

IGOR SMIRNOW CORDEIRO

**PRODUÇÃO DE ENXERTOS ÓSSEOS A PARTIR DA PLACENTA BOVINA
DESCELULARIZADA**

SÃO PAULO

2023

IGOR SMIRNOW CORDEIRO

**PRODUÇÃO DE ENXERTOS ÓSSEOS A PARTIR DA PLACENTA BOVINA
DESCELULARIZADA**

VERSÃO CORRIGIDA

Tese de Doutorado Direto apresentada ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento: Cirurgia

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Da Silva Nunes Barreto

SÃO PAULO

2023

Ficha Catalográfica

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)

4317
FMVZ

Cordeiro, Igor Smirnow
Produção de enxertos ósseos a partir da placenta bovina descellularizada / Igor Smirnow Cordeiro. – 2023.
74 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2023.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Nunes Barreto.

1. Bioengenharia de tecidos. 2. Hidrogel. 3. Medicina Regenerativa.
4. Recelularização. I. Título.

Certificado de Comissão de Ética



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 30 de março de 2023
CEUAx N 7877200622

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Rodrigo Da Silva Nunes Barreto

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Equipe envolvida: Igor Smimow Cordeiro - (executante);

Título da proposta: "PRODUÇÃO DE ENXERTOS ÓSSEOS A PARTIR DA PLACENTA BOVINA DESCELULARIZADA".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, na reunião de 19/10/2022, **ANALISOU** e **APROVOU** a proposta acima referenciada. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da proposta.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão da proposta.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Certificado de Comissão de Ética



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

São Paulo, 30th March 2023

CERTIFIED

We certify that the proposal entitled: "*Bone grafts production f.r.o.m decellularized bovine placenta*", protocol number CEUAX 7877200622 (ID 002349), under the responsibility Rodrigo Da Silva Nunes Barreto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day October 19, 2022.

Certificamos que a proposta intitulada: "*PRODUÇÃO DE ENXERTOS ÓSSEOS A PARTIR DA PLACENTA BOVINA DESCELULARIZADA*", protocolado sob o CEUAX nº 7877200622, sob a responsabilidade de Rodrigo Da Silva Nunes Barreto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 19 de outubro de 2022.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SMIRNOW, IGOR CORDEIRO

Título: Produção de Enxertos Ósseos a partir da Placenta Bovina Descelularizada

Tese de Doutorado Direto apresentada ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

À minha mãe, Maria Angela Smirnow Cordeiro e ao meu pai, Adilson Cordeiro, por me apoiarem e sempre me darem a estrutura necessária para que eu pudesse realizar meus sonhos. Eu amo vocês!

À minha cachorra, Nanica, que me proporcionou várias lembranças, as quais levarei para toda a vida e, que, por diversos momentos da minha infância, foi a única amizade verdadeira que tive.

Por fim, dedico este trabalho a todos os animais que serviram de estudos para a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Angela Smirnow Cordeiro e Adilson Cordeiro, e à minha irmã, Paola Smirnow Cordeiro, por sempre me apoiarem durante esta jornada na pós-graduação.

Aos meus melhores amigos, Rafael Rodrigues, Maurício Oliveira e Caio Victor, os quais conheci diretamente (Rafael e Maurício) e indiretamente (Caio) devido à pós-graduação. Agradeço imensamente pelo companheirismo, conselhos, conversas, risadas, intermináveis conversas de madrugada, em momentos bons e ruins, que, com certeza, fizeram a diferença na minha vida.

Às amigadas que construí na pós-graduação: Henrique Inhauser, Lucas Rosestolato, Thalles Duarte, Tarley Oliveira, Kadija Santee, Marcella Kato, Bruna Pantoja, Letícia Fernandes, Cristiano Ribas e Eduardo Lebre, pelas conversas, risadas, aprendizados, companheirismo e todo o apoio no desenvolvimento do meu projeto.

Aos técnicos de laboratório Ronaldo Agostinho e Rose Eli Grassi, por todo o auxílio prestado e ensinamentos desde o meu começo da iniciação científica, em 2016.

À técnica de laboratório, Rosana Aparecida, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Obrigado por sempre me recepcionar bem no seu laboratório, além de estar sempre à disposição. Sua ajuda foi enorme para a obtenção do hidrogel liofilizado.

À Maria Sozio, a qual tive o enorme prazer de conhecer na UNISA, no curso de Medicina Veterinária, e a felicidade, ainda maior, de vir a ser minha namorada. Obrigado pela companhia, conversas e todo o carinho. Graças a você, o final do meu período na pós-graduação foi bem mais leve do que eu imaginaria.

Ao PPGADS, em conjunto a todos os professores, os quais possibilitaram o desenvolvimento do meu projeto.

Ao CNPq pelo financiamento da bolsa de doutorado processo 142197/2019-0.

Por fim, mas obviamente não menos importante, ao meu orientador, Professor Dr. Rodrigo da Silva Nunes Barreto. Lembro-me de você estar sempre me orientando, mesmo durante a minha primeira iniciação científica, em que eu não era oficialmente seu orientando. Além dos ensinamentos e primeiros momentos no departamento, guardo ótimas lembranças. Uma delas corresponde aos meus primeiros dias no departamento, especificamente no laboratório de histologia, onde eu estava a começar o processamento de amostras para microscopia de luz e, ao cortar as amostras para o início do processamento, você me disse: “quando for cortar, não faça o movimento de vai e vem, pois isso pode mudar a estrutura do tecido”. Pode soar como uma lembrança boba, mas sempre que estive no laboratório de histologia ao longo desses quase 7 anos, toda vez que precisei preparar uma amostra, ou auxiliar alguém, me vem essa lembrança na cabeça; não só porque ela é útil para a melhor preservação das amostras, mas também porque você sempre esteve preocupado em me ensinar, não só ensinar por ensinar, mas me ensinar com algum propósito. Agradeço pelo fato de você ser um orientador de verdade, não só uma pessoa com nome no papel, mas alguém que de fato orientou e, quando necessário, sempre foi comigo ao laboratório para a realização de experimentos. Sou extremamente grato por você ter contribuído, de forma gigantesca, não apenas com o meu desenvolvimento científico, mas também com a minha formação como pessoa. De coração, muito obrigado pelos ensinamentos nesses quase 7 anos.

RESUMO

SMIRNOW, I.C. **Produção De Enxertos Ósseos A Partir Da Placenta Bovina Descelularizada**. 2023, 73 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

Grandes defeitos ósseos, geralmente causados por: traumas, osteomielite, fraturas geradas por osteoporose, malformação congênita e ressecções de tumores, apresentam a característica de não possuírem a capacidade de autorreparo ósseo, necessitando-se assim de enxertos. A utilização de enxertos para o preenchimento desses defeitos, é baseado em aloenxertos, polímeros sintéticos biodegradáveis ou não degradáveis. Entretanto, o uso desses materiais apresenta limitações, o que resulta na busca de novos materiais para cumprir tal função, sendo uma boa opção aqueles derivados da bioengenharia tecidual. Através da bioengenharia, busca-se produzir enxertos ósseos por meio da recelularização de biomateriais ou hidrogéis. Uma fonte alternativa para produção de ambos os materiais seria a placenta bovina, que demonstra manutenção dos componentes essenciais na matriz extracelular após a descclularização, permitindo adesão e manutenção celular. Assim, o objetivo deste projeto é utilizar cotilédones bovinos descclularizados, como biomateriais estruturalmente naturais ou hidrogéis. Com intuito de produção de biomateriais ósseos funcionalizados estes biomateriais podem ser associados a células tronco mesenquimais caninas diferenciadas à linhagem óssea. Para tanto, foram utilizados cotilédones provenientes de 10 gestações bovinas que foram descclularizados, validados como biomaterial e utilizados para produção de hidrogéis (por meio de digestão enzimática e gelificação). Tanto os biomateriais descclularizados como os hidrogéis foram recelularizados com células tronco mesenquimais caninas derivadas de tecido adiposo (caracterizadas de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular). Após o término do processo de descclularização, foi possível validar o *scaffold* placentário em biomaterial, sendo observado a preservação dos componentes da matriz extracelular e remoção das células, tais parâmetros que são propostos pela literatura. Os biomateriais mostraram-se receptivos as células tronco mesenquimais e células tronco mesenquimais em diferenciação para linhagem osteogênica, mostrando que, ao dia 25, repopularam o biomaterial. Ainda, na diferenciação das células tronco mesenquimais sobre biomateriais foi possível

também observar presença de depósitos de cálcio. Foi possível realizar a produção de um hidrogel com adição de alginato a 8% e 12%, onde a maior concentração de alginato aparentou melhor estrutura, permitindo uma melhor recepção as células tronco mesenquimais. Dessa forma, os biomateriais mostram-se com potencial uso futuro para o tratamento de lesões ósseas na medicina veterinária, visto que estas células indiferenciadas podem diferenciar-se em células específicas para o processo de reparo ósseo, ou as células osteoprogenitoras podem acelerar o processo de cicatrização.

Palavras-Chave: Bioengenharia de tecidos. Hidrogel. Medicina Regenerativa. Recelularização.

ABSTRACT

SMIRNOW, I.C. **Bone grafts production from decellularized bovine placenta.** 2023, 73 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

Large bone defects, usually caused by: trauma, osteomyelitis, fractures caused by osteoporosis, congenital malformation and tumor resections, have the characteristic of not having the capacity for bone self-repair, thus requiring grafts. The use of grafts to fill these defects is based on allografts, biodegradable or non-degradable synthetic polymers. However, the use of these materials has limitations, which results in the search for new materials to fulfill this function, with those derived from tissue bioengineering being a good option. Bioengineering aims to produce bone grafts through the recellularization of biomaterials or hydrogels. An alternative source to produce both materials would be the bovine placenta, which demonstrates extracellular matrix essential components maintenance after decellularization, allowing cell adhesion and maintenance. Thus, the objective of this project is to use decellularized bovine cotyledons, as structurally natural biomaterials or to produce hydrogels. To produce functionalized bone biomaterials, these biomaterials can be associated with canine mesenchymal stem cells differentiated from the bone lineage. For this purpose, cotyledons from 10 bovine pregnancies were used, which were decellularized, validated as a biomaterial and used to produce hydrogels (through enzymatic digestion and gelation). Both the decellularized biomaterials and the hydrogels were recellularized with canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (characterized according to the International Society for Cell Therapy). After the end of the decellularization process, it was possible to validate the placental scaffold as biomaterial, observing the preservation of extracellular matrix components and cells removal, such parameters that are proposed in the literature. The biomaterials were receptive to mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells in differentiation for osteogenic lineage, showing that, on day 25, they repopulated the biomaterial. Furthermore, in the differentiation of mesenchymal stem cells on biomaterials, it was also possible to observe the presence of calcium deposits. It was possible to produce a hydrogel with the addition of alginate at 8% and 12%, where the highest concentration of alginate appeared to be better structured, allowing better

reception of mesenchymal stem cells. Thus, biomaterials show potential future use for the treatment of bone lesions in veterinary medicine, as these undifferentiated cells can differentiate into specific cells for the bone repair process, or osteoprogenitor cells can accelerate the process of bone repair.

Keywords: Hydrogel. Recellularization. Regenerative Medicine. Tissue bioengineering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho Experimental.	31
Figura 2 - Estrutura dos Cotilédones Antes e Após a Descelularização.	40
Figura 3 – Avaliação de proliferação de microrganismos.	42
Figura 3 – Avaliação de Diferenciação Celular	43
Figura 4 – Imunofluorescência das Células Tronco Mesenquimais	44
Figura 5 – Hidrogéis.	45
Figura 6 – Avaliação ultraestrutural dos hidrogéis.	46
Figura 7 – Avaliação de recelularização dos biomateriais recelularizados após 15 dias de cultivo (BMR 15D) e dos biomateriais recelularizados com células osteogênicas após 15 dias de cultivo(BMRO 15).	49
Figura 8 – Avaliação de recelularização dos biomateriais recelularizados após 25 dias de cultivo (BMR 25D) e dos biomateriais recelularizados com células osteogênicas após 25 dias de cultivo (BMRO 25D).	50
Figura 9 – Avaliação do hidrogel após a recelularização.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicação Dos Métodos De Descelularização.

20

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1.	BIOENGENHARIA DE TECIDOS	19
2.1.1.	Descelularização	19
2.1.2.	Esterilização	22
2.1.3	Recelularização	22
2.1.4.	Hidrogel	24
2.2.	BIOENGENHARIA ÓSSEA	25
2.3.	A PLACENTA NA BIOENGENHARIA DE TECIDOS	27
3.	OBJETIVOS	29
3.1.	OBJETIVO GERAL	29
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4.	HIPÓTESE	29
5.	JUSTIFICATIVA	30
6.	METODOLOGIA	31
6.1.	DESENHO EXPERIMENTAL	31
6.2.	COLETA DE MATERIAL	32
6.3.	PROTOCOLO DE DESCELULARIZAÇÃO	32
6.4.	VALIDAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO	32
6.5.	ESTERILIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO	33
6.6.	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAS PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO CANINO	34
6.7.	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAS	35
6.7.1.	Capacidade de aderência ao plástico	35
6.7.2.	Expressão de antígenos específicos de superfície	35
6.7.3.	Capacidade de diferenciação multipotente	36
6.8.	PRODUÇÃO DO HIDROGEL	37
6.9.	AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO HIDROGEL	37

6.10.	RECELULARIZAÇÃO DOS COTILÉDONES DESCELULARIZADOS	37
6.11.	RECELULARIZAÇÃO DO HIDROGEL	38
6.12.	AVALIAÇÃO DOS BIOMATERIAIS APÓS A RECELULARIZAÇÃO.	38
7.	RESULTADOS	40
7.1.	VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO	40
7.2.	ESTERILIZAÇÃO DO BIOMATERIAL	41
7.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS	41
7.3.	AVALIAÇÃO DO HIDROGEL	44
7.4.	AVALIAÇÃO DOS BIOMATERIAIS APÓS A RECELULARIZAÇÃO.	46
8.	DISCUSSÃO	52
9.	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

A bioengenharia de tecidos baseia-se em conhecimentos da biologia, química e da engenharia para a produção de materiais com propósito de devolver ou reparar função fisiológica de órgão ou parte dele. Uma das formas de produção de biomateriais, com estrutura personalizada, seria através do desenvolvimento de hidrogéis, sendo formulados com componentes da matriz extracelular que, podem incorporar aditivos para melhora estrutural, associados ou não, com células de interesse.

Para defeitos e/ou fraturas de tecido ósseo muitas vezes são necessários enxertos de maiores dimensões, e os biomateriais podem se apresentar como uma solução clínica em distintas situações. Nesses casos, atualmente para preenchimento e reparação de defeitos ósseos são principalmente utilizados os enxertos ósseos alogênicos ou polímeros sintéticos. O uso dos enxertos autólogos apresenta como principal aspecto positivo o risco (praticamente) nulo de rejeição imunológica. Entretanto, tem como aspectos negativos a necessidade de procedimento cirúrgico adicional, morbidez do paciente e principalmente a limitação dimensional. Por outro lado, os polímeros sintéticos, de modo geral, ou não apresentam boa integração ao tecido ósseo ou podem ser absorvidos antes de findado o processo de reparação.

Dessa forma, têm-se buscado novos materiais para o tratamento de defeitos ósseos, sendo uma boa alternativa aqueles produzidos por meio da bioengenharia de tecidos, visando a promover a reparação óssea. Dessa forma, temos como hipótese que biomateriais e/ou biogéis derivados de cotilédones bovinos descelularizados, tem capacidade de serem um microambiente capaz de promover aderência e desenvolvimento de células tronco mesenquimais durante diferenciação em linhagem osteogênica, possibilitando a criação de um biomaterial ósseo funcionalizado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BIOENGENHARIA DE TECIDOS

A bioengenharia de tecidos é uma área a qual é embasada em conhecimentos biológicos, químicos e de engenharia para desenvolver enxertos biológicos que possam devolver, manter ou melhorar a função fisiológica de uma área lesionada (GASQUE *et al.*, 2011; HUSSEIN *et al.*, 2016; LANGER; VACANTI, 1993; LEONEL, 2016; PALONE; SILVA; DALBEN, 2015). Para alcançar tal objetivo é necessária a utilização de biomateriais que são desenvolvidos para desempenhar as atividades específicas e/ou adaptar-se a um determinado órgão (LEONEL, 2016).

Os biomateriais podem ser definidos, de acordo com a sua elaboração, como sintéticos ou biológicos (LEONEL, 2016). Os biomateriais sintéticos são produzidos através de polímeros sintéticos, por exemplo: poliacrilamida (TILGHMAN *et al.*, 2012) e o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (FISCHBACH *et al.*, 2007); entretanto, esses biomateriais não apresentam a mesma complexidade estrutural de um órgão natural (XIANG *et al.*, 2015). Enquanto os biomateriais biológicos são produzidos através do processo de descelularização, junto ou não com a recelularização ou produção de hidrogéis a partir de componentes da matriz extracelular (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; HUSSEIN *et al.*, 2016; LEONEL, 2016; MORRIS; CHANG; KYRIAKIDES, 2016).

2.1.1. Descelularização

A descelularização é uma técnica baseada na retirada dos componentes intracelulares de um órgão, visando a manutenção da integridade e organização tridimensional da matriz extracelular (MEC) (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; HUSSEIN *et al.*, 2016; LEONEL *et al.*, 2017; MORRIS; CHANG; KYRIAKIDES, 2016). As características estruturais e moleculares do órgão, tais como: consistência, espessura, teor lipídico, celularidade, capacidade de perfusão via sistema vascular, são essenciais para a escolha do método de descelularização. E esses métodos podem ter como base agentes físicos, biológicos e/ou químicos (Tabela 1) (ARENAS-HERRERA *et al.*, 2013; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; FU *et al.*, 2014;

GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; LEONEL *et al.*, 2017). Os métodos físicos baseiam-se principalmente no congelamento e descongelamento, gradientes de pressão e aplicação de ondas sonoras em soluções aquosas. Os métodos biológicos utilizam enzimas como, por exemplo, nucleases, tripsina e lipases, entre outras. Por fim, os métodos químicos utilizam ácidos e bases, soluções hipotônicas e hipertônicas, detergentes, álcool, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), entre outros (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015; LEONEL, 2016; RANA *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Aplicação dos métodos de descelularização.

Método de Descelularização	Agente Descelularizante	Aplicabilidade	Prós/Contras	Refs.
Físico	Ciclos de Congelamento e Descongelamento	Útil para tecidos mecanicamente resistentes	<ul style="list-style-type: none"> - Minimiza a quantidade de agentes químicos utilizados; - Perda não significativa de componentes da MEC; - Não remoção completa das células; - Necessidade de complementação de outros agentes descelularizantes. 	(GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; HOPKINSON <i>et al.</i> , 2008; K M BULLARD, M J BANDA, J M ARBEIT, E BERGLAND, 1997; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015; KIM <i>et al.</i> , 2019; NING <i>et al.</i> , 2012a; PATEL <i>et al.</i> , 2008)
	Abrasão mecânica	Remoção superficial de células	<ul style="list-style-type: none"> - Permite a remoção das camadas celulares superficiais; - Danificação da membrana basal e estruturas subjacentes. 	(CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GENICIO; GALLO PARAMO; SHORTT, 2015; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; HOPKINSON <i>et al.</i> , 2008; PITERINA <i>et al.</i> , 2009)
Biológico	Proteases	Remoção superficial de células	<ul style="list-style-type: none"> - Permite a quebra das ligações entre célula-célula e célula-MEC; - Exposição prolongada resulta na degradação das fibras colágenas e elásticas 	(BROWN <i>et al.</i> , 2011; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015; MEYER <i>et al.</i> , 2006; PRASERTSUNG <i>et al.</i> , 2008; YANG <i>et al.</i> , 2009)
	Nucleases	Remoção dos ácidos nucleicos	<ul style="list-style-type: none"> - Hidrolisam os ácidos nucleicos persistentes ao final do processo de descelularização; - Mostra-se difícil de ser removido do tecido; - Custo elevado quando comparado aos outros agentes descelularizantes. 	(CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; ELDER; KIM; ATHANASIOU, 2010; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; HUSSEIN <i>et al.</i> , 2016; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015; MATSUSHIMA <i>et al.</i> , 2014; ONISHI <i>et al.</i> , 2018; PETERSEN <i>et al.</i> , 2010)
Químico	Ácidos e Bases	Degradação das células por pH extremo	<ul style="list-style-type: none"> - Dissociam o DNA remanescente; - Promovem a solubilização dos componentes citoplasmáticos; - Degradação dos componentes fibrosos e 	(ARENAS-HERRERA <i>et al.</i> , 2013; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; DE FILIPPO; YOO; ATALA, 2002; FREYTES <i>et al.</i> , 2004; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; KEANE;

		substância fundamental amorfa.	SWINEHART; BADYLAK, 2015)
Detergentes	Solubilização da membrana plasmática das células	- Agente descelularizante com maior eficácia; - Exposição prolongada e elevadas concentrações, podem resultar na degradação de fibras colágenas, fatores de crescimentos e glicosaminoglicanos	(BARRETO <i>et al.</i> , 2018; FAULK; WILDEMANN; BADYLAK, 2015; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015; MATIAS <i>et al.</i> , 2018; PALONE; SILVA; DALBEN, 2015)
Álcoois	Promove a desidratação das células	- Promovem a lise celular e a retirada de lipídios do tecido - Geram alterações morfológicas e biomecânicas	(HUSSEIN <i>et al.</i> , 2016; LUMPKINS; PIERRE; MCFETRIDGE, 2008; PONCE MÁRQUEZ <i>et al.</i> , 2009; XU; CHAN; TIRUNAGARI, 2007)
Soluções hipotônicas e hipertônicas	Promove choque osmótico nas células	- Geram poucas alterações na MEC - Necessidade de utilizar outros agentes descelularizantes	(CONKLIN <i>et al.</i> , 2002; ROSARIO <i>et al.</i> , 2008; ROSS <i>et al.</i> , 2009; XU; CHAN; TIRUNAGARI, 2007)

Fonte: Smirnow, 2023

Legenda: descrição dos principais métodos de descelularização, avaliando sua aplicabilidade, suas vantagens e desvantagens

Após o processo de descelularização, para ser considerado como um biomaterial com possível utilidade clínica, alguns parâmetros devem ser alcançados, tais como: teor de DNA genômico menor que 50 ng por mg seca de matriz extracelular; não apresentar núcleos visíveis em colorações com Hematoxilina-Eosina (HE) e 4',6-diamidino-2-phenylidole (DAPI); e se apresentar DNA genômico remanescente, estes devem ter fragmentos inferiores 200 pb (FAULK; WILDEMANN; BADYLAK, 2015; HUSSEIN *et al.*, 2016; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015; LEONEL, 2016).

Devido ao processo de descelularização ter como objetivo a retirada das células do tecido, o *scaffold* deixa de apresentar expressão gênica, mantendo apenas os componentes da matriz extracelular que são conservados do ponto de vista evolutivo (BADYLAK; FREYTES; GILBERT, 2009; BERNARD *et al.*, 1983; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; ÖZBEK *et al.*, 2010). Dessa forma, abre-se um enorme campo para o desenvolvimento de xenotransplantes, visto que não ocorreria, a princípio, uma resposta imunológica ao receptor do transplante. Assim, tem-se desenvolvido biomateriais de espécies originárias diferentes para aquelas receptoras (AMINI; LARI, 2021; CAPELLA-MONSONÍS; ZEUGOLIS, 2021; CHENG *et al.*, 2020).

2.1.2. Esterilização

Com o término da descelularização e tendo o intuito de recelularizar o biomaterial, ou utilizá-lo *in vivo*, é necessário realizar a esterilização. Esse processo visa realizar a eliminação de endotoxinas, DNA bacteriano, de fungos e de vírus, juntamente com o intuito de preservar a estrutura da matriz extracelular (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; DESTEFANI; SIRTOLI; NOGUEIRA, 2017; FEDECOSTANTE *et al.*, 2017; HUSSEIN *et al.*, 2016; KARCZEWSKI; MALKIEWICZ, 2015; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

Para a realização da esterilização, atualmente podem ser utilizados os seguintes agentes: soluções ácidas, irradiação gama, óxido de etileno, irradiação de feixes de elétrons e dióxido de carbono supercrítico (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; DESTEFANI; SIRTOLI; NOGUEIRA, 2017; FEDECOSTANTE *et al.*, 2017; HUSSEIN *et al.*, 2016; KARCZEWSKI; MALKIEWICZ, 2015). Dentro das opções de soluções ácidas o ácido peracético se destaca porque além de ser um agente descelularizante, também atua nas endotoxinas, microrganismos e vírus, porém pode causar leves danos a matriz extracelular (FEDECOSTANTE *et al.*, 2017). As formas de radiações anteriormente citadas e o óxido de etileno causam a alteração da estruturação da matriz extracelular (desnaturação de fibras colágenas e diminuição da quantidade de glicosaminoglicanos), além de também afetar lipídios residuais, tornando-os tóxicos (ação da radiação gama), e por fim, também afetam a proliferação celular. O dióxido de carbono supercrítico atua principalmente em bactérias, fungos e vírus, não deixando resíduos tóxicos no biomaterial, entretanto, causam leves modificações estruturais da matriz extracelular (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; DESTEFANI; SIRTOLI; NOGUEIRA, 2017; FEDECOSTANTE *et al.*, 2017; HUSSEIN *et al.*, 2016; KARCZEWSKI; MALKIEWICZ, 2015; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015). Uma vez esterilizado, o biomaterial pode ser então recelularizados.

2.1.3 Recelularização

A recelularização é um método que apresenta os princípios de distribuir as células desejadas por todo o biomaterial, buscando um posicionamento celular semelhante ao órgão *in vivo*, com o intuito de estabelecer a função natural do órgão

(BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011; GUAN *et al.*, 2015; STOLTZ *et al.*, 2017; WELMAN *et al.*, 2015). Para a realização desse processo, a recelularização conta com técnicas adaptadas do cultivo celular, terapia celular, engenharia de tecidos e perfusão de órgãos isolados. (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011). Para tanto, é importante realizar a escolha correta do tipo celular, densidade celular, estratégia de distribuição das células (injeção, perfusão ou imersão), e as condições do cultivo celular (nutrição, suplementos, concentração de oxigênio, temperatura, umidade, pH e estímulos biofísicos) (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011; MOSER; OTT, 2014; WANG *et al.*, 2015, 2017).

Devido a interação entre as células e a matriz extracelular, a escolha do estado de diferenciação, fonte e tipo celular é de extrema importância, visando melhores resultados no repovoamento e funcionalidade do biomaterial (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011). Quanto ao estado de diferenciação das células podemos ter as células tronco embrionárias (pluripotentes), células tronco pluripotentes induzidas, as células tronco mesenquimais (multipotentes) ou mesmo as células diferenciadas (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011; BILODEAU *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2014; MOSER; OTT, 2014; SCARRITT; PASHOS; BUNNELL, 2015; VINATIER; GUICHEUX, 2016).

As células tronco mesenquimais são multipotentes e derivadas de tecido de origem mesodérmica (ANASIZ; OZGUL; UCKAN-CETINKAYA, 2017; KOBOLAK *et al.*, 2016), podendo então ser obtidas em diversas fontes, tais como: tecido adiposo, medula óssea, derme, sangue periférico, placenta, funículo umbilical, fluido amniótico, etc. Ainda, essas células possuem a vantagem de não serem teratogênicas, ter reduzida capacidade de rejeição imunológica, apresentar facilidade de cultivo, e além da alta capacidade de reduzir processos inflamatórios (ANASIZ; OZGUL; UCKAN-CETINKAYA, 2017; BEREICHEZ-FRIDMAN; MONTERO-OLVERA, 2018; CONFALONIERI *et al.*, 2018; FU *et al.*, 2017; KOBOLAK *et al.*, 2016).

Visto as características de fácil obtenção e potencial terapêutico, tem-se utilizado as células tronco mesenquimais para ensaios clínicos para o tratamento de doenças que acometam os diversos sistemas do organismo, por exemplo: doenças cardiovasculares (FRIIS *et al.*, 2011; MATHIASSEN *et al.*, 2012), doenças neurológicas (FILIPPI *et al.*, 2016; MENDONÇA *et al.*, 2014) e doenças relacionadas ao aparelho

locomotor (ossos [66,67], cartilagens articulares [68,69] e músculos esqueléticos [70,71]).

2.1.4. Hidrogel

Os hidrogéis são biomateriais que podem ser alternativas ao uso de *scaffolds* produzidos por descclularização. Apresentam, dependendo de sua forma de produção, a possibilidade de personalização estrutural diferente daquela do órgão originário, e conseqüentemente podendo proporcionar respostas diferentes para o crescimento celular e ao reparo tecidual (EL-SHERBINY; YACOUB, 2013; PINA *et al.*, 2019)

Os hidrogéis podem ser caracterizados como redes tridimensionais compostas por polímeros hidrofílicos, apresentando a capacidade de absorção de elevado teor de líquidos sem se liquefazer (EL-SHERBINY; YACOUB, 2013; SALDIN *et al.*, 2017). Quanto a sua classificação, de acordo com a sua composição podem ser denominados como: naturais (por exemplo: constituídos por matriz extracelular proveniente de descclularização, colágeno, quitosana, alginato), sintéticos (por exemplo: ácido polilático [PLA], ácido poliglicólico [PLG], PLGA), ou mistos (mistura entre compostos naturais e sintéticos). Podem ainda ser classificados como biodegradáveis ou não degradáveis (EL-SHERBINY; YACOUB, 2013; KIM *et al.*, 2019; PINA *et al.*, 2019; SALDIN *et al.*, 2017; SPICER, 2020).

Embora exista uma grande diversidade de materiais sintéticos como fonte de matéria prima para o desenvolvimento de hidrogéis, os mesmos, de forma isolada, ainda não conseguem reproduzir totalmente o microambiente tecidual (JUNG; BHUIYAN; OGLE, 2016). Dessa forma, uma opção com potencial terapêutico é a matriz extracelular proveniente da descclularização, visto que fornece o devido suporte estrutural, além de influenciar no comportamento das células (BISSELL; HALL; PARRY, 1982a; FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

A fim de se buscar melhores respostas a consistência do hidrogel, além de aprimorar as capacidades desejadas perante as células, pode-se fazer misturas de polímeros naturais e/ou sintéticos (PARMAKSIZ; ELÇIN; ELÇIN, 2019; SPICER, 2020; YU *et al.*, 2019). Um dos polímeros naturais que podem ser utilizados como aditivo na

formulação de hidrogéis é o alginato, um polímero biodegradável de polissacarídeo, sendo um dos mais utilizados dentro da engenharia tecidual. O seu uso difundido está relacionado a sua necessidade de cátions (Ca^{2+} , por exemplo), para que ocorra a gelificação, dando a opção de controle de velocidade e intensidade de gelificação (fator influenciado pelo teor de cátions) e, conseqüentemente, onde será realizada a gelificação (SPICER, 2020).

2.2. BIOENGENHARIA ÓSSEA

Os ossos apresentam a função de sustentação do organismo, formação de sistemas de alavancas utilizados na movimentação, proteção de órgãos vitais, além de serem depósitos dinâmicos de minerais (principalmente cálcio e fósforo) (ALLORI; SAILON; WARREN, 2008; CLARKE, 2008; DYCE; SACK; WENSING, 2021). São constituídos de tecido ósseo que possui uma matriz extracelular mineralizada (também denominada como matriz óssea) e por três tipos celulares: osteoblastos, osteócitos e os osteoclastos (CLARKE, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004a).

Devido a sua constituição, a matriz óssea pode ser dividida em duas partes, a inorgânica e a orgânica. A porção inorgânica corresponde a 50-70% da massa da matriz óssea tendo uma grande concentração de íons cálcio e fósforo. A deposição desses minerais ocorre nos espaços presentes entre as extremidades das fibras de colágeno, fornecendo assim a rigidez mecânica e resistências a cargas (CLARKE, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004b; LANDIS, 1995). A porção orgânica corresponde a 20-40% da matriz óssea, sendo constituída principalmente por fibras de colágeno e em menores quantidades as proteínas não fibrosas: glicoproteínas, proteoglicanos, sialoproteínas (ALLORI; SAILON; WARREN, 2008; CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014; CLARKE, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004b; POORNEJAD *et al.*, 2016). Com a presença desses componentes, a porção orgânica é responsável por dar forma ao osso, além de proporcionar elasticidade e flexibilidade necessária ao tecido ósseo (ALLORI; SAILON; WARREN, 2008; CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014; CLARKE, 2008).

Lesões ósseas em pacientes saudáveis, como as fraturas por trauma, são reparadas por realinhamento anatômico e imobilização, geralmente resultam em uma boa cicatrização e remodelamento ósseo (CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014). Entretanto, quando tal trauma é imobilizado com uso de estruturas metálicas (pinos e

placas, por exemplo) há possibilidade de rejeição, e como consequência um remodelamento ósseo mais demorado (BARTH, 2016; ROEHSIG *et al.*, 2008). Por outro lado, há lesões causadas por afecções, tais como: osteomielite, fraturas geradas por osteoporose, malformação congênita e derivadas de ressecções de tumores; geram grandes defeitos ósseos que diminuem as chances de ocorrência de auto reparo, necessitando assim de utilização de enxertos (CHEN *et al.*, 2018; CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014; FISHER; PERETTI; SCOTTI, 2016; LOPES *et al.*, 2018; MANSOUR *et al.*, 2017; ONISHI *et al.*, 2018).

Dentre esses enxertos, podemos ter os autólogos, alogênicos e polímeros sintéticos (biodegradáveis e não degradáveis). Os enxertos autólogos apresentam alguns aspectos negativos, tais como: limitações dimensionais, necessidade de procedimentos cirúrgicos adicionais e morbidez do paciente. (BUENO; GLOWACKI, 2009; FINKEMEIER, 2002; GAZDAG *et al.*, 1995; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; KNESER *et al.*, 2006). Os aloenxertos apresentam a rejeição imunológica como um principal ponto negativo (DAMIEN; PARSONS, 1991; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; TSIGKOU *et al.*, 2010). Por fim, os polímeros sintéticos biodegradáveis (ácido poliláctico, ácido glicólico e policaprolactona, etc.) apresentam aspectos negativos de rápida degradação e acidificação do microambiente de implantação (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012; CHEUNG *et al.*, 2007); enquanto que os não degradáveis (polímeros metálicos e minerais) não permitem a integração de biomoléculas presentes no tecido em sua estrutura, além do risco da liberação de íons metálicos no osso (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012; DAS *et al.*, 2008).

Dessa forma, tem-se buscado alternativas para o desenvolvimento de enxertos ósseos com uso de técnicas de bioengenharia de tecidos, tais como a descelularização de tecido ósseo. Que apesar de produzir um biomaterial com características moleculares e biomecânicas semelhantes ao tecido nativo (CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014; GOMES *et al.*, 2006; PAPADIMITROPOULOS *et al.*, 2015; PHAM *et al.*, 2008), necessita-se de um longo período para a obtenção do *scaffold*, iniciando-se com um processo de descalcificação (para poder acessar os constituintes orgânicos) e posteriormente a descelularização de fato, o que acarreta em perda de componentes da matriz extracelular (laminina e fibronectina) por efeito dos quelantes durante a calcificação (EDTA, por exemplo), além do processo de

descelularização que, naturalmente, já causa uma perda de componentes da matriz extracelular (GILBERT, 2012; LEE *et al.*, 2016), mesmo quando associados agentes físico, químicos e enzimáticos no processo (DE PEPPO *et al.*, 2013; HASHIMOTO *et al.*, 2011; NING *et al.*, 2012b). Além disso, características do doador (idade, hábitos/estilo de vida e sexo) de tecido ósseo podem influenciar fortemente a qualidade do biomaterial (RUSSELL; BLOCK, 1999).

Dentro da bioengenharia óssea, tem-se desenvolvido biomateriais que estão associados às células tronco mesenquimais (BABA *et al.*, 2010; LIANG *et al.*, 2014; PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2013). O uso dessas células está associado ao conhecimento de seu mecanismo de ação em fraturas, as quais são recrutadas para o local da lesão e proliferam-se, posteriormente se diferenciando em osteoblastos e condrócitos, realizando os processos de ossificação intramembranoso e endocondral, respectivamente (KNIGHT; HANKENSON, 2013). Dessa forma, o uso clínico dessas células, associados ou não a biomateriais, promete promover a aceleração da cicatrização óssea (GIULIANI *et al.*, 2013; KNIGHT; HANKENSON, 2013; MELEK, 2015; ORYAN *et al.*, 2017).

2.3. A PLACENTA NA BIOENGENHARIA DE TECIDOS

A placenta apresenta-se como uma fonte alternativa de biomaterial para a bioengenharia de tecidos, não para o desenvolvimento de órgãos inteiros, mas sim para a produção de enxertos ou biomateriais funcionalizados. Suas principais características, principalmente quando se fala em placenta bovina, são: presença de uma rica matriz extracelular, presença de vasos sanguíneos bem estruturados e com diversos diâmetros, possuir uma grande dimensão, além de serem obtidas sem danos (ou de necessidade de um procedimento cirúrgico) ao doador (BARRETO *et al.*, 2018; HOPPER; WOODHOUSE; SEMPLE, 2003; KAKABADZE *et al.*, 2014; KAKABADZE; KAKABADZE, 2015).

Dentre a grande variedade de placentas, a humana é a que mais tem sido utilizada para a produção de biomateriais com o objetivo de tratamentos de úlcera venosa (MERMET *et al.*, 2007), para a produção de enxertos vasculares (KAKABADZE *et al.*, 2014; KAKABADZE; KAKABADZE, 2015; SCHNEIDER *et al.*, 2016, 2018). Assim como para produção de uma complexa mistura de moléculas

bioativas para cicatrização de feridas profundas de pele (CHOI *et al.*, 2013; HONG *et al.*, 2010).

Em relação à placenta animais, pouco ainda se sabe, porém o uso da placenta bovina para produção de biomateriais é possível devido ao processo de descclularização (por perfusão) pouco agressivo desenvolvido por Barreto *et al.*, 2018 que proporcionou a manutenção de componentes fibrosos, os quais são responsáveis pela estruturação da matriz extracelular (colágeno I e III) e flexibilidade (elastina); proteoglicanos, os quais atuam na regulação e adesão da matriz extracelular, além da capacidade de influenciar o metabolismo celular, devido a sua capacidade de retenção de fatores de crescimento; glicoproteínas multiadesivas (laminina e fibronectina), que estão presentes na membrana basal, ancorando as células ao colágeno tipo IV; e os glicosaminoglicanos, que devido a sua característica hidrofílica, atua como uma reserva de citocinas, hormônios e fatores de crescimento (BARRETO *et al.*, 2023; DE SÁ SCHIAVO MATIAS *et al.*, 2022). Entretanto, quando se pensa em descclularização em maior escala, a descclularização pode ser facilitada (ou abreviada) por imersão e agitação dos agentes descclularizantes químicos e/ou biológicos, do que quando realizada por perfusão (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015). A possibilidade (e facilidade) do uso da imersão e/ou agitação acaba sendo determinado de acordo com o tamanho, a espessura e densidade do órgão, além da concentração do agente descclularizante e intensidade da agitação (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; LEE *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2010). Devido à grande dimensão da placenta bovina, e sua taxa de perfusão fisiológica ser menor do que a corpórea, a descclularização por perfusão se torna lenta. Portanto a fragmentação deste órgão associada à descclularização por imersão e agitação pode reduzir o tempo total do processo (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo produzir biomateriais ósseo funcionalizados através da recelularização de cotilédones bovinos descelularizados, ou hidrogéis derivados deste material utilizando células tronco mesenquimais de tecido adiposo caninas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar células tronco mesenquimais de tecido adiposo caninas;
- Promover a adesão de células tronco mesenquimais de tecido adiposo caninas sobre biomateriais derivados de cotilédones bovinos descelularizados;
- Diferenciar células tronco mesenquimais de tecido adiposo caninas, em linhagem osteogênica, diretamente sobre biomateriais derivados de cotilédones bovinos descelularizados;
- Produzir biogel estável, denso e que permita a adesão e desenvolvimento das células tronco mesenquimais de tecido adiposo caninas;

4. HIPÓTESE

Os cotilédones descelularizados, e hidrogel produzidos a partir do mesmo, são capazes de fornecer um microambiente ideal para adesão e proliferação celular, permitindo a diferenciação de células tronco mesenquimais de tecido adiposo caninas em linhagem osteogênica, e por consequência a produção de um biomaterial ósseo funcionalizado com possibilidade de modelação estrutural.

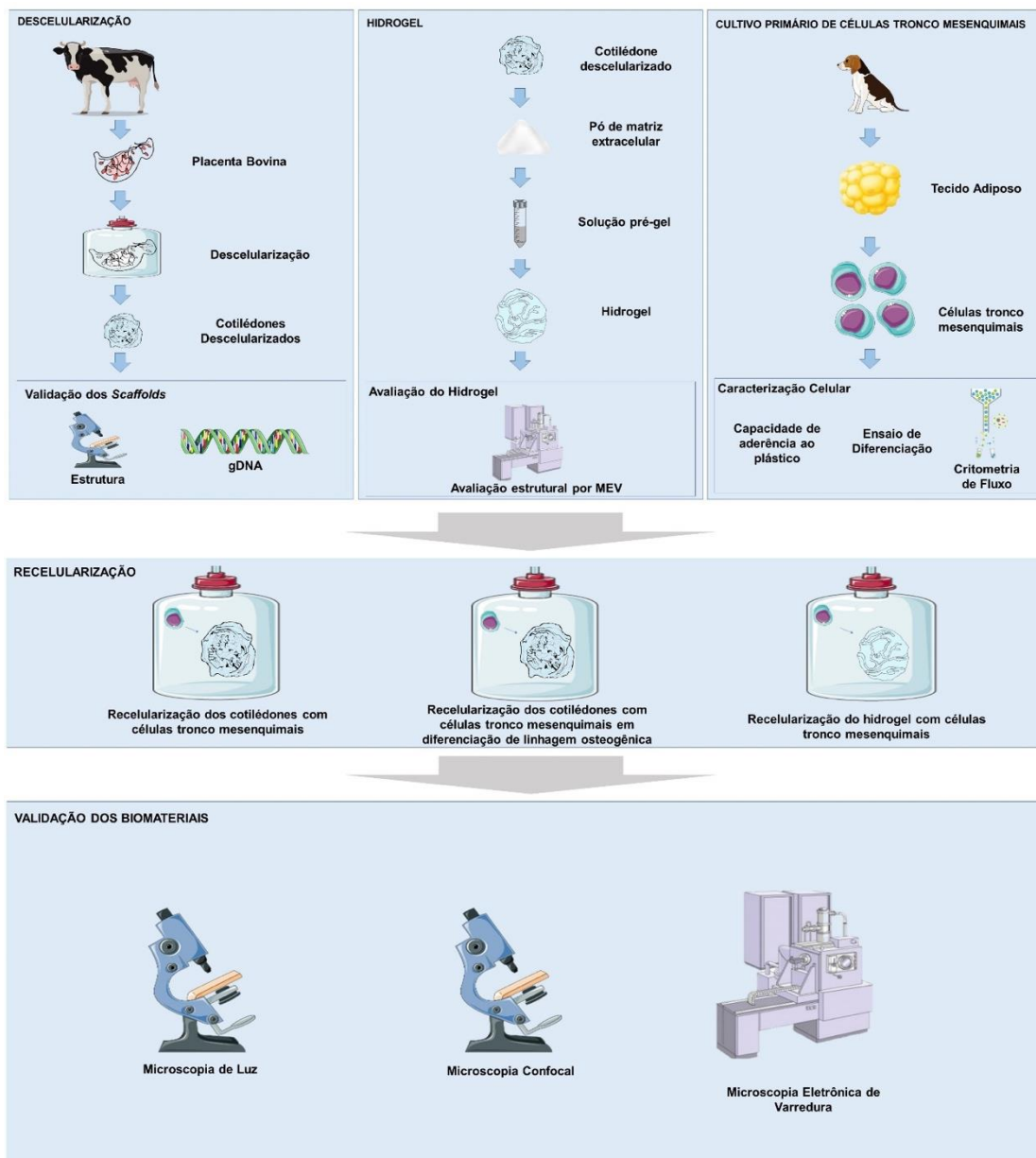
5. JUSTIFICATIVA

Devido à ausência de terapias que solucionem de fato, ou abreviem o tempo de reparação de lesões ósseas, são necessárias técnicas alternativas para a solução desse problema. Com isso, a bioengenharia de tecidos pode ajudar, e muito, na produção de um biomaterial ósseo funcionalizado, utilizando uma fonte de matriz extracelular e células que aumentem a capacidade de reparação local. A placenta bovina vem se mostrando uma fonte de biomaterial estruturalmente preservado, e com presença de moléculas que podem auxiliar esse processo reparatório. Assim como as células tronco mesenquimais de tecido adiposo caninas também possui várias vantagens no sentido de promover ou acelerar a autoreparação de um órgão.

6. METODOLOGIA

6.1. DESENHO EXPERIMENTAL

Figura 1 - Desenho Experimental.



Fonte: Smirnow, 2023

Legenda: As placentas bovinas foram coletadas no terço médio do período gestacional, que posteriormente foram descelularizadas e por fim validadas. Os cotilédones foram isolados e divididos em dois grupos: um servindo como biomaterial para cultivo e o outro para a fabricação do hidrogel. O processo de recelularização dos cotilédones foram realizados com células tronco mesenquimais e células tronco mesenquimais em diferenciação para linhagem osteogênicas, enquanto que o hidrogel foi recelularizado somente com as células tronco mesenquimais. As células tronco mesenquimais eram provenientes do tecido adiposo de cães. Para validação dos biomateriais, foram realizadas técnicas histológicas para microscopia de luz, microscopia confocal e de microscopia eletrônica de varredura.

6.2. COLETA DE MATERIAL

O trabalho foi sendo desenvolvido de acordo com regulamentações da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), com número de projeto CEUAX N 7877200622. Foram coletadas, ao todo, 10 placentas de fêmeas bovinas azebuadas em terço médio de gestação. As idades gestacionais dos fetos foram estimadas por mensuração da distância cefalococcígea (*crown-rump*) (EVANS; SACK, 1973). As amostras foram acondicionadas em gelo e transportadas para o Laboratório de Biologia Tecidual no Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP.

6.3. PROTOCOLO DE DESCELULARIZAÇÃO

O saco alantocoriônico foi individualizado e as artérias umbilicais canuladas com cateteres nº 14, sendo feita a perfusão manualmente da solução de tampão fosfato (PBS: 136,9 mM de NaCl, 26,8 mM de KCl, 14,7 mM de KH₂PO₄ e 8,1 mM de Na₂HPO₄.7H₂O; PH 7,2) para a remoção da grande quantidade de sangue.

Posteriormente os cotilédones foram retirados, sendo submetidos ao processo de descelularização através do método de agitação e imersão a 80 rpm. Inicialmente foi utilizado PBS por 24h, em seguida a solução de 0,01% SDS (dodecil sulfato de sódio) por 24h, sendo alterada para a concentração de 0,1% por 48h, seguido pela concentração de 0,25% por 48h, finalizando com o detergente Triton X-100 na concentração de 1% por 3h (# 0694-1L, Amresco-Solon, EUA). Por fim, foram lavados com PBS durante 48 horas.

6.4. VALIDAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO

As amostras de cotilédones controles e descelularizados foram fixados em paraformaldeído 4% tamponado por 48 horas, depois desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina. Microsecções de 5 µm foram produzidas em micrótomo (#RM2265, Leica - Nussloch, GE) e transferidas para

lâminas de vidro, e posteriormente foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina para visualizar a presença de núcleo celular.

O DNA genômico foi extraído de três amostras do grupo controle e três amostras de cotilédones descelularizados através de precipitação salina, adaptada de Olerup e Zetterquist (1992). Foi realizada a maceração e digestão das amostras [80 µL de tampão de proteinase K (0,375 M de NaCl e 0,12 M de EDTA), 10 µL de 20% de SDS, 8 µL de proteinase K (25 mg / mL) e 280 µL de água ultrapura] por 3 horas a 56°C. Em seguida, elas foram resfriadas, adicionado 120 µL de NaCl 5 M e centrifugadas à temperatura ambiente durante 10 minutos, a 13000 rpm. Os sobrenadantes foram recuperados e a eles foi adicionado 1 mL de etanol 100% e incubados a -80°C, por 15 minutos. A seguir, foram centrifugados a 4°C, por 10 minutos, a 14000 rpm, e mantidos a -80°C por mais 20 minutos. Os sobrenadantes foram removidos, sendo adicionado 1mL de etanol 70% nos pellets de DNA, seguido de nova centrifugação. Os sobrenadantes foram removidos novamente e as amostras foram secas ao ar e eluídas em 30 µL de água ultrapura. Em seguida, o DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop 2000, ThermoFischer).

6.5. ESTERILIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO

Com o término do processo de descelularização, as amostras foram banhadas em banho ultrassônico em 3 banhos de 5 minutos. Posteriormente no fluxo, foram adicionados 2% penicilina e estreptomicina 10% (v/v) em PBS estéril (136.9 mM de NaCl, 26.8 mM de KCl, 14.7 mM de KH₂PO₄ and 8.1 mM de Na₂HPO₄.7H₂O; pH 7.2) (NAKAYAMA *et al.*, 2010, 2011). Para finalizar o processo de esterilização, as amostras foram desidratadas no secador automático de ponto crítico (LEICA EM CPD 300)

Os biomateriais foram mantidos em PBS estéril com antibióticos a 4°C (para armazenamento de até uma semana) (MIYAZAKI; MARUYAMA, 2014) e a -20°C (para armazenamento de mais de um mês) até o início do processo de recelularização e produção do hidrogel (ZOU *et al.*, 2018).

6.6. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO CANINO

As amostras com dimensões aproximadas de 1,0 cm³ provenientes de tecido adiposo subcutâneo da região abdominal foram coletadas cirurgicamente, no Centro Veterinário Butantã, onde 10 cães fêmeas adultas híginas submetidas a cirurgias eletivas de ovariosalpingohisterectomia.

Após a coleta, as amostras de tecido adiposo foram manipuladas em capela de fluxo laminar. O tecido foi lavado 2 vezes com PBS 1X com amicacina 2%, sendo posteriormente fragmentados com tesoura em tubos de 15 ml, contendo a respectiva solução de digestão: 10 mL de DMEM low glucose (LGC Biotecnologia, BR30002-05), 50 µL de amicacina e 0,01 g de colagenase tipo I (Gibco, 17018029); sendo mantida por 2 horas em estufa a 37°C e 5% [CO₂]. Dado o tempo de digestão, foi feita a centrifugação a 800 rpm por 5 minutos, a fim de separar a fração tecidual das células tronco mesenquimais e células sanguíneas. Posteriormente foi aspirado a solução de digestão, transferindo-a para um novo tubo. Novamente a amostra passou pelo processo de centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos, sendo feito o descarte do sobrenadante e pôr fim a ressuspensão do pellet em 2 mL meio de cultura completo: solução de DMEM Low Glucose (LGC Biotecnologia, BR30002-05) suplementado com, 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, 10-bio500) e 1% de penicilina/estreptomicina (LGC Biotecnologia, BR30110-01). Por fim as amostras foram distribuídas em garrafa de cultivo celular T75, sendo adicionados 8 mL do meio completo. As garrafas de cultivo celular foram incubadas em estufa 37°C e 5% [CO₂] por 48 horas. Passado o período, foi feita a renovação do meio de cultura. O Processo foi mantido até as células atingirem 80% de confluência, e então foi realizado o repique das células até a terceira passagem para a realização dos ensaios de caracterização e recelularização.

6.7. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

6.7.1. Capacidade de aderência ao plástico

Passada as 48h do plaqueamento das células tronco mesenquimais, em condições de cultura padrão (DMEM low glucose, soro fetal bovino 10% e penicilina-estreptomicina 1%, e estufa a 37°C e 5% [CO₂]) em suas respectivas placas de cultura de plástico, foram observadas através do microscópio a sua capacidade de aderência e sua morfologia.

6.7.2. Expressão de antígenos específicos de superfície

A caracterização fenotípica das células foi baseada na expressão dos antígenos específicos de superfície CD90 (Thermo Fisher Scientific, 12-5900-42) ($\geq 95\%$), CD 34 (Thermo Fisher Scientific, MA5-32059) e CD 45 (Thermo Fisher Scientific, MA5-16603) ($\leq 2\%$) (DOMINICI *et al.*, 2006).

Inicialmente as células tripsinizadas e posteriormente centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, e então o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuscitado em paraformaldeído 2%, sendo mantido por 15 minutos para a fixação. Posteriormente as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuscitado em PBS e então as células foram acondicionadas em microtubos, na quantidade de 1×10^5 , para cada anticorpo. Cada microtubo teve a adição de 1000 μ l de tampão FACS [PBS suplementado com 2% de albumina sérica bovina], sendo homogeneizado e centrifugado a 600 x g por 8 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi vertido e as células foram ressuscitadas em 50 μ l de tampão FACS. Posteriormente os anticorpos primários foram diluídos na proporção de 1:100 e adicionados para seus respectivos microtubos com as células, sendo então incubados por 45 minutos em temperatura ambiente. Dado o tempo de incubação, teve a adição de 1000 μ l de tampão FACS, sendo novamente centrifugadas a 600 x g por 8 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi vertido e os anticorpos secundários foram diluídos

a1:400 (Invitrogen A32723, Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor™ Plus 488; e Invitrogen A32731, Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor™ Plus 488) e adicionados nos microtubos dos seus respectivos anticorpos primários, sendo então incubados por 45 minutos em temperatura ambiente e escondidos da luz. Por fim, teve a adição de 1000 µL de tampão FACS, sendo homogeneizado e centrifugado a 600 x g por 8 minutos. Dado o tempo da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado 500 µL de tampão FACS. A leitura no citômetro de fluxo foi realizada com os espectros de luz 488 nm (CD34 e CD45) e 578 nm (CD90) com a leitura de 10000 eventos.

A validade também realizada em células aderentes, onde as células, foram semeadas em placas de 12 poços, na quantidade de 1×10^5 . Após 48 horas, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 15 minutos. Posteriormente, foram lavadas com PBS por 5 minutos e em seguida foram incubadas com PBS adicionado a 2% de albumina sérica bovina (BSA) por 30 minutos, para o bloqueio de ligação de proteínas inespecíficas. Após o bloqueio, as células foram incubadas com os anticorpos primários CD90, CD45, CD90 (os mesmos descritos anteriormente) por 1 hora. Após incubar com os anticorpos primários, foi realizada a lavagem com a solução de PBS adicionado de BSA 0,2% (p/v) duas vezes por 5 minutos e então os anticorpos secundários (os mesmos descritos anteriormente) foram adicionados. Por fim, foi realizada duas lavagens com BSA 0,2% (p/v) e finalizou corando com DAPI (1:10.000) por 8 minutos. A visualização foi feita com Microscópio a laser confocal Olympus FluoView 1000.

6.7.3. Capacidade de diferenciação multipotente

Para validação da capacidade de diferenciação das células tronco mesenquimais em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, as células foram cultivadas em placas com meio completo foram utilizados os kits: StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit; StemPro™ Chondrogenesis Differentiation Kit; StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit; respectivamente, para a realização da diferenciação celular nos diferentes tipos celulares, de acordo com recomendações descritas pelo fabricante. Passado o período de diferenciação de 14 dias (linhagens

adipogênica e condrogênica) e 21 dias (linhagem osteogênica), foram realizadas as colorações de alizarina *red*, alcian blue e *oil red*. As células coradas foram visualizadas no microscópio.

6.8. PRODUÇÃO DO HIDROGEL

Com os cotilédones descelularizados, foi feita a secagem e esterilização dos mesmos através do uso do Secador automático de ponto crítico (LEICA EM CPD 300). Após a secagem, foram separadas 500 mg dos cotilédones, os quais foram triturados com o auxílio de homogeneizador de tecidos. Com a sua redução de tamanho, foram adicionados em solução de digestão, a qual continha 50 mg de pepsina e 50 mL de 0,01M de HCl. Passado o período de 24-48h, a solução com os cotilédones digeridos teve o seu pH ajustado com NaOH 0,1N para pH 7,4 (FREYTES *et al.*, 2008). Com o ajuste do pH, teve a adição de alginato na concentração de 8% e 12% (p/v) na solução digerida, formando assim a solução pré-gel. Com a solução pré-gel preparada, foi adicionado posteriormente adicionado 200µL/mL de CaCl (p/v) então cerca de 2 mL da solução foi colocada em placa de cultura de 12 poços e levada a estufa a 37°C e 5% [CO₂] por 24h.

6.9. AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO HIDROGEL

Após o desenvolvimento do hidrogel, ele foi retirado da estufa, sendo então fixado no vapor de paraformaldeído 4%. Com a fixação, o hidrogel foi liofilizado (OPERON - FDB5503-E060208-01) e posteriormente transferidos para talões e metalizados em ouro (# K550, Emitech - Ashford, Reino Unido). As amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura Leo 435 VP.

6.10. RECELULARIZAÇÃO DOS COTILÉDONES DESCELULARIZADOS

Após a realização da esterilização, os cotilédones foram mantidos por 7 dias submersos em meio de cultura completo, afim de reidratá-los e avaliar a possibilidade de crescimento de microrganismos. Passados os 7 dias, os fragmentos de cotilédones

descelularizados foram então alocados em sistema rotacional de cultura tridimensional (RCCS-4SC, Synthecon), tendo sido adicionados 10 mL de meio de cultura com o total de $2,6 \times 10^6$ de células tronco mesenquimais, as quais foram mantidas em 13 rpm durante todo o processo de recelularização. As trocas do meio de cultura foram realizadas a cada 2-4 dias, levando em consideração a mudança do seu aspecto. O processo de recelularização perdurou por 21 dias em estufa a 37°C e 5% [CO₂], sendo que nos dias, 15 e 25, os cotilédones foram retirados para as análises de validação.

Paralelamente, em outro reservatório do RCCS-4SC, após os 4 primeiros dias em condições de cultivo idênticas às anteriormente descritas, o meio de cultura foi substituído para a realização da diferenciação das células centro mesenquimais para a linhagem osteogênica, utilizando o kit de diferenciação StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit e assim seguindo as orientações do fabricante. Após 21 dias, o processo de diferenciação das células tronco mesenquimais nos fragmentos de cotilédones foi finalizado.

6.11. RECELULARIZAÇÃO DO HIDROGEL

Após o desenvolvimento do hidrogel (como descrito no item 6.8) foi adicionado 1 mL do meio de cultura com a presença de 5×10^5 células tronco mesenquimais. Posteriormente, a placa de cultura foi levada a estufa a 37°C e 5% [CO₂] por 7 dias.

6.12. AVALIAÇÃO DOS BIOMATERIAIS APÓS A RECELULARIZAÇÃO.

Nos dias 15 e 25 da recelularização com as células tronco mesenquimal e células tronco mesenquimal em diferenciação em linhagem osteogênica, os biomateriais foram retirados da estufa e de seu meio de cultura, sendo lavados 3 vezes com PBS 1X por 5 minutos e então separados para a realização da marcação com DAPI, microscopia eletrônica de varredura e coloração de Hematoxilina e Eosina e alizarina *red*.

Os Biomateriais foram incubados em DAPI por 8 minutos, sendo feita em seguida 3 lavagens de PBS 1X por 5 minutos. Por fim, foram visualizados em Microscópio a laser confocal Olympus FluoView 1000.

Para microscopia eletrônica de varredura, os biomateriais fixados em paraformaldeído tamponado a 4% por 48 horas, posteriormente lavadas em banho de ultra-som e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (SEM® - Hatfield, EUA) por 90 minutos. As amostras foram desidratadas através de uma série crescente de etanol, depois foram secadas usando um secador de ponto crítico automatizado (LEICA EM CPD 300) e, então, transferidas para talões metalizados em ouro (# K550, Emitech - Ashford, Reino Unido). As amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura Leo 435 VP.

Para as técnicas histológicas, os biomateriais foram fixados paraformaldeído 4% tamponado por 48 horas, depois desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina. Microsecções de 5 μ m foram produzidas em micrótomo (#RM2265, Leica - Nussloch, GE) e transferidas para lâminas de vidro, e posteriormente foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina para visualizar a presença de núcleo celular, e alizarina *red* para visualizar a presença de grânulos de cálcio presentes no tecido.

Para a análise do hidrogel recelularizado, inicialmente, a placa de cultura com o hidrogel e as células foram retiradas da estufa e, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, parte da amostra foi transferida para uma lâmina de vidro. Após esse processo inicial, a amostra foi lavada com PBS por 3 vezes por 5 minutos. Após a lavagem, o hidrogel foi incubado com a solução de DAPI (1:10000) por 10 minutos. Dado o tempo, o hidrogel foi novamente lavado com PBS 3 vezes por 5 minutos. Por fim, o hidrogel foi visualizado no microscópio de epi-fluorescência (Nikon - Eclipse 80i).

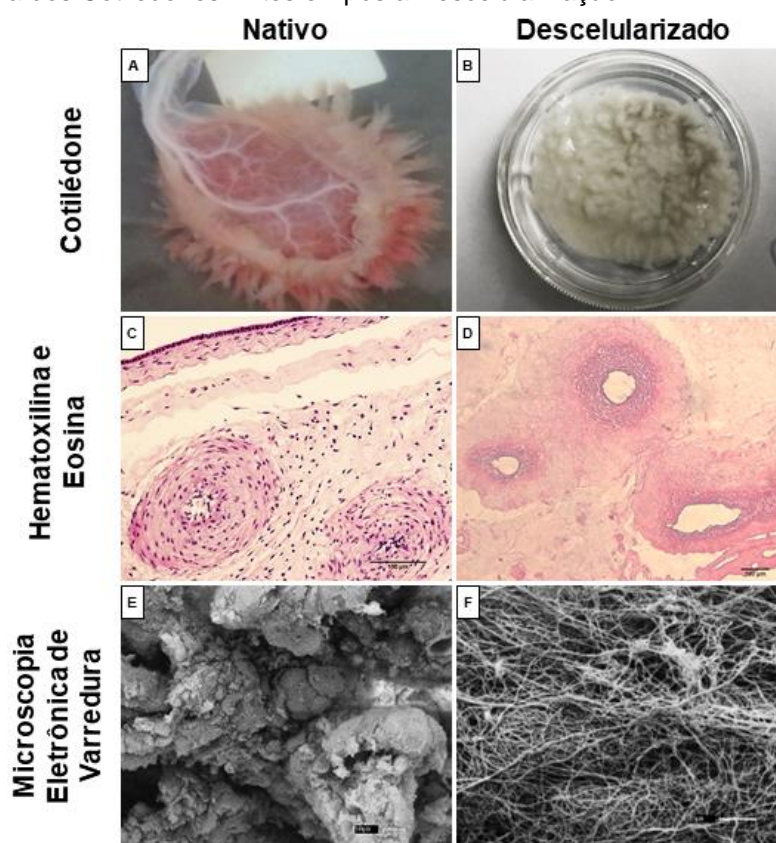
7. RESULTADOS

7.1. VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO

Com o término do processo de descелularização, foi possível observar a olho nú a alteração de cor dos cotilédones (Figura 2 A e B), passando a ser esbranquiçado-translúcido, além da diminuição visual do seu volume.

Através da técnica histológica de Hematoxilina e Eosina, foi possível observar a ausência de núcleos celulares remanescentes no tecido descелularizado (observados em estruturas ovais em roxo), além da preservação estrutural da matriz extracelular (observados em rosa) (Figura 2 D).

Figura 2 - Estrutura dos Cotilédones Antes e Após a Descелularização.



Fonte: Smirnow, 2023

Legenda: Cotilédone de 4 meses de gestação antes do processo de descелularização (A) e após processo de descелularização (B). **B.** Observar a alteração de cor, passando a ser esbranquiçada-translúcida. **C.** Coloração de Hematoxilina e Eosina em cotilédone nativo, observar a presença de núcleos celulares e matriz extracelular, Barra = 100µm. **D.** Observar a preservação da estrutura da matriz extracelular e ausência de núcleos celulares, Barra = 100µm. **E.** Microscopia eletrônica de varredura (E-F). Observar, no tecido nativo, a presença de células rodeadas pelo entremeado de fibras(E), enquanto que no tecido descелularizado observar apenas presença de um entremeado de fibras em distintas orientações, com a ausência completa de células (F).

Por fim, para validar a capacidade imunogênica do biomaterial após o processo de descclularização, foi realizada a quantificação de DNA genômico remanescente, obtendo, em média 9,1 ng de DNA genômico remanescente por/mg de matriz extracelular descclularizada seca em tecido descclularizado.

7.2. ESTERILIZAÇÃO DO BIOMATERIAL

Após a realização da esterilização dos cotilédones descclularizados (biomateriais), foi avaliado se o método de secagem por ponto crítico foi, de fato, eficiente. Ao observar as placas de cultura após 7 dias, as quais foram separadas em dois grupos: uma com biomateriais e presença de meio de cultura, e outra apenas com meio de cultura (Figura 3); não foi possível notar a presença de microrganismos de forma macroscópica (alteração da cor do meio de cultura e/ou aspecto arenoso ou leitoso, além da presença de estruturas filamentosas) e microscópicas (presença das mais variadas morfologias bacterianas, ou a presença de hifas). Portanto, após 7 dias o meio de cultura permaneceu límpido e translúcido, indicando que não houve proliferação de microrganismos que pudessem interferir no cultivo das células tronco mesenquimais.

7.2. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

Dado o período de 48 horas após o isolamento das células tronco mesenquimais, provenientes do tecido adiposo, foi possível observar a aderência dessas células nas placas de cultura celular. Elas apresentaram os seguintes aspectos celulares morfológicos: formato fusiforme com projeções citoplasmáticas em suas extremidades, além núcleo celular esférico e central (Figura 3 A).

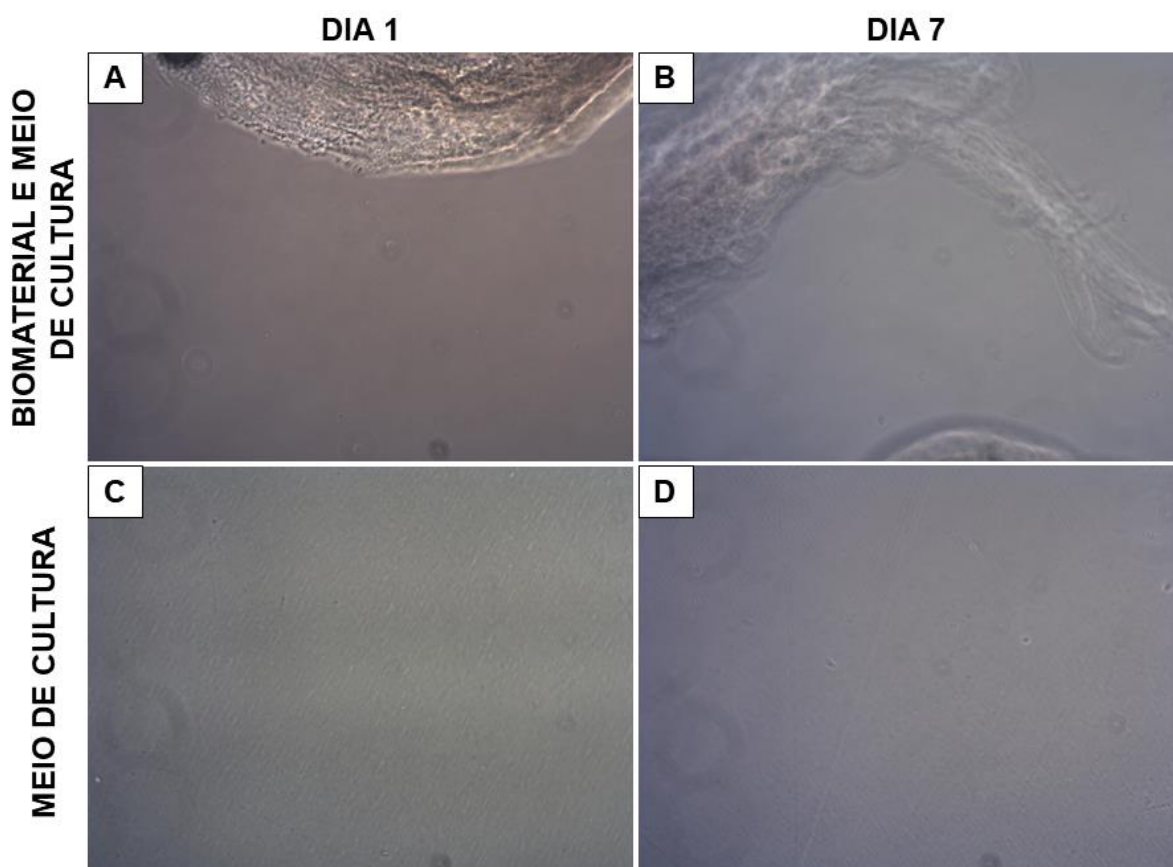
Os ensaios de diferenciação celular das células tronco mesenquimais em linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas (Figura 3 B-D), indicaram a capacidade de diferenciação nas linhagens citadas anteriormente, sendo possível observar a presença da deposição de grânulos minerais (linhagem osteogênica), deposição de proteínas fibrosas (linhagem condrogênica), e formação de gotas lipídicas intracelulares (linhagem adipogênica) após o término do processo de

diferenciação: 14 dias para as linhagens condrogênicas e adipogênicas, e 21 dias para as linhagem osteogênica.

Através da técnica de imunofluorescência, foi possível observar, de forma qualitativa a expressão dos antígenos específicos de superfície (Figura 4), sendo notável a presença de CD 90 (Figura 4 – A) e baixa presença de CD 34 (Figura 4 – B) e ausência de expressão CD 45 (Figura 4 – C).

Com a citometria de fluxo, observou-se a presença desses marcadores de superfície de forma quantitativa, sendo o CD90 com maior expressão ($\geq 95\%$) e CD34 e CD45 ($\leq 2\%$).

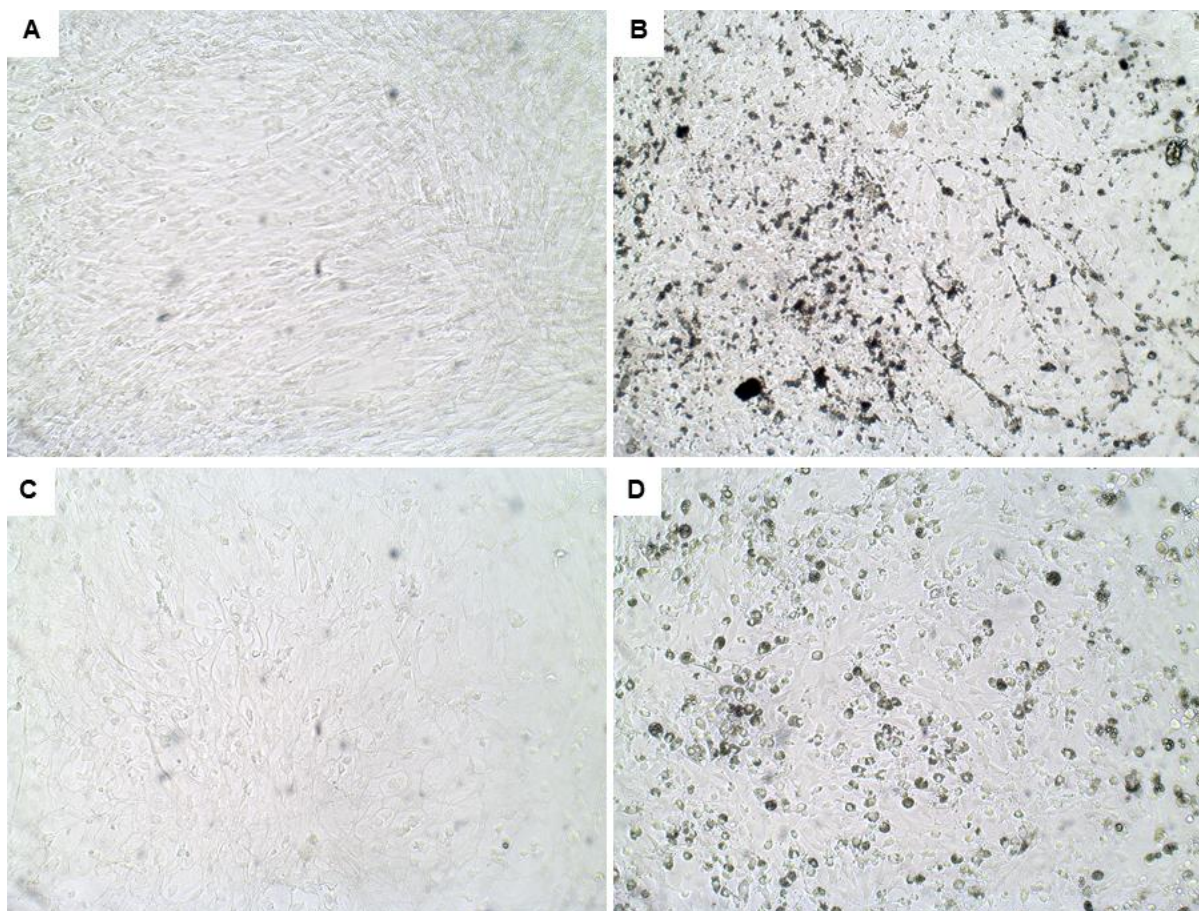
Figura 3 – Avaliação de proliferação de microrganismos.



Fonte: Smirnow, 2023

Legenda: Biomaterial, após a esterilização, no primeiro dia com presença de meio de cultura (A), cotilédone nas mesmas condições após 7 dias de cultivo (B). Observar a ausência de microrganismos na imagem A e B. Meio de cultura no primeiro dia (C) e meio de cultura no dia 7 (D). Observar a ausência de microrganismos, assim como nas imagens A e B, indicando a ausência de contaminação de microrganismos no meio de cultura, o qual também foi utilizado para o biomaterial.

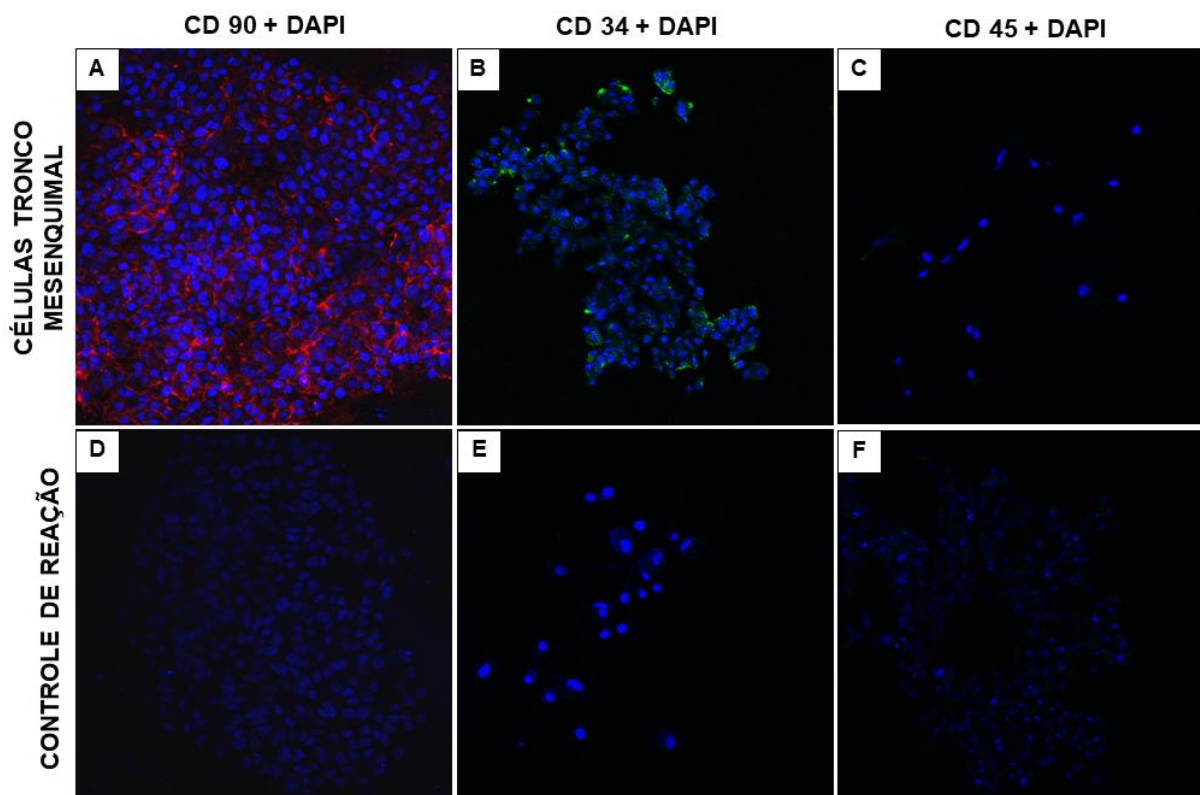
Figura 3 – Avaliação de Diferenciação Celular



Fonte: Smirnow, 2023

Legenda: **A.** Observar as células tronco mesenquimais com seu aspecto fusiforme e núcleo central. **B.** Células tronco mesenquimais em diferenciação à linhagem osteogênicas. Observar a presença de materiais, não translúcidos, no meio, indicando a presença de grânulos de minerais e consequentemente mineralização da matriz extracelular. **C.** Células tronco mesenquimais diferenciadas em células de linhagem condrogênica. Observar a deposição de componentes da matriz extracelular no meio, com o aspecto de fibras. **D.** Células tronco mesenquimais diferenciadas em células de linhagem adipogênica. Observar a formação de grânulos intracelulares, com aspecto translúcido, indicando acúmulo lipídico.

Figura 4 – Imunofluorescência das Células Tronco Mesenquimais



Fonte: Smirnow, 2023

Legenda: **A.** Observar a expressão do anticorpo CD90 através de sua fluorescência em vermelho nas regiões que contornam o núcleo das células. **B.** Observar a leve expressão do anticorpo CD34 em algumas células através da cor verde, a qual está ao redor do núcleo das células. **C.** Observar a ausência de expressão do anticorpo CD 45, o qual estaria expressando na cor verde ao redor do núcleo (em azul) das células. Observar em **D, E e F** a ausência de expressão dos anticorpos anteriormente citados, visto que só foram adicionados os anticorpos secundários, a fim de avaliar a ligação inespecífica deles em relação às células.

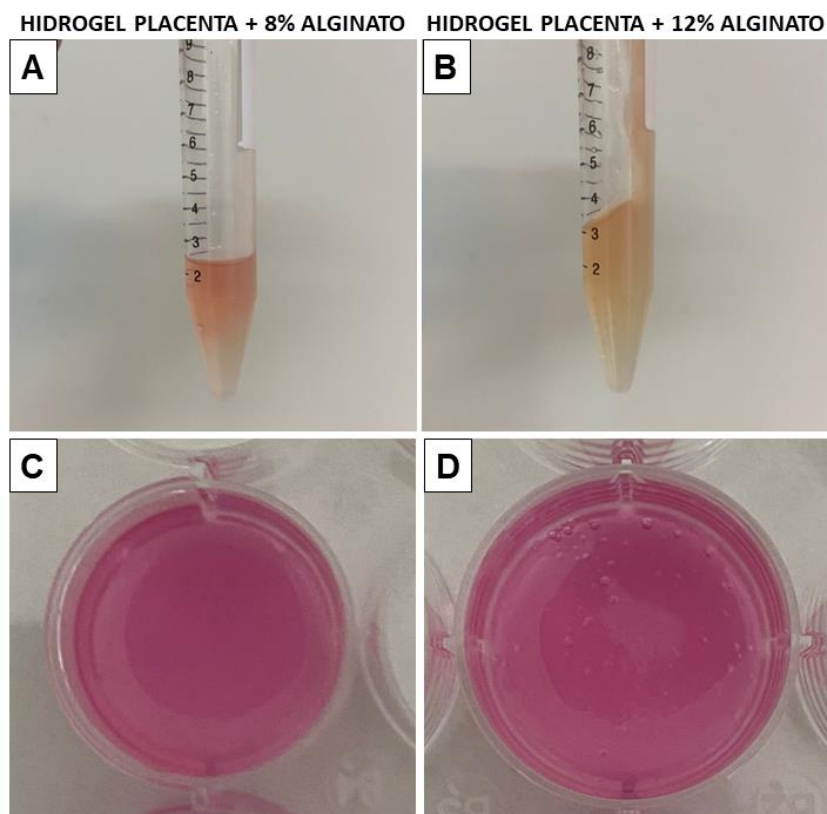
7.3. AVALIAÇÃO DO HIDROGEL

Após a digestão dos biomateriais derivados dos cotilédones descelularizado da placenta bovina, formando assim a solução pré-gel, apesar de apresentarem uma consistência gelificada, eram facilmente liquefeitos na presença de meio de cultura, ou seja, não apresentavam consistência desejada para cultivo celular. Para garantir uma melhor gelificação do hidrogel, foi adicionado 8% e 12% de alginato (p/v) com a presença de cloreto de cálcio 1% (p/v), afim de realizar a gelificação (Figura 5), sendo que o hidrogel com alginato 12% apresentou uma melhor consistência e aeração (Figura 5 – B) quando comparado ao hidrogel com alginato 8% (Figura 5 – A). Na presença de meio de cultura, ambos os grupos de hidrogéis apresentaram a capacidade de absorção do meio de cultura sem se liquefazermos (Figura 5 – C e D)

Com o desenvolvimento do hidrogel, foi realizada o processo de retirada parcial de líquidos do hidrogel utilizando lofilizador, resultado na compactação do hidrogel, observando diminuição da sua aeração devido a perda de água.

Com a desidratação, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (Figura 6), onde foi possível observar a organização ultraestrutural do hidrogel em lamelas interpostas por poros no hidrogel com 12% de alginato em sua formulação (Figura 6 – D). No hidrogel com alginato na concentração de 8%, apenas foi possível observar estruturas compactas, com ausência de organização específica (Figura 6 – B). Como controle de gelificação foram produzidos hidrogéis apenas apenas com diluição de alginato (8% e 12%) em PBS.

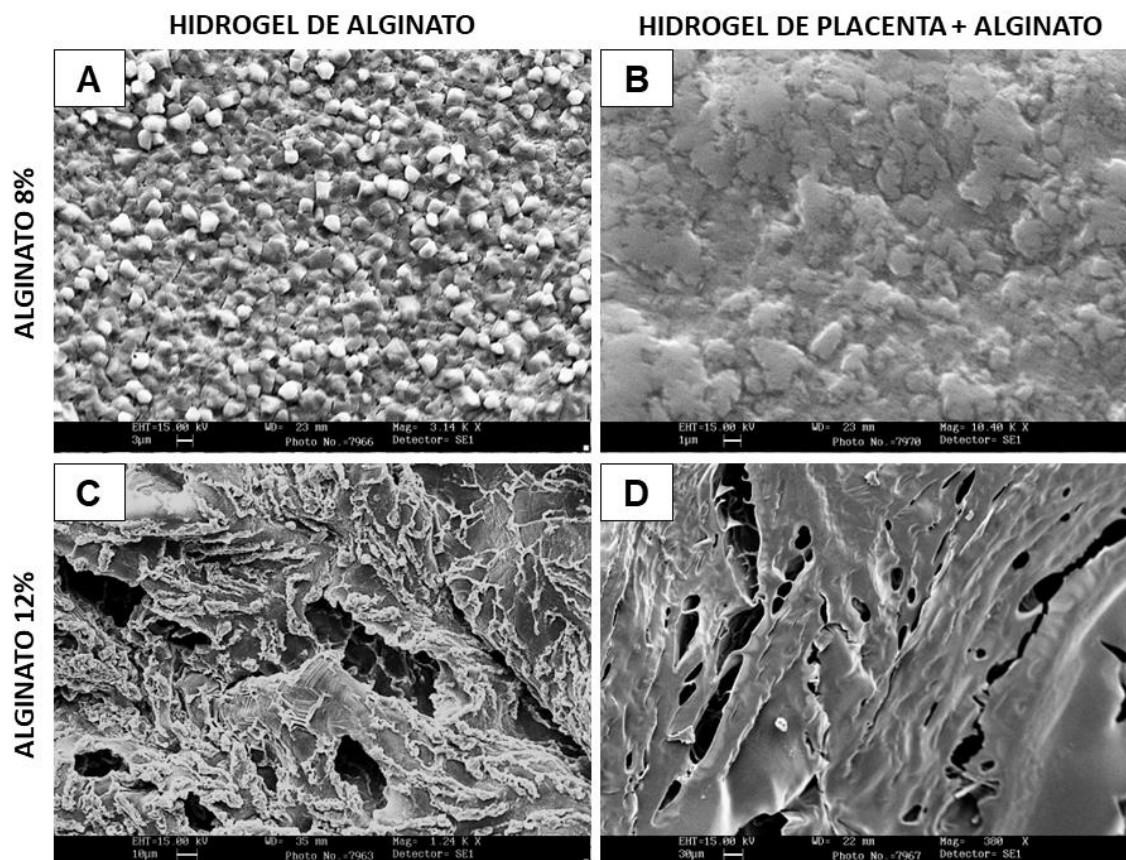
Figura 5 – Produção de hidrogéis a partir de cotilédones bovinos descelularizados.



Fonte: Smirnow, 2023

Legenda: **A e C.** Observar a capacidade de absorção do meio de cultura do hidrogel, formulado com a matriz extracelular da placenta bovina digerida com adição de alginato na concentração 8%, sem a ocorrência de mudança de sua forma. **B e D.** Observar a capacidade de absorção do meio de cultura do hidrogel, formulado com matriz de placenta digerida com adição de alginato na concentração de 12%, com a melhor preservação de sua estrutura, sendo possível observar as bolhas formadas durante o processo de desenvolvimento do hidrogel.

Figura 6 – Avaliação ultraestrutural dos hidrogéis.



Fonte: Smirnow, 2023

Legenda: **A.** Observar as estruturas granulares presentes, correspondendo aos grânulos de alginato. **B.** Observar compactação do hidrogel, sem presença de poros. **C.** Observar a presença de poros no hidrogel. **D.** Observar a presença de poros no hidrogel, os quais estão interpostos entre as estruturas de lamelas.

7.4. AVALIAÇÃO DOS BIOMATERIAIS APÓS A RECELULARIZAÇÃO.

Dado os diferentes períodos de recelularização (15 dias e 25 dias) dos biomateriais com as células tronco mesenquimais e células tronco mesenquimais em diferenciação para linhagem osteogênica (Figura 7 e Figura 8), foi realizada a avaliação da aderência na superfície do biomaterial e a migração destas células para o interior do mesmo.

Em relação as células tronco mesenquimais, tanto nos dias 15 (Figura 7 – A, B, C e D) e 25 (Figura 8 – A, B, C e D), em um primeiro momento, os achados histológicos com a coloração de hematoxilina e eosina, observou-se uma maior prevalência destas células na superfície do biomaterial, as quais mostravam-se

aderidas, fato que pôde ser visualizado através do aspecto morfológico das células, em especial pelo seu núcleo com forma alongada (Figura 7 – A e Figura 8 – A). Na microscopia eletrônica de varredura, foi possível comprovar os achados histológicos da coloração de hematoxilina e eosina, sendo possível observar uma ampla distribuição destas células pela superfície do biomaterial e novamente, as mesmas encontravam-se aderidas, fato agora observado pelo aspecto morfológico das células, as quais apresentavam-se fibroblastóide ou de formato estrelado (Figura 7 – D e Figura 8 – D). Após esses achados, foi realizada a marcação dos núcleos celulares com DAPI e visualização no microscópio confocal, agora com objetivo não apenas visualizar a presença dessas células na superfície do material, mas também a sua presença em profundidade no. Dessa forma, foi possível observar a presença dessas células no interior do biomaterial de forma homogênea (Figura 7 – C, Figura 8 – C).

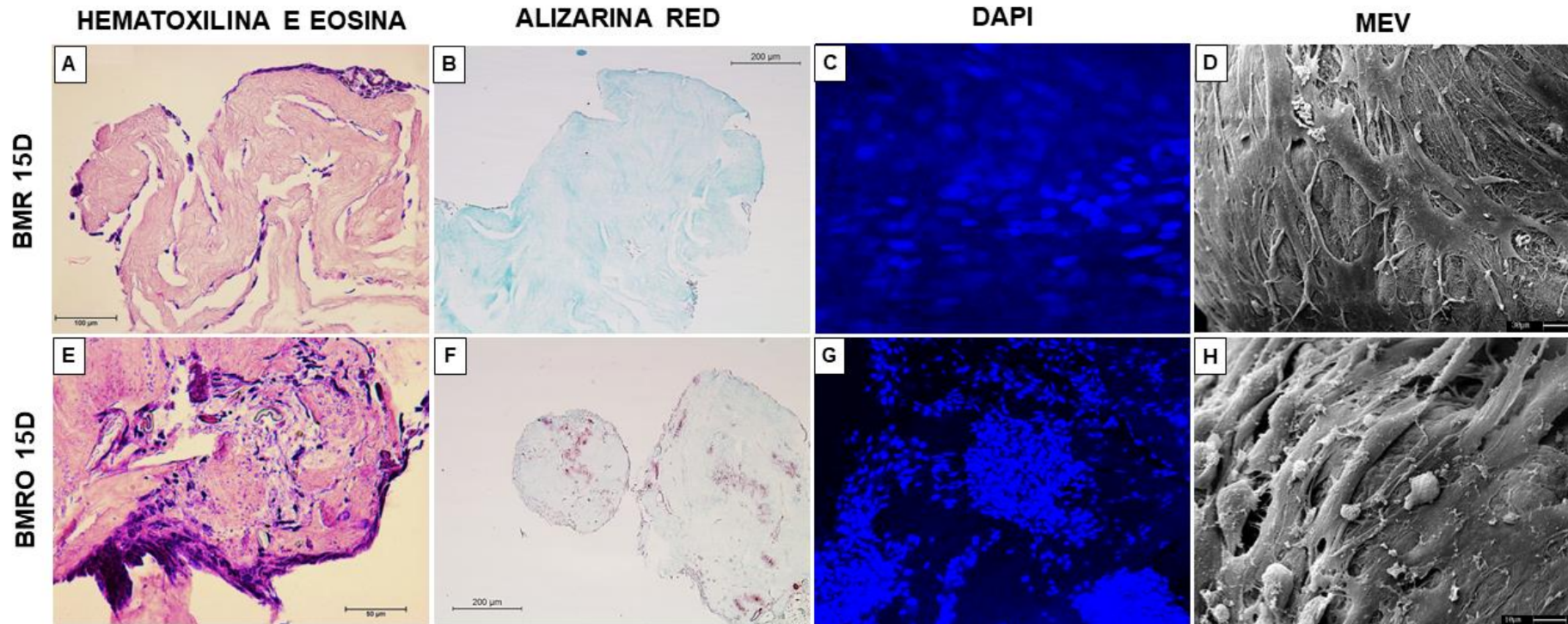
Comparando os resultados obtidos nos diferentes dias de análise da recelularização, visualmente havia uma maior quantidade de células no dia 25, quando comparado ao dia 15 da recelularização. Por fim, em relação a recelularização do biomaterial com as células tronco mesenquimais (não diferenciadas), vale salientar que, através da coloração de alizarina *red*, não foram encontradas marcações referentes a presença de grânulos de cálcio (cor vermelha) em ambas as datas, sendo possível visualizar apenas os componentes da matriz extracelular, estes corados em verde (Figura 7 – B, Figura 8 – B).

Em relação a recelularização dos biomateriais com células tronco mesenquimais em diferenciação para linhagem osteogênica (Figura 7 – E, F, G, H e Figura 8 - E, F, G, H) foi possível observar, em um primeiro momento, através dos achados histológicos com a coloração de hematoxilina e eosina, a ampla distribuição dessas células pelo biomaterial, tanto na superfície, quanto no seu interior. Vale salientar que, comparando a quantidade de células na coloração de hematoxilina e eosina, visualmente, no dia 25 de recelularização, apresentou maior quantidade de células quando comparado no dia 15. Ainda sobre a coloração de hematoxilina e eosina, foi possível observar estruturas de aspecto granular, essas coradas em roxo, com tamanho menor que as células, podendo ser um indício para a presença de grânulos de cálcio. Este fato foi confirmado através da coloração de alizarina *red*, podendo observar esses grânulos, corados em vermelho, em maior quantidade no grupo de 25 dias. Em relação a microscopia eletrônica de varredura, foi possível

observar uma mudança de aspecto morfológico das células, passando de formato fibroblastóide ou estrelado para fusiforme; além disso foi possível observar a presença destas células não apenas na superfície do biomaterial, mas também adentrando em seus poros formados entre as proteínas fibrosas da matriz extracelular. Com a marcação do DAPI e visualização em microscopia confocal, visualmente houve aumento de quantidade de células no dia 25 quando comparado ao dia 15, sendo que em ambos os dias, estas células adentraram no interior do biomaterial.

Após a exposição dos hidrogéis (placenta com alginato 8% e placenta com alginato 12%) a luz ultravioleta e manutenção do mesmo em estufa por 5 dias, na presença de meio de cultura completo, não foi observada turbidez ou presença de precipitados, indicando que não houve contaminação significativa por bactérias ou fungos. Com isso, deu-se o início do processo de recelularização dos hidrogéis que, após 7 dias, foram retirados e incubados por DAPI e visualizados em microscópio de epi-fluorescência (Figura 9), sendo que, nos hidrogéis não recelularizados, não foi possível identificar autofluorescências. Ainda em relação a marcação com DAPI, foi possível observar a presença de células apenas no hidrogel de placenta com alginato 12%, sendo que no hidrogel de placenta com alginato 8%, só foi possível observar debris celulares.

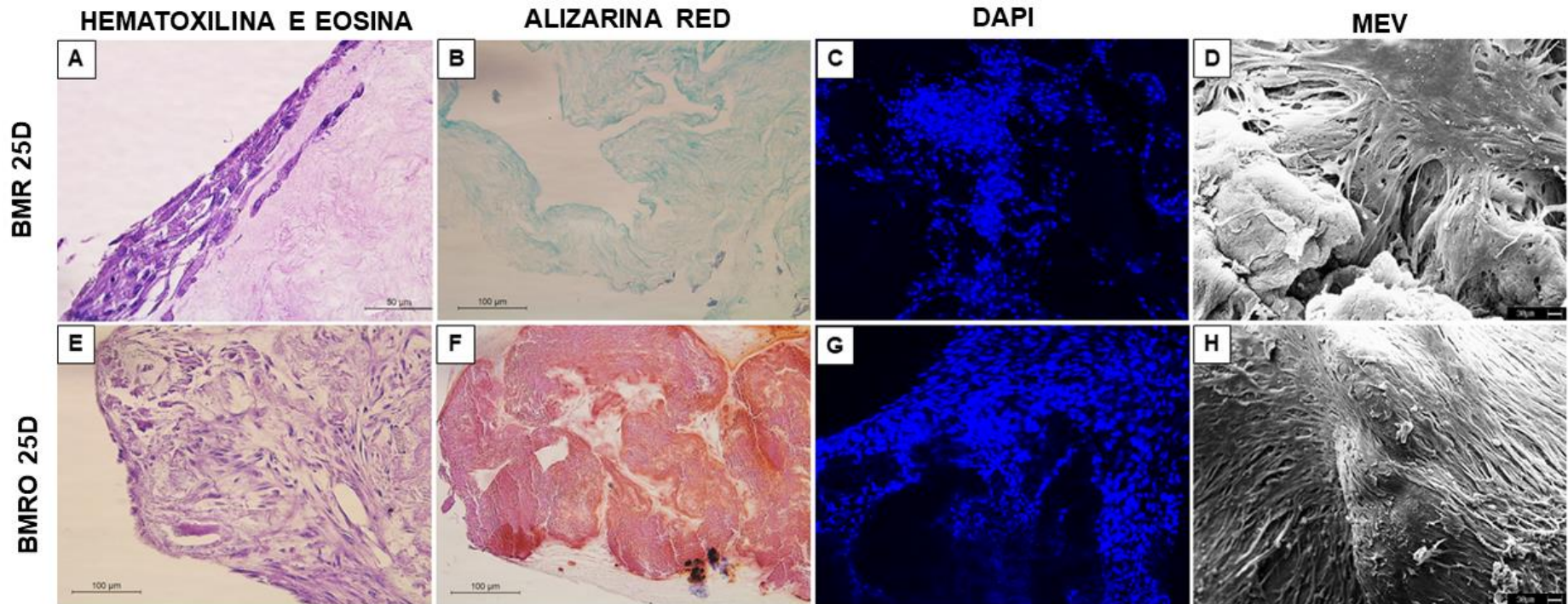
Figura 7 – Avaliação de recelularização dos biomateriais recelularizados após 15 dias de cultivo (BMR 15D) e dos biomateriais recelularizados com células osteogênicas após 15 dias de cultivo (BMRO 15).



Fonte: Smirnow, 2023

Legenda: **A.** Observar a presença das células, com seus núcleos alongados, com maior quantidade na superfície do material. **B.** Observar apenas a presença da matriz extracelular corada em verde, indicando ausência de depósitos de cálcio. **C.** Observar a presença da ampla distribuição dos núcleos celulares marcados em azul no interior do biomaterial, indicando recelularização em profundidade. **D.** Observar as células tronco mesenquimais aderidas na superfície do biomaterial, apresentando aspecto fibroblastóide ou estrelado, indicando adesão. **E.** Observar a presença das células com ampla distribuição, tanto na superfície quanto no interior do biomaterial, além da presença de componentes de aspectos granulares, estes corados em roxo. **F.** Observar a presença de grânulos de cálcio, em vermelho, dispostos pela matriz extracelular corada em verde. **G.** Observar a ampla distribuição das células osteoprogenitoras no interior do biomaterial, visualizando a presença de diversos núcleos celulares marcados de azul. **H.** Observar a ampla distribuição das células osteogênicas na superfície do biomaterial, estas que se encontram aderidas e com aspecto fusiforme.

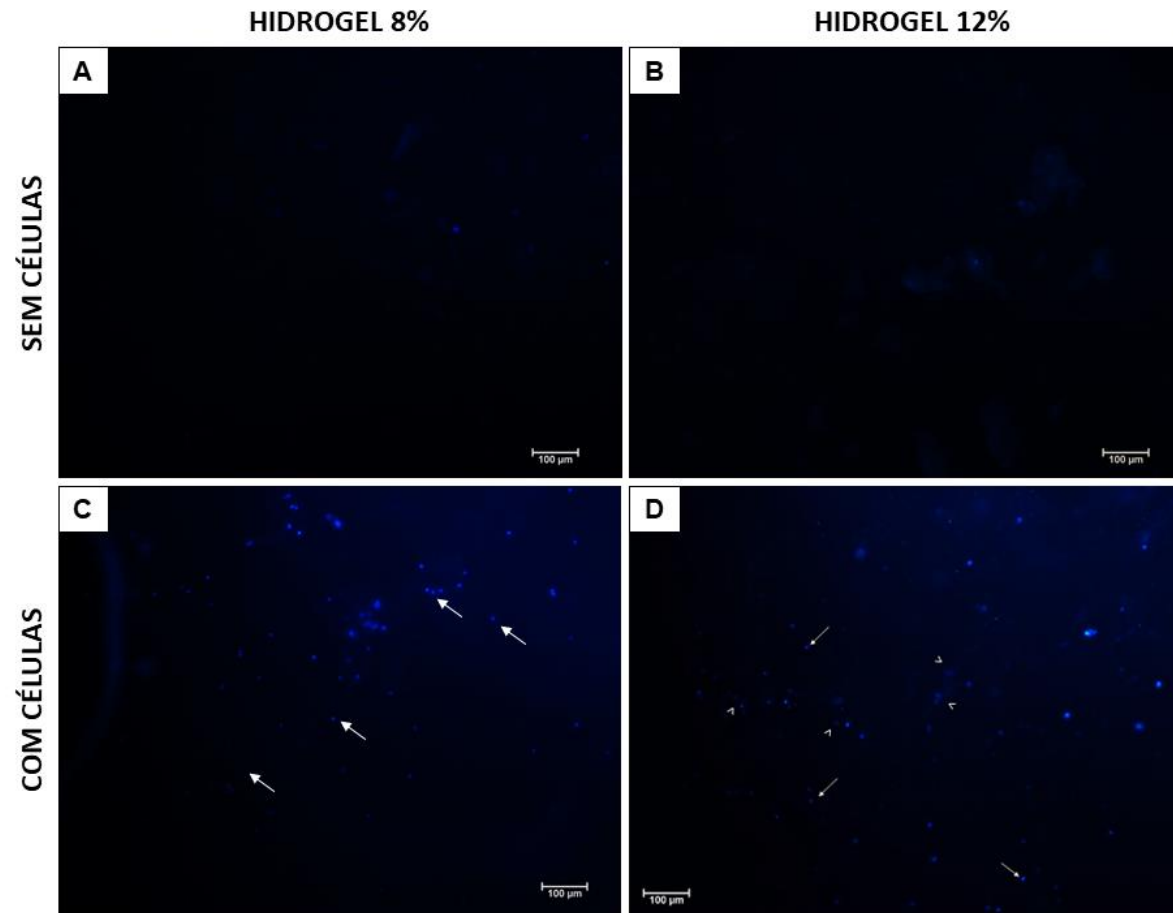
Figura 8 – Avaliação de recelularização dos biomateriais recelularizados após 25 dias de cultivo (BMR 25D) e dos biomateriais recelularizados com células osteogênicas após 25 dias de cultivo (BMRO 25D).



Fonte: Smirnow, 2023.

Legenda: **A.** Observar a presença das células, com seus núcleos alongados, com maior quantidade na superfície do material, estando dispostas em estratos. **B.** Observar apenas a presença da matriz extracelular corada em verde, indicando ausência de grânulos de cálcio. **C.** Observar a presença da ampla distribuição dos núcleos celulares marcados em azul no interior do biomaterial. **D.** Observar as células tronco mesenquimais aderidas na superfície do biomaterial, apresentando aspecto fibroblastóide ou estrelado, sendo possível observar novamente a organização em estratos. **E.** Observar a presença das células com ampla distribuição, tanto na superfície quanto no interior do biomaterial. **F.** Observar a presença de grânulos de cálcio, em vermelho, dispostos pela matriz extracelular corada em verde. **G.** Observar a ampla distribuição das células osteoprogenitoras no interior do biomaterial, visualizando a presença de diversos núcleos celulares marcados de azul. **H.** Observar a ampla distribuição das células osteogênicas na superfície do biomaterial, estas que se encontram aderidas e com aspecto fusiforme.

Figura 9 – Avaliação do hidrogel após a recelularização.



Fonte: Smirnow, 2023

Legenda: **A** e **B**. Observar a ausência de autofluorescência no hidrogel. **C**. Observar a presença de debris celulares (seta). **D**. Observar a presença de núcleos células com seu citoplasma (ponta de seta) e debris celulares (setas).

8. DISCUSSÃO

Visto a problemática relacionada aos materiais existentes utilizados para o preenchimento de grandes defeitos ósseos, a placenta bovina, por ser um órgão descartado, é uma boa fonte para a descelularização, que já foi evidenciado a preservação de seus constituintes após a técnica (ALVES, 2020; BARRETO *et al.*, 2018).

A alteração, observada a olho nu, referente a diminuição do tamanho dos cotilédones está relacionada diretamente com a retirada das células dos tecidos, causada pelo efeito dos detergentes utilizados no processo de descelularização. Já a sua aparência esbranquiçada indica a preservação, principalmente, das fibras de colágeno do tipo I, que no seu estado fresco apresenta a mesma cor, podendo ser observada a mesma tonalidade em tendões (GAY; MILLER, 1978). Enquanto que as porções translúcidas remetem a preservação dos componentes da substância fundamental, pois é uma estrutura semelhante a um gel, possuindo as características de ser incolor e translúcida (JUNQUEIRA; MONTES, 1983).

A remoção de células e núcleos foram evidenciados pelas técnicas de hematoxilina e eosina, e microscopia eletrônica de varredura. Além do fato do teor de DNA genômico remanescente estar abaixo de 50ng por mg de matriz extracelular seca. Portanto, o biomaterial não apresenta potenciais características imunogênicas, assim respeitando parâmetros propostos para a validação de biomateriais (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). A importância do cumprimento desses parâmetros está relacionada a evitar o desencadeamento de respostas inflamatórias *in vivo* (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; NAGATA; HANAYAMA; KAWANE, 2010; ZHANG *et al.*, 2010) e problemas de citocompatibilidade *in vitro* (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; KUMAR *et al.*, 2013). Além do cumprimento dos parâmetros citados anteriormente, também foi observado a preservação das estruturas e dos componentes da matriz extracelular, o que pode proporcionar o sucesso no processo de recelularização (BADYLAK; FREYTES; GILBERT, 2009; BAPTISTA *et al.*, 2011; UYGUN *et al.*, 2010)

Com as imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura, foi possível visualizar a preservação dos constituintes fibrosos da matriz extracelular, permitindo afirmar que a estrutura tridimensional do biomaterial foi preservada. Tal

fato é de extrema importância porque pode influenciar positivamente no rearranjo celular no processo de recelularização, pois já foi observado que os componentes da matriz extracelular ditam a orientação das células (WANG; GUAN JIANJUN, 2010).

Com o interesse de desenvolvimento de biomateriais para enxertos ósseos, existe a necessidade da preservação dos constituintes fibrosos das matrizes, o qual já foi observado, pois em suas extremidades ocorre a deposições dos minerais, os quais fornecem a rigidez mecânica e resistência a cargas mecânicas que ocorrem no tecido ósseo (CLARKE, 2008; LANDIS, 1995).

Visto a mudança de forma de aplicação da técnica de descelularização já estabelecida (ALVES, 2020; BARRETO *et al.*, 2018), de perfusão para agitação e imersão, pode-se dizer que a nova aplicação é tão eficaz quanto a anterior, visto a preservação dos constituintes da matriz extracelular e retirada das células. Além disso, foi possível realizar a diminuição de tempo no processo de descelularização, passando de 11 dias (ALVES, 2020) para 8 dias.

De acordo com os parâmetros mínimos estabelecidas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI *et al.*, 2006), para a validação de células tronco mesenquimais, as células apresentaram a capacidade de aderência ao plástico em meio de cultura padrão; além da capacidade de diferenciação nas linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas. Em relação expressão dos antígenos de superfície, é importante a elevada expressão do CD90, visto que o mesmo é um marcador específico para estas células; já a baixa expressão dos antígenos de superfície CD34 e CD45, é necessária, visto que eles são marcadores de células progenitoras hematopoiéticas e células endoteliais, e marcador pan-leucocitário, respectivamente (DOMINICI *et al.*, 2006; ERCOLIN *et al.*, 2016; FRANCIOLLI *et al.*, 2020). Em relação aos aspectos morfológicos fibroblastóide e estrelado, encontrados nas células após a sua aderência ao plástico, são semelhantes aos trabalhos que realizaram a caracterização de células tronco mesenquimais provenientes de cães (KISIEL *et al.*, 2012; PATRICIO *et al.*, 2013).

Ainda como alternativas de utilização da placenta em sua estrutura natural, pode-se desenvolver um hidrogel a partir da sua digestão. Por menos agressivo que seja o método de digestão para o desenvolvimento da solução pré-gel, ainda existe a chance de perdas de alguns componentes da matriz extracelular (KABIRIAN; MOZAFARI, 2020). Os colágenos estão presentes em grande quantidade no

biomaterial (BALLESTEROS *et al.*, 2020), mas mesmo estando preservados, pode existir a necessidade da utilização de aditivo, que no caso foi o alginato, que venham a melhorar a estrutura tridimensional do hidrogel (PARMAKSIZ; ELÇIN; ELÇIN, 2019; SPICER, 2020; YU *et al.*, 2019).

Para a realização do processo de reticulação do hidrogel com alginato, tem-se preferido a utilização de íons de cálcio (LIPAROTI; SPERANZA; MARRA, 2021; RASTOGI; KANDASUBRAMANIAN, 2019; SPICER, 2020; ZHANG; ZHAO, 2020). O aparecimento de bolhas no hidrogel com alginato na concentração de 12% está relacionado com a formação dessas estruturas durante o desenvolvimento do hidrogel, sendo geradas através de agitação. LIPAROTI, SPERANZA e MARRA (2021), também conseguiram desenvolver bolhas durante a reticulação de seu hidrogel de alginato, mas essas estruturas foram formadas devido a dissociação do carbonato de cálcio, gerando a liberação de CO₂. Tais bolhas, independente da forma que são geradas, são as responsáveis pela formação dos poros no hidrogel, sendo que, quanto maior o teor de alginato na formulação, maior será a quantidade e tamanho dos poros ali presentes (LIPAROTI; SPERANZA; MARRA, 2021). Esse fato explica a presença de bolhas em uma vista macroscópica e presença de poros na microscopia eletrônica de varredura encontrados no hidrogel com alginato 12%, tais achados que não foram possíveis de observar no hidrogel com alginato 8%.

Embora o hidrogel composto apenas por alginato na concentração 12% apresentasse poros em sua estrutura, componente essencial para o microambiente, pois proporciona a difusão de nutrientes, metabólitos e gases por todo o hidrogel (SARKER *et al.*, 2016; YOU; WU; CHEN, 2017); a utilização de componentes da matriz extracelular são de extrema importância, visto que influenciam diretamente no comportamento celular, auxiliando assim a aderência das células ao hidrogel (BISSELL; HALL; PARRY, 1982b; SALDIN *et al.*, 2017).

Mesmo com o principal componente do hidrogel sendo os componentes da matriz extracelular provenientes dos cotilédones descelularizados, contando com o alginato como aditivo, a fim de melhorar a estrutura do hidrogel (fornecendo rigidez e poros), não foi possível observar a repopulação do hidrogel com as células mesenquimais. Isso pode ser explicado pelo tempo que as células foram mantidas na estufa no hidrogel que, mesmo com a adição de meio de cultura fornecendo os devidos nutrientes necessários, teve uma enorme dificuldade em realização da troca

do meio de cultura, fazendo com que esse ato fosse incapaz de ser realizado sem a aspiração do hidrogel juntamente com as células. Em períodos mais curtos de recelularização do hidrogel, foi observado uma elevada repopulação de células no hidrogel em 72h (dados do grupo ainda não publicados).

Em relação a recelularização dos biomateriais, tanto de células mesenquimais e de células mesenquimais em diferenciação para linhagem osteogênica, pode-se dizer que ocorreram de forma satisfatória. Fato este relacionado à preservação dos constituintes da matriz extracelular, mas também do arranjo os biomateriais (BARACHO TRINDADE HILL *et al.*, 2020; BARRETO *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2022), fornecendo assim não apenas a aderência das células na superfície, mas também sua invasão pelos poros que antes eram habitados pelas células presentes nos cotilédones.

A recelularização com as células tronco mesenquimais não chegaram a apresentar diferenciações em determinadas linhagens, o que poderia ser observado através das alterações morfológicas das células e/ou secreções de produtos no meio extracelular: células com formato fusiforme e presença de grânulos de cálcio associados as fibras colágenas matriz extracelular para linhagens osteogênicas, ou a presença de células com gotículas de lipídeos em seu citoplasmas para linhagens adipogênicas, por exemplo. Assim, esse biomaterial pode apresentar a ter interesse clínico, sendo utilizado para enxertias visando estimular respostas anti-inflamatórias e/ou estímulos para as células progenitoras voltarem a expressar sua funcionalidade (BARACHO TRINDADE HILL *et al.*, 2020).

Os biomateriais proporcionaram um ambiente adequado e, juntamente com os estímulos adequados (presença de meio de diferenciação) foi possível realizar a diferenciação das células tronco mesenquimais em células de linhagem osteogênica, assim como sua proliferação. Isso é possível de observar pela mudança morfológica da célula, aparentando ser uma célula osteoprogenitora pelo seu aspecto fusiforme (NAHIAN; DAVIS, 2022); além disso, foi possível visualizar o processo de mineralização do tecido conjuntivo, com presença de grânulos de cálcio, através da coloração de alizarina *red*. Com isso, esse biomaterial apresenta um potencial uso clínico para afecções que necessitem de reparo ósseo, visto que atualmente, já se tem estudos avaliando a regeneração óssea com o uso de biomateriais associados com células osteoprogenitoras (BAJURI *et al.*, 2021; CLOUGH *et al.*, 2015).

Considerando os grandes defeitos ósseos, gerados por fraturas, por exemplo, existe a necessidade de preenchimento dessa lesão, visto que tecido ósseo não consegue realizar o auto reparo (CHEN et al., 2018; CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014; FISHER; PERETTI; SCOTTI, 2016; LOPES et al., 2018; MANSOUR et al., 2017; ONISHI et al., 2018). Sabendo disso, o enxerto deve possuir características osteoindutivas, o que corresponde a formação do novo tecido ósseo.

Dessa forma, os biomateriais recelularizados mostram-se com um potencial para tal proposta, visto que sua constituição permite a proliferação das célula tronco mesenquimais que, em um processo de reparo ósseo, seriam recrutadas pelo organismo e diferenciaram-se em osteoblastos ou condroblastos, para a realização da ossificação intramembranosa ou endocondral, respectivamente (KNIGHT; HANKENSON, 2013); ou então com a presença de células osteoprogenitoras provindas de células tronco mesenquimais diferenciadas, as quais podem acelerar o processo de cicatrização (ALVES et al., 2017).

9. CONCLUSÃO

É possível concluir que a placenta bovina descelularizada é uma fonte viável para a produção de biomateriais, tanto descelularizados e hidrogel, fornecendo um microambiente adequado não só para a recepção das células, mas também a sua manutenção, permitindo assim o desenvolvimento de potenciais biomateriais ósseos funcionalizados.

REFERÊNCIAS

- ALLORI, A. C.; SAILON, A. M.; WARREN, S. M. **Biological basis of bone formation, remodeling, and repair - Part II: Extracellular matrix Tissue Engineering - Part B: Reviews** set. 2008.
- ALVES, A. A. S. **Placenta bovina de clones descelularizada como fonte de scaffolds biológicos**. 2020. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.
- ALVES, E. G. L.; SERAKIDES, R.; ROSADO, I. R.; PAEZ, O. L. A.; VARON, J. A. C.; MACHADO, F. N.; FUKUSHIMA, F. B.; GÓES, A. M.; DE FARIA REZENDE, C. M. Osteoprogenitor cells can enhance early bone formation in critical bone defects in dogs. **Ciência Rural**, v. 47, n. 7, p. e20151109, 12 jun. 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/cr/a/9yYtQvKNcQgzV3JdfSydwTr/?lang=en>>. Acesso em: 30 mar. 2023.
- AMINI, Z.; LARI, R. A systematic review of decellularized allograft and xenograft-derived scaffolds in bone tissue regeneration. **Tissue and Cell**, v. 69, p. 101494, 1 abr. 2021. . Acesso em: 30 mar. 2023.
- ANASIZ, Y.; OZGUL, R. K.; UCKAN-CETINKAYA, D. **A New Chapter for Mesenchymal Stem Cells: Decellularized Extracellular Matrices Stem Cell Reviews and Reports** Humana Press Inc., 1 out. 2017.
- 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, 25 jan. 2013.
- BABA, S.; INOUE, T.; HASHIMOTO, Y.; KIMURA, D.; UEDA, M.; SAKAI, K.; MATSUMOTO, N.; HIWA, C.; ADACHI, T.; HOJO, M. Effectiveness of scaffolds with pre-seeded mesenchymal stem cells in bone regeneration--assessment of osteogenic ability of scaffolds implanted under the periosteum of the cranial bone of rats. **Dental materials journal**, v. 29, n. 6, p. 673–681, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21099156/>>. Acesso em: 30 mar. 2023.
- BADYLAK, S. F.; FREYTES, D. O.; GILBERT, T. W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706108002821>>. Acesso em: 28 out. 2018.
- BADYLAK, S. F.; TAYLOR, D.; UYGUN, K. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 13, n. 1, p. 27–53, 15 ago. 2011.
- BAJURI, M. Y.; SELVANATHAN, N.; DZEIDEE SCHAFF, F. N.; ABDUL SUKI, M. H.; NG, A. M. H. Tissue-Engineered Hydroxyapatite Bone Scaffold Impregnated with Osteoprogenitor Cells Promotes Bone Regeneration in Sheep Model. **Tissue**

engineering and regenerative medicine, v. 18, n. 3, p. 377–385, 1 jun. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34043210/>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

BALLESTEROS, A. C. V.; PUELLO, H. R. S.; LOPEZ-GARCIA, J. A.; BERNAL-BALLEN, A.; MOSQUERA, D. L. N.; FORERO, D. M. M.; CHARRY, J. S. S.; BEJARANO, Y. A. N. Bovine decellularized amniotic membrane: Extracellular matrix as scaffold for mammalian skin. **Polymers**, v. 12, n. 3, 1 mar. 2020.

BAPTISTA, P. M.; SIDDIQUI, M. M.; LOZIER, G.; RODRIGUEZ, S. R.; ATALA, A.; SOKER, S. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. **Hepatology**, v. 53, n. 2, p. 604–617, 1 fev. 2011.

BARACHO TRINDADE HILL, A.; SPERI ALVES, A. A.; DA SILVA NUNES BARRETO, R.; FERNANDES BRESSAN, F.; MIGLINO, M. A.; MANSANO GARCIA, J. Placental scaffolds have the ability to support adipose-derived cells differentiation into osteogenic and chondrogenic lineages. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 14, n. 11, p. 1661–1672, 1 nov. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/term.3124>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

BARRETO, R. da S. N.; CARREIRA, A. C. O.; SILVA, M. D. da; FERNANDES, L. A.; RIBEIRO, R. R.; ALMEIDA, G. H. D. R.; PANTOJA, B. T. dos S.; NISHIYAMA JUNIOR, M. Y.; MIGLINO, M. A. Mice Placental ECM Components May Provide A Three-Dimensional Placental Microenvironment. **Bioengineering**, v. 10, n. 1, p. 16, 22 dez. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-5354/10/1/16/htm>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

BARRETO, R. da S. N.; CARREIRA, A. C. O.; SILVA, M. D. da; FERNANDES, L. A.; RIBEIRO, R. R.; ALMEIDA, G. H. D. R.; PANTOJA, B. T. dos S.; NISHIYAMA JUNIOR, M. Y.; MIGLINO, M. A. Mice Placental ECM Components May Provide A Three-Dimensional Placental Microenvironment. **Bioengineering**, v. 10, n. 1, p. 16, 1 jan. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-5354/10/1/16/htm>>. Acesso em: 30 mar. 2023.

BARRETO, R. da S. N.; ROMAGNOLLI, P.; MESS, A. M.; MIGLINO, M. A. Decellularized bovine cotyledons may serve as biological scaffolds with preserved vascular arrangement. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 4, p. e1880–e1888, 13 abr. 2018.

BARTH, F. R. **Ligas metálicas empregadas no tratamento de fraturas de fêmur em cães e gatos** Trabalho de Conclusão de Curso Porto Alegre. 2016.

BEREBICHEZ-FRIDMAN, R.; MONTERO-OLVERA, P. R. Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells state-of-the-art review. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 18, n. 3, p. e264–e277, 1 ago. 2018.

BERNARD, M. P.; CHU, M. L.; MYERS, J. C.; RAMIREZ, F.; EIKENBERRY, E. F.; PROCKOP, D. J. Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the pro alpha 1 chain of human type I procollagen. Statistical evaluation of structures

that are conserved during evolution. **Biochemistry**, v. 22, n. 22, p. 5213–5223, 1983. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6689127/>>. Acesso em: 30 mar. 2023.

BILODEAU, C.; GOLTSIS, O.; ROGERS, I. M.; POST, M. **Limitations of recellularized biological scaffolds for human transplantation***Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* John Wiley and Sons Ltd, 2019.

BISSELL, M. J.; HALL, H. G.; PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? **Journal of theoretical biology**, v. 99, n. 1, p. 31–68, 7 nov. 1982a.

BISSELL, M. J.; HALL, H. G.; PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? **Journal of Theoretical Biology**, v. 99, n. 1, p. 31–68, 7 nov. 1982b. . Acesso em: 26 mar. 2023.

BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. **Recent advances in bone tissue engineering scaffolds***Trends in Biotechnology* Elsevier Current Trends, 1 out. 2012.

BROWN, B. N.; FREUND, J. M.; HAN, L.; RUBIN, J. P.; REING, J. E.; JEFFRIES, E. M.; WOLF, M. T.; TOTTEY, S.; BARNES, C. A.; RATNER, B. D.; BADYLAK, S. F. Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 17, n. 4, p. 411–421, 1 abr. 2011.

BUENO, E. M.; GLOWACKI, J. **Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration***Nature Reviews Rheumatology* dez. 2009.

CAPELLA-MONSONÍS, H.; ZEUGOLIS, D. I. Decellularized xenografts in regenerative medicine: From processing to clinical application. **Xenotransplantation**, v. 28, n. 4, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33709410/>>. Acesso em: 30 mar. 2023.

CHEN, X.; FAN, H.; DENG, X.; WU, L.; YI, T.; GU, L.; ZHOU, C.; FAN, Y.; ZHANG, X. **Scaffold structural microenvironmental cues to guide tissue regeneration in bone tissue applications***Nanomaterials* MDPI AG, 21 nov. 2018.

CHENG, C. W.; SOLORIO, L. D.; ALSBERG, E. **Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering***Biotechnology Advances* Elsevier Inc., 2014.

CHENG, S. F.; WU, S.; LI, Q. P.; SANG, H. Y.; FAN, Z. Y. Airway reconstruction using decellularized aortic xenografts in a dog model. **Organogenesis**, v. 16, n. 3, p. 73–82, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32674702/>>. Acesso em: 30 mar. 2023.

CHEUNG, H. Y.; LAU, K. T.; LU, T. P.; HUI, D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. **Composites Part B: Engineering**, v. 38, n. 3, p. 291–300, 1 abr. 2007.

CHOI, J. S.; KIM, J. D.; YOON, H. S.; CHO, Y. W. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules. **Tissue engineering. Part A**, v. 19, n. 3–4, p. 329–39, fev. 2013.

CLARKE, B. **Normal bone anatomy and physiology. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**2008.

CLOUGH, B. H.; MCCARLEY, M. R.; KRAUSE, U.; ZEITOUNI, S.; FROESE, J. J.; MCNEILL, E. P.; CHAPUT, C. D.; SAMPSON, H. W.; GREGORY, C. A. Bone regeneration with osteogenically enhanced mesenchymal stem cells and their extracellular matrix proteins. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 1, p. 83–94, 1 jan. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25130615/>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

CONFALONIERI, D.; SCHWAB, A.; WALLEES, H.; EHLICKE, F. Advanced Therapy Medicinal Products: A Guide for Bone Marrow-derived MSC Application in Bone and Cartilage Tissue Engineering. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 24, n. 2, p. 155–169, 2018.

CONKLIN, B. S.; RICHTER, E. R.; KREUTZIGER, K. L.; ZHONG, D.-S.; CHEN, C. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. **Medical engineering & physics**, v. 24, n. 3, p. 173–83, abr. 2002.

CORONA, B. T.; RATHBONE, C. R. Accelerated functional recovery after skeletal muscle ischemia-reperfusion injury using freshly isolated bone marrow cells. **The Journal of surgical research**, v. 188, n. 1, p. 100–109, 1 maio 2014.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296410>>. Acesso em: 26 maio. 2019.

DAMIEN, C. J.; PARSONS, J. R. **Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. Journal of applied biomaterials : an official journal of the Society for Biomaterials**1991.

DAS, K.; BALLA, V. K.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. Surface modification of laser-processed porous titanium for load-bearing implants. **Scripta Materialia**, v. 59, n. 8, p. 822–825, 1 out. 2008.

DE FILIPPO, R. E.; YOO, J. J.; ATALA, A. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. **The Journal of urology**, v. 168, n. 4 Pt 2, p. 1789–92; discussion 1792-3, out. 2002.

DE PEPPA, G. M.; MARCOS-CAMPOS, I.; KAHLER, D. J.; ALSALMAN, D.; SHANG, L.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; MAROLT, D. Engineering bone tissue substitutes from human induced pluripotent stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 21, p. 8680–8685, 21 maio 2013.

- DE SÁ SCHIAVO MATIAS, G.; DA SILVA NUNES BARRETO, R.; CARREIRA, A. C. O.; JUNIOR, M. Y. N.; FRATINI, P.; FERREIRA, C. R.; MIGLINO, M. A. Proteomic profile of extracellular matrix from native and decellularized chorionic canine placenta. **Journal of proteomics**, v. 256, 30 mar. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35092837/>>. Acesso em: 30 mar. 2023.
- DESTEFANI, A. C.; SIRTOLI, G. M.; NOGUEIRA, B. V. Advances in the Knowledge about Kidney Decellularization and Repopulation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, p. 34, 1 jun. 2017.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, ago. 2006. . Acesso em: 6 abr. 2020.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. Alguns Aspectos e Conceitos Básico. *Em: Tratado de Anatomia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. p. 1–28.
- ELDER, B. D.; KIM, D. H.; ATHANASIOU, K. A. Developing an Articular Cartilage Decellularization Process Toward Facet Joint Cartilage Replacement. **Neurosurgery**, v. 66, n. 4, p. 722–727, abr. 2010.
- EL-SHERBINY, I. M.; YACOUB, M. H. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. **Global cardiology science & practice**, v. 2013, n. 3, p. 38, set. 2013.
- ERCOLIN, A. C. M.; ROBALLO, K. C. S.; CASALS, J. B.; PIERI, N. C. G.; SOUZA, A. F.; BARRETO, R. da S. N.; BRESSAN, F. F.; FEITOSA, M. L. T.; MIGLINO, M. A.; MEIRELLES, F. V.; AMBRÓSIO, C. E. Rabbit olfactory stem cells. Isolation protocol and characterization. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 59–66, 1 jan. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020160010000009>>. Acesso em: 6 mar. 2021.
- EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 2, n. 1, p. 11–45, 1973.
- FAULK, D. M.; WILDEMANN, J. D.; BADYLAK, S. F. Decellularization and Cell Seeding of Whole Liver Biologic Scaffolds Composed of Extracellular Matrix. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 5, n. 1, p. 69–80, mar. 2015.
- FEDECOSTANTE, M.; ONCIU, O. G.; WESTPHAL, K. G. C.; MASEREEUW, R. Towards a bioengineered kidney: recellularization strategies for decellularized native kidney scaffolds. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 40, n. 4, p. 150–158, 9 maio 2017.
- FILIPPI, M.; BOIDO, M.; PASQUINO, C.; GARELLO, F.; BOFFA, C.; TERRENO, E. Successful in vivo MRI tracking of MSCs labeled with Gadoteridol in a Spinal Cord Injury experimental model. **Experimental neurology**, v. 282, p. 66–77, 1 ago. 2016.

FINKEMEIER, C. G. **Bone-grafting and bone-graft substitutes** *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* *Journal of Bone and Joint Surgery Inc.*, 2002.

FISCHBACH, C.; CHEN, R.; MATSUMOTO, T.; SCHMELZLE, T.; BRUGGE, J. S.; POLVERINI, P. J.; MOONEY, D. J. Engineering tumors with 3D scaffolds. **Nature Methods**, v. 4, n. 10, p. 855–860, 2 out. 2007.

FISHER, J. N.; PERETTI, G. M.; SCOTTI, C. Stem Cells for Bone Regeneration: From Cell-Based Therapies to Decellularised Engineered Extracellular Matrices. **Stem cells international**, v. 2016, p. 9352598, 2016.

FRANCIOLLI, A. L. R.; BARRETO, R. S. N.; MATIAS, G. de S. S.; CARVALHO, R. C.; RODRIGUES, M. N.; FRATINI, P.; PIGNATARI, G. C.; RECHSTEINER, S. M. E. F.; MESS, A. M.; MIGLINO, M. A. Equine yolk sac: A stem cells source. **International Journal of Morphology**, v. 38, n. 5, p. 1412–1420, 1 out. 2020. Disponível em: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022020000501412&lng=es&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 6 mar. 2021.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 15 dez. 2010.

FREYTES, D. O.; BADYLAK, S. F.; WEBSTER, T. J.; GEDDES, L. A.; RUNDELL, A. E. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, v. 25, n. 12, p. 2353–61, maio 2004.

FREYTES, D. O.; MARTIN, J.; VELANKAR, S. S.; LEE, A. S.; BADYLAK, S. F. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. **Biomaterials**, v. 29, n. 11, p. 1630–1637, abr. 2008.

FRIIS, T.; HAACK-SØRENSEN, M.; MATHIASSEN, A. B.; RIPA, R. S.; KRISTOFFERSEN, U. S.; JØRGENSEN, E.; HANSEN, L.; BINDSLEV, L.; KJÆR, A.; HESSE, B.; DICKMEISS, E.; KASTRUP, J. Mesenchymal stromal cell derived endothelial progenitor treatment in patients with refractory angina. **Scandinavian cardiovascular journal : SCJ**, v. 45, n. 3, p. 161–168, jun. 2011.

FU, R.-H.; WANG, Y.-C.; LIU, S.-P.; SHIH, T.-R.; LIN, H.-L.; CHEN, Y.-M.; SUNG, J.-H.; LU, C.-H.; WEI, J.-R.; WANG, Z.-W.; HUANG, S.-J.; TSAI, C.-H.; SHYU, W.-C.; LIN, S.-Z. Decellularization and Recellularization Technologies in Tissue Engineering. **Cell Transplantation**, v. 23, n. 4–5, p. 621–630, maio 2014.

FU, Y.; KARBAAT, L.; WU, L.; LEIJTEN, J.; BOTH, S. K.; KARPERIEN, M. Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 23, n. 6, p. 515–528, 2017.

GANG, E. J.; DARABI, R.; BOSNAKOVSKI, D.; XU, Z.; KAMM, K. E.; KYBA, M.; PERLINGEIRO, R. C. R. Engraftment of mesenchymal stem cells into dystrophin-deficient mice is not accompanied by functional recovery. **Experimental cell research**, v. 315, n. 15, p. 2624–2636, 10 set. 2009.

GASQUE, K. C. da S.; CORREA, A. M.; CESTARI, T. M.; TAGA, R.; OLIVEIRA, R. C. de; ZAMBUZZI, W. F.; GRANJEIRO, J. M. Matriz colagênica de tendão bovino

como potencial biomaterial para bioengenharia de tecidos. **Innov. implant. j., biomater. esthet. (Impr.)**, v. 6, n. 1, p. 16–20, 2011.

GAY, S.; MILLER, E. J. **Collagen in the Physiology and Pathology of Connective Tissue**. New York: Gustav Fischer, 1978. 109 p.

GAZDAG, A. R.; LANE, J. M.; GLASER, D.; FORSTER, R. A. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 3, n. 1, p. 1–8, jan. 1995.

GENICIO, N.; GALLO PARAMO, J.; SHORTT, A. J. Quantum dot labeling and tracking of cultured limbal epithelial cell transplants in vitro. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 56, n. 5, p. 3051–3059, 2015.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. **Bone substitutes: an update**. *Injury* 2005.

GILBERT, T.; SELLARO, T.; BADYLAK, S. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675–83, 7 mar. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16519932>>. Acesso em: 20 out. 2018.

GILBERT, T. W. Strategies for tissue and organ decellularization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 7, p. 2217–2222, jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22415903>>. Acesso em: 26 maio. 2019.

GIULIANI, N.; LISIGNOLI, G.; MAGNANI, M.; RACANO, C.; BOLZONI, M.; DALLA PALMA, B.; SPOLZINO, A.; MANFERDINI, C.; ABATI, C.; TOSCANI, D.; FACCHINI, A.; AVERSA, F. New insights into osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and their potential clinical applications for bone regeneration in pediatric orthopaedics. **Stem cells international**, v. 2013, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23766767/>>. Acesso em: 30 mar. 2023.

GOMES, M. E.; BOSSANO, C. M.; JOHNSTON, C. M.; REIS, R. L.; MIKOS, A. G. In vitro localization of bone growth factors in constructs of biodegradable scaffolds seeded with marrow stromal cells and cultured in a flow perfusion bioreactor. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 1, p. 177–188, jan. 2006.

GUAN, Y.; LIU, S.; LIU, Y.; SUN, C.; CHENG, G.; LUAN, Y.; LI, K.; WANG, J.; XIE, X.; ZHAO, S. Porcine kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 56, p. 451–456, 1 nov. 2015.

HASHIMOTO, Y.; FUNAMOTO, S.; KIMURA, T.; NAM, K.; FUJISATO, T.; KISHIDA, A. The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p. 7060–7067, out. 2011.

HONG, J. W.; LEE, W. J.; HAHN, S. B.; KIM, B. J.; LEW, D. H. The Effect of Human Placenta Extract in a Wound Healing Model. **Annals of Plastic Surgery**, v. 65, n. 1, p. 96–100, jul. 2010.

HOPKINSON, A.; SHANMUGANATHAN, V. A.; GRAY, T.; YEUNG, A. M.; LOWE, J.; JAMES, D. K.; DUA, H. S. Optimization of Amniotic Membrane (AM) Denuding for Tissue Engineering. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 14, n. 4, p. 371–381, dez. 2008.

HOPPER, R. A.; WOODHOUSE, K.; SEMPLE, J. L. Acellularization of Human Placenta With Preservation of the Basement Membrane. **Annals of Plastic Surgery**, v. 51, n. 6, p. 598–602, dez. 2003.

HORWITZ, E. M.; PROCKOP, D. J.; FITZPATRICK, L. A.; KOO, W. W. K.; GORDON, P. L.; NEEL, M.; SUSSMAN, M.; ORCHARD, P.; MARX, J. C.; PYERITZ, R. E.; BRENNER, M. K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature medicine**, v. 5, n. 3, p. 309–313, 1999.

HUSSEIN, K. H.; PARK, K.-M.; KANG, K.-S.; WOO, H.-M. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 67, p. 766–778, 1 out. 2016.

JUNG, J. P.; BHUIYAN, D. B.; OGLE, B. M. Solid organ fabrication: Comparison of decellularization to 3D bioprinting. **Biomaterials Research**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 31 ago. 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. *Em: Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004a. p. 136–150.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004b. 92–124 p.

JUNQUEIRA, L. C.; MONTES, G. S. Biology of collagen-proteoglycan interaction. **Archivum histologicum Japonicum = Nihon soshikigaku kiroku**, v. 46, n. 5, p. 589–629, dez. 1983.

K M BULLARD, M J BANDA, J M ARBEIT, E BERGSLAND, D. M. Y. Human Acellular Dermal Matrix as a Novel Model of Malignant Epithelial Cell Invasion. **Invasion Metastasis.**, v. 17, n. 1, p. 42–52, 1997.

KABIRIAN, F.; MOZAFARI, M. **Decellularized ECM-derived bioinks: Prospects for the future** *Methods Academic Press Inc.*, 15 jan. 2020.

KAKABADZE, A.; KAKABADZE, Z. Prospect of Using Decellularized Human Placenta and Cow Placentome for Creation of New Organs: Targeting the Liver (Part I: Anatomic Study). **Transplantation Proceedings**, v. 47, n. 4, p. 1222–1227, maio 2015.

KAKABADZE, A.; KARALASHVILI, L.; MAKASHVILI, M.; ABIATARI, I.; KAKABADZE, Z. Anatomical Justification for the Use of Human Placenta as a Host for in Vivo Cell and Tissue Transplantation. **ASIAN JOURNAL OF PHARMACY, NURSING AND MEDICAL SCIENCES**, v. 2, n. 1, 2014.

KARCZEWSKI, M.; MALKIEWICZ, T. Scaffolds from Surgically Removed Kidneys as a Potential Source of Organ Transplantation. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–8, 10 fev. 2015.

KEANE, T. J.; SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods**, v. 84, p. 25–34, ago. 2015.

KHAN, A. A.; VISHWAKARMA, S. K.; BARDIA, A.; VENKATESHWARULU, J. Repopulation of decellularized whole organ scaffold using stem cells: an emerging technology for the development of neo-organ. **Journal of Artificial Organs**, v. 17, n. 4, p. 291–300, 17 dez. 2014.

KIM, Y. S.; MAJID, M.; MELCHIORRI, A. J.; MIKOS, A. G. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 4, n. 1, p. 83–95, jan. 2019.

KISIEL, A. H.; MCDUFFEE, L. A.; MASAOU, E.; BAILEY, T. R.; ESPARZA GONZALEZ, B. P.; NINO-FONG, R. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 8, p. 1305–1317, ago. 2012.

KNESER, U.; SCHAEFER, D. J.; POLYKANDRIOTIS, E.; HORCH, R. E. **Tissue engineering of bone: The reconstructive surgeon's point of view** *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2006.

KNIGHT, M. N.; HANKENSON, K. D. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 6, p. 306, jul. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24181877/>. Acesso em: 30 mar. 2023.

KOBOLAK, J.; DINNYES, A.; MEMIC, A.; KHADEMHOSEINI, A.; MOBASHERI, A. **Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche** *Methods* Academic Press Inc., 15 abr. 2016.

KUMAR, N.; GANGWAR, A. K.; SHARMA, A. K.; NEGI, M.; SHRIVASTAVA, S.; MATHEW, D. D.; REMYA, V.; SONAL; MAITI, S. K.; DEVI, K. S.; KUMAR, V.; RAMTEKE, P. W.; KAARTHICK, D. T.; KURADE, N. P. Extraction techniques for the decellularization of rat dermal constructs. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 27, n. 3, p. 102–107, 2013.

LANDIS, W. J. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. **Bone**, v. 16, n. 5, p. 533–544, 1995.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5110, p. 920–6, 14 maio 1993.

LE BLANC, K.; GÖTHERSTRÖM, C.; RINGDÉN, O.; HASSAN, M.; MCMAHON, R.; HORWITZ, E.; ANNEREN, G.; AXELSSON, O.; NUNN, J.; EWALD, U.; NORDÉN-

LINDEBERG, S.; JANSSON, M.; DALTON, A.; ÅSTRÖM, E.; WESTGREN, M. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. **Transplantation**, v. 79, n. 11, p. 1607–1614, 15 jun. 2005.

LEE, D. J.; DIACHINA, S.; LEE, Y. T.; ZHAO, L.; ZOU, R.; TANG, N.; HAN, H.; CHEN, X.; KO, C. C. Decellularized bone matrix grafts for calvaria regeneration. **Journal of Tissue Engineering**, v. 7, 13 fev. 2016.

LEONEL, L. C. P. C. **Produção e caracterização de biomateriais acelulares bioativos obtidos a partir da decelularização de placentas**. 2016. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2016.

LEONEL, L. C. P. C.; MIRANDA, C. M. F. C.; COELHO, T. M.; FERREIRA, G. A. S.; CAÃADA, R. R.; MIGLINO, M. A.; LOBO, S. E. Decellularization of placentas: establishing a protocol. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 51, n. 1, p. e6382, 17 nov. 2017.

LIANG, H.; LI, X.; SHIMER, A. L.; BALIAN, G.; SHEN, F. H. A novel strategy of spine defect repair with a degradable bioactive scaffold preloaded with adipose-derived stromal cells. **The spine journal : official journal of the North American Spine Society**, v. 14, n. 3, p. 445–454, 1 mar. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24360747/>>. Acesso em: 30 mar. 2023.

LIPAROTI, S.; SPERANZA, V.; MARRA, F. Alginate hydrogel: The influence of the hardening on the rheological behaviour. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 116, p. 104341–104341, 19 jan. 2021. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/33486329>>. Acesso em: 26 mar. 2023.

LIU, C.; PEI, M.; LI, Q.; ZHANG, Y. Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration. **Frontiers of medicine**, v. 16, n. 1, p. 56, 1 fev. 2022. Disponível em: <[pmc/articles/PMC8976706/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3976706/)>. Acesso em: 27 mar. 2023.

LOPES, D.; MARTINS-CRUZ, C.; OLIVEIRA, M. B.; MANO, J. F. **Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies** *Biomaterials* Elsevier Ltd, 1 dez. 2018.

LUMPKINS, S. B.; PIERRE, N.; MCFETRIDGE, P. S. A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 4, p. 808–816, jul. 2008.

MANSOUR, A.; MEZOUR, M. A.; BADRAN, Z.; TAMIMI, F. Extracellular Matrices for Bone Regeneration: A Literature Review. **Tissue engineering. Part A**, v. 23, n. 23–24, p. 1436–1451, 2017.

MATHIASSEN, A. B.; JORGENSEN, E.; QAYYUM, A. A.; HAACK-SORENSEN, M.; EKBLOND, A.; KASTRUP, J. Rationale and design of the first randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intramyocardial injection of autologous bone-marrow

derived Mesenchymal Stromal Cells in chronic ischemic Heart Failure (MSC-HF Trial). **American heart journal**, v. 164, n. 3, p. 285–291, set. 2012.

MATIAS, G. de S. S.; RIGOGGIO, N. N.; CARREIRA, A. C. O.; ROMAGNOLLI, P.; BARRETO, R. da S. N.; MESS, A. M.; MIGLINO, M. A.; FRATINI, P. Optimization of Canine Placenta Decellularization: An Alternative Source of Biological Scaffolds for Regenerative Medicine. **Cells Tissues Organs**, v. 205, n. 4, p. 217–225, 2018.

MATSUSHIMA, R.; NAM, K.; SHIMATSU, Y.; KIMURA, T.; FUJISATO, T.; KISHIDA, A. Decellularized dermis–polymer complex provides a platform for soft-to-hard tissue interfaces. **Materials Science and Engineering: C**, v. 35, p. 354–362, 1 fev. 2014.

MELEK, L. N. Tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction. **Tanta Dental Journal**, v. 12, n. 3, p. 211–223, 1 set. 2015. . Acesso em: 30 mar. 2023.

MENDONÇA, M. V. P.; LAROCCA, T. F.; SOUZA, B. S. D. F.; VILLARREAL, C. F.; SILVA, L. F. M.; MATOS, A. C.; NOVAES, M. A.; BAHIA, C. M. P.; MARTINEZ, A. C. D. O. M.; KANETO, C. M.; FURTADO, S. B. C.; SAMPAIO, G. P.; SOARES, M. B. P.; DOS SANTOS, R. R. Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury. **Stem cell research & therapy**, v. 5, n. 6, 2014.

MERMET, I.; POTTIER, N.; SAINTHILLIER, J. M.; MALUGANI, C.; CAIREY-REMONNAY, S.; MADDENS, S.; RIETHMULLER, D.; TIBERGHIE, P.; HUMBERT, P.; AUBIN, F. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, n. 4, p. 459–464, jul. 2007.

MEYER, S. R.; CHIU, B.; CHURCHILL, T. A.; ZHU, L.; LAKEY, J. R. T.; ROSS, D. B. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 79, n. 2, p. 254–262, nov. 2006.

MIYAZAKI, K.; MARUYAMA, T. Partial regeneration and reconstruction of the rat uterus through recellularization of a decellularized uterine matrix. **Biomaterials**, v. 35, n. 31, p. 8791–8800, 2014.

MORRIS, A. H.; CHANG, J.; KYRIAKIDES, T. R. Inadequate Processing of Decellularized Dermal Matrix Reduces Cell Viability *In Vitro* and Increases Apoptosis and Acute Inflammation *In Vivo*. **BioResearch Open Access**, v. 5, n. 1, p. 177–187, jul. 2016.

MOSER, P. T.; OTT, H. C. Recellularization of organs. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 19, n. 6, p. 603–609, dez. 2014.

NAGATA, S.; HANAYAMA, R.; KAWANE, K. Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. **Cell**, v. 140, n. 5, p. 619–630, 5 mar. 2010.

NAHIAN, A.; DAVIS, D. D. Histology, Osteoprogenitor Cells. **StatPearls**, 29 dez. 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559160/>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

- NAKAYAMA, K. H.; BATCHELDER, C. A.; LEE, C. I.; TARANTAL, A. F. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. **Tissue Engineering - Part A**, v. 16, n. 7, p. 2207–2216, 1 jul. 2010.
- NAKAYAMA, K. H.; BATCHELDER, C. A.; LEE, C. I.; TARANTAL, A. F. Renal tissue engineering with decellularized rhesus monkey kidneys: age-related differences. **Tissue engineering. Part A**, v. 17, n. 23–24, p. 2891–901, dez. 2011.
- NING, L. J.; ZHANG, Y.; CHEN, X. H.; LUO, J. C.; LI, X. Q.; YANG, Z. M.; QIN, T. W. Preparation and characterization of decellularized tendon slices for tendon tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 100 A, n. 6, p. 1448–1456, jun. 2012a.
- NING, L. J.; ZHANG, Y.; CHEN, X. H.; LUO, J. C.; LI, X. Q.; YANG, Z. M.; QIN, T. W. Preparation and characterization of decellularized tendon slices for tendon tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 100 A, n. 6, p. 1448–1456, jun. 2012b.
- ONISHI, T.; SHIMIZU, T.; AKAHANE, M.; OMOKAWA, S.; OKUDA, A.; KIRA, T.; INAGAKI, Y.; TANAKA, Y. Osteogenic extracellular matrix sheet for bone tissue regeneration. **European Cells and Materials**, v. 36, p. 69–80, 1 jul. 2018.
- OROZCO, L.; MUNAR, A.; SOLER, R.; ALBERCA, M.; SOLER, F.; HUGUET, M.; SENTÍS, J.; SÁNCHEZ, A.; GARCÍA-SANCHO, J. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. **Transplantation**, v. 95, n. 12, p. 1535–1541, 27 jun. 2013.
- ORYAN, A.; KAMALI, A.; MOSHIRIB, A.; ESLAMINEJAD, M. B. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? **Cells, tissues, organs**, v. 204, n. 2, p. 59–83, 1 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28647733/>>. Acesso em: 30 mar. 2023.
- ÖZBEK, S.; BALASUBRAMANIAN, P. G.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; TUCKER, R. P.; ADAMS, J. C. The Evolution of Extracellular Matrix. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n. 24, p. 4300, 12 dez. 2010. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3002383/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2002383/)>. Acesso em: 30 mar. 2023.
- PALONE, M. R. T.; SILVA, T. R. da; DALBEN, G. D. S. A Bioengenharia Tecidual em favor da Reabilitação de Indivíduos com Fissura Labiopalatina. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 48, n. 2, p. 113, 26 abr. 2015.
- PAPADIMITROPOULOS, A.; SCOTTI, C.; BOURGINE, P.; SCHERBERICH, A.; MARTIN, I. **Engineered decellularized matrices to instruct bone regeneration processes** BoneElsevier Inc., 1 jan. 2015.
- PARMAKSIZ, M.; ELÇIN, A. E.; ELÇIN, Y. M. Decellularized bovine small intestinal submucosa-PCL/hydroxyapatite-based multilayer composite scaffold for hard tissue repair. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 94, p. 788–797, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30423765/>>. Acesso em: 8 jan. 2023.

- PATEL, N.; SOLANKI, E.; PICCIANI, R.; CAVETT, V.; CALDWELL-BUSBY, J. A.; BHATTACHARYA, S. K. Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics. **Proteomics**, v. 8, n. 5, p. 1055–1070, mar. 2008.
- PATRICIO, L. F. L.; REBELATTO, C. L. K.; BROFMAN, B. R. S.; MACIEL, B. B.; BELTRAME, O. C.; BRITO, H. F. V.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Isolamento e caracterização de células mesenquimais do tecido adiposo de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 946–954, ago. 2013.
- PEREIRA-JUNIOR, O. C. M.; RAHAL, S. C.; LIMA-NETO, J. F.; LANDIM-ALVARENGA, F. da C.; MONTEIRO, F. O. Barros. In vitro evaluation of three different biomaterials as scaffolds for canine mesenchymal stem cells. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 353–360, 2013.
- PETERSEN, T. H.; CALLE, E. A.; ZHAO, L.; LEE, E. J.; GUI, L.; RAREDON, M. S. B.; GAVRILOV, K.; YI, T.; ZHUANG, Z. W.; BREUER, C.; HERZOG, E.; NIKLASON, L. E. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 538–541, 30 jul. 2010.
- PHAM, Q. P.; KURTIS KASPER, F.; SCOTT BAGGETT, L.; RAPHAEL, R. M.; JANSEN, J. A.; MIKOS, A. G. The influence of an in vitro generated bone-like extracellular matrix on osteoblastic gene expression of marrow stromal cells. **Biomaterials**, v. 29, n. 18, p. 2729–2739, jun. 2008.
- PINA, S.; RIBEIRO, V. P.; MARQUES, C. F.; MAIA, F. R.; SILVA, T. H.; REIS, R. L.; OLIVEIRA, J. M. Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 11, 1 jun. 2019.
- PITERINA, A. V.; CLOONAN, A. J.; MEANEY, C. L.; DAVIS, L. M.; CALLANAN, A.; WALSH, M. T.; MCGLOUGHLIN, T. M. **ECM-based materials in cardiovascular applications: Inherent healing potential and augmentation of native regenerative processes** *International Journal of Molecular Sciences* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), out. 2009.
- PONCE MÁRQUEZ, S.; MARTÍNEZ, V. S.; MCINTOSH AMBROSE, W.; WANG, J.; GANTXEGUI, N. G.; SCHEIN, O.; ELISSEEFF, J. Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 6, p. 1839–1847, jul. 2009.
- POORNEJAD, N.; SCHAUMANN, L. B.; BUCKMILLER, E. M.; MOMTAHAN, N.; GASSMAN, J. R.; MA, H. H.; ROEDER, B. L.; REYNOLDS, P. R.; COOK, A. D. The impact of decellularization agents on renal tissue extracellular matrix. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 31, n. 4, p. 521–533, 9 out. 2016.
- PRASERTSUNG, I.; KANOKPANONT, S.; BUNAPRASERT, T.; THANAKIT, V.; DAMRONGSAKKUL, S. Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 85, n. 1, p. 210–219, abr. 2008.
- RANA, D.; ZREIQAT, H.; BENKIRANE-JESSEL, N.; RAMAKRISHNA, S.; RAMALINGAM, M. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven

tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 11, n. 4, p. 942–965, abr. 2017.

RASTOGI, P.; KANDASUBRAMANIAN, B. Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. **Biofabrication**, v. 11, n. 4, 10 set. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31315105/>>. Acesso em: 26 mar. 2023.

ROEHSIG, C.; ROCHA, L. B.; BARAUNA, D.; CHIORATTO, R.; DE MELO E SILVA, S. R. A.; KEMPER, B.; DE ARAÚJO, F. P.; DE ALMEIDA, A. C. M.; TUDURI, E. A. Canine iliac fracture fixation with screws, orthopedic wire and polymethylmethacrylate bone cement. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 6, p. 1675–1681, 2008.

ROSARIO, D. J.; REILLY, G. C.; SALAH, E. A.; GLOVER, M.; BULLOCK, A. J.; MACNEIL, S. Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. **Regenerative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 145–156, mar. 2008.

ROSS, E. A.; WILLIAMS, M. J.; HAMAZAKI, T.; TERADA, N.; CLAPP, W. L.; ADIN, C.; ELLISON, G. W.; JORGENSEN, M.; BATICH, C. D. Embryonic Stem Cells Proliferate and Differentiate when Seeded into Kidney Scaffolds. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 11, p. 2338–2347, 1 nov. 2009.

RUSSELL, J. L.; BLOCK, J. E. **Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis, and reconstruction: Impact of processing techniques and study methodology** *Orthopedics* 1999.

SALDIN, L. T.; CRAMER, M. C.; VELANKAR, S. S.; WHITE, L. J.; BADYLAK, S. F. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. **Acta biomaterialia**, v. 49, p. 1–15, 1 fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27915024/>>. Acesso em: 7 jan. 2023.

SARKER, B.; LI, W.; ZHENG, K.; DETSCH, R.; BOCCACCINI, A. R. Designing Porous Bone Tissue Engineering Scaffolds with Enhanced Mechanical Properties from Composite Hydrogels Composed of Modified Alginate, Gelatin, and Bioactive Glass. **ACS biomaterials science & engineering**, v. 2, n. 12, p. 2240–2254, 12 dez. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33465897/>>. Acesso em: 26 mar. 2023.

SCARRITT, M. E.; PASHOS, N. C.; BUNNELL, B. A. **A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* Frontiers Media S.A., 2015.

SCHNEIDER, K. H.; AIGNER, P.; HOLNTHONER, W.; MONFORTE, X.; NÜRNBERGER, S.; RÜNZLER, D.; REDL, H.; TEUSCHL, A. H. Decellularized human placenta chorion matrix as a favorable source of small-diameter vascular grafts. **Acta Biomaterialia**, v. 29, p. 125–134, jan. 2016.

SCHNEIDER, K. H.; ENAYATI, M.; GRASL, C.; WALTER, I.; BUDINSKY, L.; ZEBIC, G.; KAUN, C.; WAGNER, A.; KRATOCHWILL, K.; REDL, H.; TEUSCHL, A. H.; PODESSER, B. K.; BERGMEISTER, H. Acellular vascular matrix grafts from human

placenta chorion: Impact of ECM preservation on graft characteristics, protein composition and in vivo performance. **Biomaterials**, v. 177, p. 14–26, set. 2018.

SPICER, C. D. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: The importance of polymer choice. **Polymer Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 184–219, 14 jan. 2020. . Acesso em: 7 jan. 2023.

STOLTZ, J.-F.; ZHANG, L.; YE, J. S.; DE ISLA, N. Organ reconstruction: Dream or reality for the future. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 28, n. s1, p. S121–S127, 30 mar. 2017.

TILGHMAN, R. W.; BLAIS, E. M.; COWAN, C. R.; SHERMAN, N. E.; GRIGERA, P. R.; JEFFERY, E. D.; FOX, J. W.; BLACKMAN, B. R.; TSCHUMPERLIN, D. J.; PAPIN, J. A.; PARSONS, J. T. Matrix Rigidity Regulates Cancer Cell Growth by Modulating Cellular Metabolism and Protein Synthesis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37231, 18 maio 2012.

TSIGKOU, O.; POMERANTSEVA, I.; SPENCER, J. A.; REDONDO, P. A.; HART, A. R.; O'DOHERTY, E.; LIN, Y.; FRIEDRICH, C. C.; DAHERON, L.; LIN, C. P.; SUNDBACK, C. A.; VACANTI, J. P.; NEVILLE, C. Engineered vascularized bone grafts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 8, p. 3311–3316, 23 fev. 2010.

UYGUN, B. E.; SOTO-GUTIERREZ, A.; YAGI, H.; IZAMIS, M.-L.; GUZZARDI, M. A.; SHULMAN, C.; MILWID, J.; KOBAYASHI, N.; TILLES, A.; BERTHIAUME, F.; HERTL, M.; NAHMIAS, Y.; YARMUSH, M. L.; UYGUN, K. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. **Nature Medicine**, v. 16, n. 7, p. 814–820, 13 jul. 2010.

VINATIER, C.; GUICHEUX, J. **Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments** *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* Elsevier Masson SAS, 1 jun. 2016.

WANG, F.; GUAN JIANJUN, J. **Cellular cardiomyoplasty and cardiac tissue engineering for myocardial therapy** *Advanced Drug Delivery Reviews* Adv Drug Deliv Rev, jun. 2010.

WANG, L.-R.; LIN, Y.-Q.; WANG, J.-T.; PAN, L.-L.; HUANG, K.-T.; WAN, L.; ZHU, G.-Q.; LIU, W.-Y.; BRADDOCK, M.; ZHENG, M.-H. Recent advances in re-engineered liver: de-cellularization and re-cellularization techniques. **Cytotherapy**, v. 17, n. 8, p. 1015–1024, ago. 2015.

WANG, Y.; NICOLAS, C. T.; CHEN, H. S.; ROSS, J. J.; DE LORENZO, S. B.; NYBERG, S. L. Recent Advances in Decellularization and Recellularization for Tissue-Engineered Liver Grafts. **Cells Tissues Organs**, v. 203, n. 4, p. 203–214, 2017.

WELMAN, T.; MICHEL, S.; SEGAREN, N.; SHANMUGARAJAH, K. Bioengineering for Organ Transplantation: Progress and Challenges. **Bioengineered**, v. 6, n. 5, p. 257–261, 3 set. 2015.

WONG, K. L.; LEE, K. B. L.; TAI, B. C.; LAW, P.; LEE, E. H.; HUI, J. H. P. Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: a prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up. **Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association**, v. 29, n. 12, p. 2020–2028, dez. 2013.

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.

XU, C. C.; CHAN, R. W.; TIRUNAGARI, N. A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 3, p. 551–566, mar. 2007.

YANG, B.; ZHANG, Y.; ZHOU, L.; SUN, Z.; ZHENG, J.; CHEN, Y.; DAI, Y. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 16, n. 5, p. 1201–1211, 1 out. 2010.

YANG, M.; CHEN, C. Z.; WANG, X. N.; ZHU, Y. Bin; GU, Y. J. Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 91, n. 1, p. 354–361, out. 2009.

YOU, F.; WU, X.; CHEN, X. 3D printing of porous alginate/gelatin hydrogel scaffolds and their mechanical property characterization. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 66, n. 6, p. 299–306, 13 abr. 2017.

Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/305485917_3D_Printing_of_Porous_Alginategelatin_Hydrogel_Scaffolds_and_Their_Mechanical_Property_Characterization>.

Acesso em: 26 mar. 2023.

YU, Z.; LILI, J.; TIEZHENG, Z.; LI, S.; JIANZHANG, W.; HAICHAO, D.; KEDONG, S.; TIANQING, L. Development of decellularized meniscus extracellular matrix and gelatin/chitosan scaffolds for meniscus tissue engineering. **Bio-medical materials and engineering**, v. 30, n. 2, p. 125–132, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30741661/>>. Acesso em: 8 jan. 2023.

ZHANG, M.; ZHAO, X. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. **International journal of biological macromolecules**, v. 162, p. 1414–1428, 1 nov. 2020. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32777428/>>. Acesso em: 26 mar. 2023.

ZHANG, Q.; RAOOF, M.; CHEN, Y.; SUMI, Y.; SURSAL, T.; JUNGER, W.; BROHI, K.; ITAGAKI, K.; HAUSER, C. J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 104–7, 4 mar. 2010.

ZOU, J.-L.; LIU, S.; SUN, J.-H.; YANG, W.-H.; XU, Y.-W.; RAO, Z.-L.; JIANG, B.; ZHU, Q.-T.; LIU, X.-L.; WU, J.-L.; CHANG, C.; MAO, H.-Q.; LING, E.-A.; QUAN, D.-P.; ZENG, Y.-S. Peripheral Nerve-Derived Matrix Hydrogel Promotes Remyelination and Inhibits Synapse Formation. **Advanced Functional Materials**, v. 28, n. 13, p. 1705739, mar. 2018.