegócio. Reportagem revista veja, disponível em: <http://veja.abril.com.br/blog/genetica/sem-categoria/o-que-sao-xenotransplantes/>, acesso em maio de 2018.
- DE CARVALHO, Ana Clara Alves et al. Estratégias regenerativas da bioengenharia tecidual e aspectos éticos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 20-27, 2010.

DIDIO, L. J. A.; JATENE, F. B.; ASSAD, R. S.; CHAGAS, A. C. P.; MONTEIRO, R.; FREITAS, R. R.; ABDUCH, M. C. D.; JATENE, A. D. Anatomicaosurgical segmentectomy of the left ventricle for systematized partial resection of the heart: an experimental study. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* V. 13, n. 4, p. 368-374. 1998.

DIDIO, L. J. A.; WAKEFIELD, T. W. Coronary arterial predominance or balance on the Surface of Human Cardiac Ventricles. *Anat. Anz. Bd.* V. 137, n.1, p. 147-158, 1975.

DIDIO, L. J.A.; RODRIGUES, H. Cardiac segments in the human heart. *Anat. Clin.* V. 5, n. 1, p. 115-124, 1983.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Análise e Emissão de Laudos Eletrocardiográficos. *Arq Bras Cardiol* 2016; 93 (3 supl.2) 1-19

DIVOUX, A.; CLEMENT, K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. **obesity reviews**, v. 12, n. 5, 2011.

FALCI, R. J.; CABRAL, R. H.; PRATES, N. E. V. Tipos de circulação e predominância das artérias coronárias em corações de brasileiros. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* V. 8, n. 2, p. 152 -162. 1993.

FALCI, R. J.; PRATES, N. E. V. Anatomia das artérias coronárias. *Rev. Med.* V. 72, n. 1, p. 21 -24, 1994.

FERREIRA, Ana Rita Pereira Alves; SILVA, Manuel Vaz da; MACIEL, Julia. Eletrocardiograma no Infarto Agudo do Miocárdio: O que Esperar?. **Int. j. cardiovasc. sci.(Impr.)**, v. 29, n. 3, p. f: 198-l: 209, 2016.

FIGUINHA, F. Áreas eletricamente inativas. Disponível em: <https://cardiopapers.com.br/curso-basico-de-eletrocardiograma-parte-12-areas-inativas/> acesso em dezembro de 2018.

FLYNN L, SEMPLE JL, WOODHOUSE KA. Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering, *Journal of biomedical materials research. Part A*, 79: 359–69, 2006.

GARDNER, T. J.; JOHNSON, D. L. Cardiovascular system. In: SWINDLE, M. M.; ADAMS, R. J. (Ed.). *Experimental surgery and physiology: induced animal models of human disease*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1988. p. 74-124.

GILBERT TW, SELLARO TL, BADYLAK SF. Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials*, 27: 3675–3683. 2006.

GOLDBERG, M. et al. Proteoglycans in predentin: the last 15 micrometers before mineralization. **Connective Tissue Research**, v.44, p.184-188, 2003.

GOMES, M.E. et al. Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells culture on starch-based threedimensional scaffolds. **Journal Biomedical Materials Research**, v.67A, p.87-95, 2003

GORGELS AP, ENGELN DJ, WELLENS HJ. The Electrocardiogram in acute myocardial infarction. In: Fuster V, O'Rourke A, Walsh RA, Poole-Wilson P. Hurst's - the heart. 12th ed. New York: The McGraw-Hill Companies; 2008. p. 1351-60

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 abril de 2018.

HAFEZ, E. S. E. 2001. Reprodução animal. Manole, São Paulo, 582pp
HONG JW, LEE WJ, HAHN SB, KIM BJ, LEW DH. The effect of human placenta extract in a wound healing model, **Annals of plastic surgery**, 65: 96–100. 2010.

HUGHES H.C. 1986. Swine in cardiovascular research. *Lab. Anim. Sci.* 36 (4):348-350.

JUNG J, LEE H-J, LEE JM, NA K-H, HWANG S-G, KIM GJ. Placenta extract promote liver regeneration in CCl4-injured liver rat model, **International immunopharmacology**, 11: 976–84. 2011.

KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. **J. Dent. Educ.**, v.65, n.5, p.456-462, 2001.

KEANE TJ, SWINEHART IT, BADYLAK SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance, **Methods**, 84: 25–34. 2015.

KEANE, TJ; BADYLAK, SF (2015), A resposta do hospedeiro aos materiais de andaimes biológicos alogênicos e xenogênicos . *J Tissue Eng Regen Med* , 9 , 504 - 511 . doi: 10.1002 / term.1874.

KYRIAKIDIS, M; PANAGHIOTIS. P.; ANDROULAKIS, A.; ANTONOPOULOS, A.; APOSTOLOPOULOS T.; BARBETSEAS, J.; VYSSOULIS, G; TOUTOUZAS, P. Sex differences in the anatomy of coronary artery disease. *J. Clin. Epidemiol.* V. 48, n. 6, p. 723 - 730.1995.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v.260, n.5110, p.920-926, 1993.

LAZAR, EJ, GOLDBERGER J, PELED H, SHERMAN N, FRISHMAN WH. Atrial infarction: diagnosis and management. *Am Heart J.* 1988;116(4):1058-63.

LEONEL, Luciano César Pereira Campos. **Produção e caracterização de biomateriais acelulares bioativos obtidos a partir da decelularização de placentas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LIMA, C.R. Matrix Extracelular I. Disponível em: <<http://lab-siviero.icb.usp.br/biocel/modulos/matriz-extracelular-parte-1/#Matriz-extracelular-composicao-molecular-e-organizacao>> , acesso em novembro de 2017.

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 abril de 2018.

LOPEZ-SENDON J, COMA-CANELLA I, ALCASENA S, SEOANE J, GAMALLO C. Electrocardiographic findings in acute right ventricular infarction: sensitivity and specificity of electrocardiographic alterations in right precordial leads V4R, V3R, V1, V2, and V3. *J Am Coll Cardiol*. 1985;6(6):1273-9.

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 maio de 2018.

MANDARIM, C. A. Vascularização arterial e venosa, drenagem linfática e inervação do coração. In: *Anatomia do Coração. Clínica e Cirúrgica*. Rio de Janeiro. Revinter. 1990. P. 78-108.

MOLLA, M. R. et al. General Principles of Bone Grafting in Maxillofacial Surgery. *The ORION*, 8, Janeiro 2001.

MOURA JUNIOR, Paulo C. et al. Estudo anatômico das artérias coronárias de suínos Landrace. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 2, p. 103-107, Feb. 2008. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2008000200002&lng=en&nrm=iso>. access on 06 Jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008000200002>.

NERANTZIS, C. E.; PAPACHRISTOS, J. E.; VOUDRIS, V. A.; INFANTIS, G. P.; KOROGENIDES, G.T. Functional dominance of the right coronary artery: incidence in the human heart. *Clin. Anat.* V. 9 n. 10, p. 10-13. 1996.
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 abril de 2018.

O'BRIEN, FERGAL J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials today**, v. 14, n. 3, p. 88-95, 2011.

OLERUP O, ZETTERQUIST H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation, **Tissue Antigens**, 39: 225–235. 1992.

ORLANDINI, G. E. La Circonferenza rettificata delle arterie coronarie: ricerca statistica su 200 cuori umani. *Mal. Cardiovasc.* V. 9, n. 3, p. 332 - 361. 1968.

OSÓRIO JUNIOR, Haroldo Abuana. **Estudo da descélularização tecidual na produção de arcabouços biológicos para enxertos**. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

PAULA, F.L.et al. Hidroxyapatite-alginate biocomposite promotes bone mineralization in different lenght scales in vivo. **Front. Mater. Sci. China**, v.3, n.2, p.145-153, 2009.

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 abril de 2018.

PESARO, A. E. P.; SERRANO, C. V.; NICOLAU, J. C. Infarto agudo do miocárdio: síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. **Rev Assoc Med Bras**, v. 50, n. 2, p. 214-20, 2004.

PLATT J., DISESA V., GAIL D. & MASSICOT-FISHER J. 2002. Recommendations of the National Heart, Lung, and Blood Institute Heart and Lung Xenotransplantation Working Group. *Circulation* 106:1043.

SCHLESSINGER, M. J. Significant variations in the anatomic pattern of the coronary vessels. *Blood Heart Circul.* V. 13, n. 1, p. 93-97, 1940.

SHALAK, R.; FOX, C. 1988. **Tissue engineering proceedings**. Workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, Alan Liss, New York.

SWINDLE, M. M.; ADAMS, R. J. Experimental surgery and physiology: induced animal models of human disease. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1988. 350 p.

TORTORA, GERARD J. Princípios de anatomia e fisiologia / Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson; tradução Ana Cavalcanti C. Botelho... [et al.]. – 14. ed. – [Reimpr.]. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. il.

VASKO, J. S.; GUTELIUS, J.; SABISTON, D. C. A study of predominance of human coronary arteries determined by arteriographic and perfusion technics. *Amer. J. Cardiol.* V. 8, n. 2, p. 379-384. 1961.

VELIDANDLA S, GAIKWAD P, EALLA KKR, BHORGONDE KD, HUNSINGI P, KUMAR A. Histochemical analysis of polarizing colors of collagen using Picrosirius Red staining in oral submucous fibrosis, **Journal of international oral health : JIOH**, 6: 33–8. 2014.

WALLIS JM, BORG ZD, DALY AB, DENG B, BALLIF BA, ALLEN GB, *et al.* 2012, Comparative Assessment of Detergent-Based Protocols for Mouse Lung Decellularization and Re-Cellularization, **Tissue Engineering Part C: Methods**, 18: 420–432.

WEAVER, M. E.; PANTELY, G. A.; BRISTOW, D.; LADDLEY, H. D. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc. Res.* V. 20, n. 12, p. 907-917, 1986.

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 abril de 2018.

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 de maio 2018.

ZOLL, P M. Normal and pathological anatomy of the coronaries. *Trans. Amer. Coll. Cardiol.* V. 1, n. 1, p. 29 - 43, 1951.