



Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais



Carla Cristina Reis Braga

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE DESCELULARIZAÇÃO DE
PÂNCREAS SUÍNO PARA A PRODUÇÃO DE ARCABOUÇOS NATURAIS PARA
ENXERTOS DE BIOENGENHARIA**

Belo Horizonte

2019

Carla Cristina Reis Braga

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE DESCELULARIZAÇÃO DE
PÂNCREAS SUÍNO PARA A PRODUÇÃO DE ARCABOUÇOS NATURAIS PARA
ENXERTOS DE BIOENGENHARIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, linha de pesquisa de Biomateriais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Rudolf Huebner

Belo Horizonte

2019

B813d Braga, Carla Cristina Reis.
Desenvolvimento de protocolo de descellularização de pâncreas suíno para a produção de arcabouços naturais para enxertos de bioengenharia. - 2020.
107 f. : il., fotos, grafs., tabs.

Orientador: Sidney Nicodemos da Silva.

Coorientador: Rudolf Huebner.

Dissertação (mestrado) - Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2020.

Bibliografia.

1. Biomateriais. 2. Engenharia tecidual. 3. Diabetes Mellitus. 4. Pâncreas. I. Silva, Sidney Nicodemos da. II. Huebner, Rudolf. III. Título.

CDD: 610.28



CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
“DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE
DECELULARIZAÇÃO DE PÂNCREAS PARA A
PRODUÇÃO DE ARCABOUÇOS NATURAIS PARA
ENXERTOS DE BIOENGENHARIA”

Autora: Carla Cristina Reis Braga

Orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva (ORIENTADOR)
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof. Dr. Rudolf Huebner (COORIENTADOR)
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Prof.ª Dr.ª Ivete Peixoto Pinheiro Silva
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof.ª Dr.ª Rosana de Carvalho Cruz
Faculdade Arnaldo Janssen

Belo Horizonte, 29 de Agosto de 2019.

*À minha mãe Vilma e à minha irmã Luciana,
as únicas verdadeiras riquezas da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me guiar durante toda a trajetória do mestrado.

À minha mãe e irmã pelo apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva que expandiu os meus horizontes e orientou-me no desenvolvimento deste trabalho. Ao Prof. Dr. Rudolf Huebner pela atenção infinita, pela provisão do melhor laboratório do país e pela motivação diária quando tudo estava dando errado.

Ao Dr. Jonathas Haniel e ao Felipe Romano Lopes pela dedicação, resiliência e paciência. Sem a sua participação este projeto não teria se realizado.

Às Profs. Dr^a Betânia Maria Soares e Dr^a Rosana de Carvalho Cruz pelo carinho, ensinamentos e orientações.

Ao Sr. Márcio Aparecido Batista, proprietário da Distribuidora de Carnes Bom Boi Ltda. e ao Sr. William, em Pará de Minas, MG, pela extrema generosidade. Este estudo não teria sido possível sem a sua ajuda. Ao Sr. Roberto Barbosa pela atenção e extrema disposição e boa vontade em ajudar.

Ao Sr. Alessandro Ramos de Oliveira do FrigoRita S/A, Itaguara, MG. Muito obrigada pela sua extrema generosidade, sem o seu apoio este estudo não teria sido viável.

Ao CEFET-MG pela oportunidade e pela estrutura. Agradeço especialmente a todos os servidores e estagiários dos Laboratórios do Campus I pela ajuda que me prestaram durante esses dois anos.

À Caroline Fernandes da secretaria acadêmica do POSMAT pela paciência, atenção e apoio constantes.

À todos os pesquisadores do LabBio, UFMG. O seu carinho, apoio e momentos extremamente felizes vão me acompanhar para sempre.

Ao Prof. Dr. Dagoberto Brandão Santos e à Patrícia Mara Trigueiro de Azevedo do Laboratório de Microscopia Eletrônica DEMET, UFMG pelo carinho, atenção e pela realização dos ensaios de microscopia.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfica e ao Laboratório de Materiais DEMET, UFMG; ao Prof. Dr. Leandro Soares de Oliveira e ao Laboratório de Biocombustíveis DEMEC, UFMG; à Prof. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira e ao Laboratório de Biomateriais DEMET, UFMG pela atenção e pronta execução dos ensaios de caracterização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Remo Castro Russo e ao Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Departamento de Fisiologia e Biofísica, UFMG; Ao Prof. Dr. Daniel Antero de Almeida Galdino e ao Laboratório do Sistema Linfóide e da Regeneração Departamento de Morfologia, UFMG; À Daniela Diniz Viana de Brito e ao Laboratório

de Microbiologia Clínica e ao Sr. Jamil Silvano de Oliveira do Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG.

À Andreza Léia pela sua amizade e apoio incondicional nesse projeto.

À Luciana Ferreira dos Santos pela sua amizade e empenho na aquisição de recursos para o desenvolvimento desse projeto.

Ao Sr. Juarez Afonso Fernandes e ao Sr. Rafael Rodrigues Fonseca, funcionários do Departamento de Engenharia Mecânica, UFMG.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Código de Financiamento 001.

*“Uma mente que expande-se com uma nova experiência
nunca pode voltar às suas antigas dimensões.”*

Oliver Wendell Holmes, Jr.

RESUMO

A grande demanda por transplantes e enxertos de órgãos e tecidos tem impulsionado a evolução dos biomateriais naturais, em especial os *scaffolds*, para a aplicação na engenharia de tecidos. Uma das áreas do conhecimento responsável por este aprimoramento é a ciência dos biomateriais que busca promover o desenvolvimento de tecidos específicos por meio do cultivo tridimensional de células-tronco utilizando *scaffolds* sintéticos ou naturais. Entretanto, limitações como biocompatibilidade, biodegradabilidade, e principalmente a vascularização, por ser fator determinante do desenvolvimento tecidual, comprometem a eficiência das soluções oferecidas pelos biomateriais sintéticos. Com o foco voltado a essas limitações, este estudo buscou desenvolver um protocolo de descélularização de pâncreas suínos frescos por meio do emprego de Triton X-100, EDTA, hidróxido de amônio e técnicas de perfusão otimizadas. Em decorrência, produziu-se uma matriz integralmente descélularizada e fiel ao complexo tridimensional de alta conectividade presente no tecido original. Um *scaffold* naturalmente vascularizado e morfologicamente íntegro que apresentou todos os quesitos físicos e mecânicos necessários para seguir as próximas etapas da validação biológica, conforme o mensurado pelas diversas caracterizações realizadas: análises histológicas, microscopia eletrônica de varredura, DSC, ATR-FTIR, microtomografia e ensaios de tensão/deformação. Assim, o *scaffold* produzido apresenta um grande potencial como plataforma de sustentação para a formação de tecidos funcionais capazes de gerenciar o recrutamento de células tronco progenitoras e suprir todas as necessidades sistêmicas inerentes à proliferação e diferenciação celulares. Com o aprimoramento desse novo biomaterial será possível desenvolver novas abordagens voltadas aos esforços terapêuticos de regeneração das funções endócrinas do pâncreas, no combate ao diabetes.

PALAVRAS-CHAVE: *scaffolds*; biomateriais naturais; engenharia de tecidos; descélularização; diabetes; pâncreas.

ABSTRACT

The ever rising demand for organs and tissues transplants has driven the evolution of natural biomaterials, especially scaffolds, for application in tissue engineering. Biomaterials is among the areas of scientific knowledge seeking the development of organs and tissues through three-dimensional cultivation of stem cells on synthetic or natural scaffolds. However, limitations such as biocompatibility, biodegradability, and especially vascularization, a determining factor for tissue's development, compromise the efficiency of synthetic biomaterials. Thus, based on these limitations, this study obtained an efficient decellularization protocol for fresh porcine pancreas. By the means of Triton X-100, EDTA, ammonium hydroxide and optimized perfusion techniques, a fully decellularized three-dimensional complex was achieved. Naturally vascularized and morphologically faithful to the original organ, the scaffold produced filled all the physical and mechanical requirements necessary to move to the next stages of biological validation, as indicated by the several characterizations performed: histological analysis, scanning electron microscopy, DSC, ATR-FTIR, microtomography and tests of stress/strain. Thus, the scaffold has an unlimited potential as a supportive platform for generating functional tissues capable of managing the recruitment of progenitor stem cells and supplying all the systemic needs inherent in cell proliferation and differentiation. For diabetic therapeutics, investing in this new type of biomaterial means widening the range of possibilities for the development of solutions towards regenerating the endocrine functions of the pancreas in the fight against diabetes.

KEY WORDS: scaffolds; natural biomaterials; tissue engineering; decellularization; diabetes; pancreas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Posicionamento do pâncreas no tronco abdominal. A seta indica uma ampliação do pâncreas humano	24
Figura 2 - Ilhotas de Langerhans em meio aos ácinos pancreáticos	25
Figura 3 - A: Cortes histológicos de fibras de colágeno e elásticas; feixes de fibras de colágeno em microscópio de polarização	33
Figura 4 - Estrutura molecular de colágenos fibrilar com os vários subdomínios, bem como os locais de clivagem para as procolagenases	37
Figura 5 - A perna etíope	39
Figura 6 - (a) Diagrama anatômico vascular regular de um pâncreas suíno. (b) Representação esquemática básica de um pâncreas humano	43
Figura 7 - Variações anatômicas dos dutos pancreáticos mostrada pela perfusão de corante	44
Figura 8 - Ponto triplo	52
Figura 9 - Sequência da descélularização de pâncreas suíno por perfusão retrógrada produzida por Katsuki <i>et al.</i> (2016)	58
Figura 10 - Esquema ilustrando o sistema de perfusão composto por uma bomba peristáltica e banho termostático utilizado para descélularização de pâncreas suínos	60
Figura 11 - Vista geral do sistema de perfusão por bomba peristáltica utilizado para descélularização de pâncreas suínos	61
Figura 12 - Liofilizador de piso modelo Liotop K105	63
Figura 13 - MEV: amostras de tecido nativo e <i>scaffold</i> , CEFET-MG	64
Figura 14 - MEV: amostras de tecido nativo e <i>scaffold</i> , UFMG	65
Figura 15 - DSC 60, Laboratório de Caracterização e Microscopia CEFET-MG	66
Figura 16 - Ensaio de tração Instron/EMIC-DL3000 no Laboratório de Materiais DEMET UFMG	68
Figura 17 - O ciclo de descélularização	72
Figura 18 - A descélularização via ducto pancreático apresentou alguns pontos translúcidos mas não produziu resultados satisfatórios	73
Figura 19 - Análise histológica. (a) HE de tecido nativo. (b) HE de tecido descélularizado. (c) TM do tecido nativo. (d) TM do tecido descélularizado	74

Figura 20 - O aumento da pressão de perfusão levou à menor eficiência na remoção dos detritos celulares (D)	75
Figura 21 - Microscópio de varredura mostrando as mesmas fibras de colágeno em formas distintas: (a) Forma hidratada; (b) Forma liofilizada	76
Figura 22 - MEV da matriz extracelular: (a) A superfície do tecido nativo mostra-se lisa e cheia de células. (b) A superfície do <i>scaffold</i> aparece fibrosa e porosa (c - e) Os aumentos progressivos revelam fibras colágenas de diversos calibres e configurações. (f) Vaso, ou ducto pancreático, aparece desnudo de sua camada endothelial	78
Figura 23 - MEV revela a morfologia das fibras de uma sessão do lobo duodenal do <i>scaffold</i> . As imagens mostram que as aberturas de ductos ou vasos presentes na superfície fibrosa do <i>scaffold</i> retiveram sua integridade estrutural	79
Figura 24 - MEV de uma sessão do lobo esplênico do <i>scaffold</i> revela microambientes acelulares e o início da formação das fibras colágenas a partir dos fibroblastos	80
Figura 25 - MEV de uma sessão do lobo conectivo do <i>scaffold</i> revela uma gama de configurações fibrilares íntegras. Nanofibrilas, assim como os microambientes matriciais, aparecem conservados	81
Figura 26 - Comparando as análises MEV EDS de sessões dos lobos duodenais do tecido nativo e do <i>scaffold</i> , verificou-se uma baixa variação em suas composições químicas. Gráfico 1 – Quantificação da composição química de uma sessão de lobo duodenal do tecido nativo. (a) MEV da sessão de tecido nativo utilizada no EDS. Gráfico 2 – Quantificação da composição química de uma sessão do lobo duodenal do <i>scaffold</i> . (b) MEV da sessão de tecido utilizada no EDS	82
Figura 27 - A análise de MEV EDS de uma sessão do lobos esplênico, de ambos o tecido nativo e <i>scaffold</i> , detectou uma baixa variação no conteúdo químico da ECM. Gráfico 3 – Quantificação da composição química de uma sessão de lobo esplênico do tecido nativo. (a) MEV da sessão de tecido nativo utilizada no EDS. Gráfico 4 – Quantificação da composição química de uma sessão de lobo esplênico do <i>scaffold</i> . (a) MEV da sessão de <i>scaffold</i> utilizada no EDS	83

Figura 28 - Gráficos 5, 6 e 7 – A estabilidade da estrutura secundária das fibras de colágeno foi analisada por ATR-FTIR	86
Figura 29 - Curva de DSC para as amostras de lobo duodenal de tecido nativo e de <i>scaffold</i>	88
Figura 30 - Curva de DSC para as amostras de lobo esplênico de tecido nativo e de <i>scaffold</i>	88
Figura 31 - Curva de DSC para as amostras de lobo conectivo de tecido nativo e de <i>scaffold</i>	89
Figura 32 - Microtomografia por Raios X do <i>scaffold</i> . Amostra de uma sessão do lobo duodenal	90
Figura 33 - Teste de tração do <i>scaffold</i>	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nova classificação dos tipos de diabetes	29
Tabela 2 - Comparativo entre os protocolos de descclularização de pâncreas suínos e camundongos	49
Tabela 3 - Comparativo de Caracterizações para Descclularização	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscópio de Força Atômica
ATP	Adenosina Trifosfato
b-FGF	Fibroblástico básico
CAT	Tomografia computadorizada
Cu	Cobre
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
d.C.	Depois de Cristo
dsDNA	DNA de fita dupla
ΔG	Varição da Energia Livre de Gibbs
ΔH_{cal}	Entalpia calorimétrica
Δl	Deformação
Δs	Varição de Entropia
DEMEC	Departamento de Engenharia Mecânica – UFMG
DEMET	Departamento de Engenharia Metalúrgica – UFMG
ssDNA	DNA de fita simples
DRX	Difração de Raios-X
DTG	Análise Termogravimétrica
EDTA	Etileno-Diamina-Tetraacético
EDX	Espectroscopia de fluorescência de raios-X
EVG	Corante Elastina van Gieson
EUA	Estados Unidos da América
DBD	Doadores após morte cerebral
f	Frequência
F_{el}	Força Elástica
FACIT	Colágenos associados à fibrila
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FN	Fibronectina
g/l	Gramas/Litro
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina e Eosina
HRSA	Health Resources and Services Administration
Hz	Hertz
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Km	Constante de mola para deflexão normal de cantilever
kPa	Kilo Pascal
kV	Kilo Volts
L	Comprimento
LabBio	Laboratório de Bioengenharia da UFMG
l/h	Litro/hora
m	Metro
(m/m)	Massa/Massa (%)
MEC	Matriz Extracelular
MECD	Matriz Extracelular Descelularizada
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MPa	Mega Pascal
MODY	Diabetes de Início da Maturidade em Jovens

μM	Micrometros
μA	Microampère
mA	Miliampère
Mg	Miligramas
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
MEC	Matriz Extracelular
MECD	Matriz Extracelular Descelularizada
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
(m/v)	Massa/Volume (%)
Ng	Nanograma
NK	Células do sistema imune " <i>Natural Killers</i> "
Nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Pressão
Pb	Pares de bases (DNA)
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial de hidrogênio
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
r	Raio
r _o	Raio com pressão zero
r _{Externo}	Raio externo
r _{Interno}	Raio interno
s	Segundo
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
ssDNA	DNA de fita simples
T	Temperatura
t	Tempo
TE Buffer	Tris-HCl, EDTA
TM	Tricômio de Masson
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI/ml	Unidades Internacionais/mililitro
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
V/V	Volume/Volume (%)

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Ângulo
α	Alfa
Å	Angstrom
β	Beta
E	Módulo de elasticidade
E	Tensão
Σ	Deformação
π	3,1415926535
ρ	Massa específica
Δ	Variação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivos Gerais	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	Gerenciando a glicose	22
3.2	O pancreas	23
3.3	O diabetes	25
3.4	Diabetes mellitus	25
3.5	Tipos de diabetes	27
3.5.1	Diabetes mellitus insulino-dependente tipo I	27
3.5.2	Diabetes mellitus não-insulino-dependente tipo II	28
3.6	O transplante como fator da melhoria da qualidade de vida	29
3.7	Alternativas convencionais ao transplante de pancreas	30
3.8	Soluções da Engenharia de Tecidos	31
3.9	A matriz extracelular, MEC	31
3.10	O colágeno	35
3.11	Os primórdios dos transplantes xenogênicos	38
3.12	A imunogenicidade dos transplantes xenogênicos	41
3.13	Anatomia suína	42
3.14	Agentes e técnicas de descelularização	45
3.14.1	Métodos físicos de descelularização	45
3.14.2	Métodos biológicos e químicos	47
3.14.3	Quantificação de material genético remanescente no <i>scaffold</i> após descelularização Análise histológica	51
3.14.4	Caracterizações físico-químicas e mecânicas para análise de integridade estrutural do <i>scaffold</i> Liofilização	51
3.14.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	53
3.14.4.2	Calorimetria de Varredura Diferencial	53

3.14.4.3	Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infra-Vermelho com Transformada de Fourier ATR-FTIR	55
3.14.4.4	Microtomografia de Raios-X – MicroCT	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1	Materiais e equipamentos utilizados na etapa inicial do protocolo de KATSUKI <i>et al.</i> (2016)	58
4.2	Seleção e preparação de tecidos	59
4.3	Sistema de perfusão por bomba peristáltica	60
4.4	Aprimoramento da tecnologia de descelularização	61
4.5	Análise histológica	62
4.6	Preparação das amostras - Liofilização	63
4.7	Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV, com Espectroscopia de Energia Dispersiva – EDS	64
4.8	Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infra-Vermelho com Transformada de Fourier – ATR-FTIR	66
4.9	Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC	66
4.10	Microtomografia de Raios-X – MicroCT	67
4.11	Testes Mecânicos de Tensão/Deformação	67
4.12	Estatísticas	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÕES	94
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	96
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1. INTRODUÇÃO

Uma das estratégias da medicina regenerativa para produzir órgãos e tecidos *in vitro* segue a tecnologia da descellularização e recellularização. Partindo de um órgão nativo, a descellularização é capaz de produzir *scaffolds* biológicos, ou naturais, removendo os componentes celulares da matriz extracelular (MEC) e os apresentadores de antígenos e obtendo-se, com alta fidelidade estrutural, uma biomatriz tridimensional e complexa coerente com a estrutura nativa e capaz e interagir com os processos de proliferação e diferenciação celular (STRUECKER *et al.*, 2014).

Esses *scaffolds* descellularizados são arcabouços formados por microestruturas e microambientes delineados por fibras colágenas, de fibronectina e uma variedade de fatores de crescimento e peptídeos bioativos que determinam o nicho responsável pela homeostase, pelas respostas imunológicas, quimiotáticas, de angiogênese ou anti-angiogênese, e, inclusive, pelo desenvolvimento e diferenciação de células-tronco progenitoras resultando, conseqüentemente, em biointegração (BROWN; BADYLAK, 2014).

Embora *scaffolds* sintéticos sejam duráveis e mecanicamente relevantes, sua incapacidade de mimetizar a complexidade intrínseca dos ambientes biológicos determina a sua falha no aspecto biointegração. Nas últimas décadas, muitos dispositivos empregados na clínica médica são produzidos com MEC alogênica (composição genética semelhante) e xenogênica (composição genética de espécie não humana) – tais como derme humana para prolapso de órgão pélvico humano, e pericárdio equino para reparação de dura-máter humana após craniotomia. Os níveis de performance desses materiais variam de acordo com a procedência, métodos de preparação e aplicação clínica. Porém, independentemente da aplicação, para que esses materiais possam se tornar soluções ideais é necessário a total compreensão de suas potencialidades (BROWN; BADYLAK, 2014).

Nos últimos 20 anos, mais de 250.000 pessoas foram tratadas com implantes de tecidos xenogênicos descellularizados em reconstruções do trato gastrointestinal e do sistema nervoso central, em estruturas vasculares e em tecidos musculoesqueléticos. Dentre a diversidade desses produtos disponíveis comercialmente encontram-se Oasis® (submucosa suína, Cook Biotech, Inc., Indiana, EUA), Strattice™ (derme suína, Allergan plc, Dublin, Irlanda), Restore™ (intestino

delgado suíno, DePuy Orthopedics Inc., Indiana, EUA) utilizados no tratamento de cicatrização de feridas; Prima™ Plus (válvula cardíaca suína, Edwards Life Sciences LLC, California, EUA); Miromesh™ e Miroderm™ derivados de órgãos suínos (Miromatrix Medical Inc., Minneapolis, EUA) – a empresa também produz fígado e rins humanos totalmente funcionais; AxoGuard® (AxoGen Inc., Flórida, EUA) é um conector de nervo que utiliza uma tecnologia para regenerar lesões de nervos periféricos a partir de tecidos suínos (DAMODARAN; VERMETTE, 2018).

Embora ainda não seja possível determinar todos os componentes adversos à biointegração, um elemento categórico é a remoção ineficiente dos debris celulares remanescentes da descelularização. A descelularização inócua pode determinar a sinalização dos indicadores de Padrões Moleculares Associados a Danos, DAMPs (do inglês *Damage-Associated Molecular Patterns*). Esses padrões desencadeiam respostas inflamatórias intensas que podem, além de inibir a remodelagem construtiva, levar à formação de cicatrizes, que inutilizarão o tecido enxertado, e à completa rejeição do *scaffold* após a implantação *in vivo* (KEANE *et al.*, 2012).

Apesar dessa remoção completa ser praticamente impossível, CRAPO *et al.* (2011) sugerem critérios para a definição de um grau de descelularização aceitável. Tais critérios baseiam-se na inexistência de material nuclear visível em análise histológica com hematoxilina e eosina e 4'-6-diamidino-2-fenilindole, DAPI; na quantidade máxima de DNA fita dupla - dsDNA (do inglês *double stranded DNA*), por mg de peso seco da MEC, ser inferior a 50 ng; e no tamanho desses fragmentos genéticos remanescentes, os quais não podem ultrapassar 200 pares de bases (pb).

A possibilidade de substituição de órgãos e tecidos em falha de estágios finais por análogos que expressem células progenitoras do próprio paciente, expande as possibilidades de aplicações clínicas para transplantes essencialmente autólogos (ROUCHI; MAHDAVI-MAZDEH, 2015). Ainda que a indisponibilidade de órgãos fosse desconsiderada, os transplantes convencionais encontram-se vinculados ao risco de rejeição imune crônica e à utilização de imunossupressores para o resto da vida.

Tecnologias alternativas, como a produção de matrizes descelularizadas a partir de pâncreas suínos, buscam superar as limitações de terapias convencionais para o tratamento da diabetes, explorando a obtenção de tecidos que recriem condições nativas ao desenvolvimento e proliferação celular. Essas matrizes, ou *scaffolds* naturais possibilitam a cultura tridimensional de células-tronco autóloga (células de um indivíduo para o uso nesse mesmo indivíduo), singênica (células de

gêmeos univitelinos), alogênica (células dentro de uma mesma espécie) e xenogênica (células de espécies diferentes), para a produção endógena de insulina, consequentemente restaurando a função endócrina do órgão.

Embora a engenharia de tecidos baseie-se na descelularização de MEC de tecidos análogos, a funcionalidade de uma matriz não está atrelada à uma mesma região atômica, conforme foi demonstrado por Kang *et al.* (2017) na utilização de flocos de cartilagem nasal descelularizados para o aumento de pregas vocais.

Posto que essas tecnologias dependam de uma compreensão estrutural robusta da MEC, a multifuncionalidade alcançada com a introdução de uma matriz tridimensional e dinâmica é demasiada. Capaz de autopromover a mobilização de proteínas e/ou nutrientes necessários para a fixação, proliferação e diferenciação celular, torna-se possível reconstituir a função anatomofisiológica do pâncreas por meio da recelularização das células pancreáticas em um *scaffold* de pâncreas nativo (KATSUKI *et al.*, 2016).

Apesar de grande parte de trabalhos científicos assentir pela restauração parcial de funções biológicas por meio da utilização de *scaffolds* à base de biomateriais, recentemente uma nova rota com protocolos de descelularização de tecidos animais vem permitindo aos pesquisadores descobrir vantagens proporcionadas pela MEC pancreática nativa. Essa MEC natural de suínos poderia prover uma plataforma ideal para recelularização, permitindo o desenvolvimento das práticas da bioengenharia para o aprimoramento parcial ou até mesmo do pâncreas inteiro. No entanto, para que o processo de recelularização dessas matrizes naturais obtenha êxito é de suma importância controlar os parâmetros do processo de perfusão e da escolha adequada dos materiais utilizados (KATSUKI *et al.*, 2016).

A meta desse trabalho é o desenvolvimento de uma estrutura tridimensional pré-vascularizada, a partir de tecido animal, capaz de abrigar e sustentar células para posterior cultura de células β de pâncreas humano. Serão aqui abordados por meio de revisão bibliográfica, as características mais importantes da matriz extracelular, os processos de descelularização conhecidos e as diversas técnicas, reagentes e mecanismos empregados no processo, buscando explorar as possibilidades e viabilidades do material final obtido no âmbito dos *scaffolds* naturais (a base de colágenos) produzidos para emprego na engenharia de tecidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Aprimorar um processo de descelularização para a produção de arcabouços (*scaffolds*) naturais a partir de pâncreas suíno, de forma a produzir um substrato tridimensional pré-vascularizado para cultura de células, buscando futuramente sua aplicação no meio fisiológico como terapêutica da diabetes.

2.2. Objetivos específicos

- Levantar protocolos de coleta, transporte e processamento de pâncreas suínos frescos para conexão ao sistema de perfusão.
- Aprimorar protocolos de descelularização de pâncreas suíno para o desenvolvimento de biomateriais com vistas à sua utilização como *scaffolds* fundado nos princípios da engenharia de tecidos, e, portanto, potenciais para propiciar completa funcionalidade celular, tais como adesão, proliferação e diferenciação, a partir de metodologias existentes na literatura.
- Verificar a eficiência da descelularização frente à integralidade estrutural da matriz extracelular e aos níveis de detritos celulares por meio de análises histológicas.
- Caracterizar as propriedades estruturais e mecânicas intrínsecas dos biomateriais naturais obtidos a partir de pâncreas frescos, por meio das diversas técnicas descritas na literatura.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou em 2016 que nos últimos 25 anos o número de pessoas com diabetes aumentou cerca de 400%: de 108 milhões em 1980 para 422 milhões em 2014, e com um crescimento rápido da prevalência nos países de renda média e baixa. A OMS estimou que, apenas em 2016, o diabetes foi a causa direta de 1,6 milhões de mortes, posicionando-se em sexto lugar na escala mundial das maiores causas de óbito (WHO, 2018).

Financeiramente, o 8º Atlas Mundial de Diabetes publicado pela Federação Internacional de Diabetes (IDF para o inglês *International Diabetes Federation*), informou que apenas em 2017 foram gastos \$850 bilhões de dólares mundialmente. Para o mesmo período, o Brasil gastou \$24 bilhões de dólares com a doença, e ocupou a 6ª posição na escala dos países com o maior gasto em diabetes.

O número de casos de diabetes diagnosticados no Brasil cresceu 61,8% nos últimos 10 anos, com o número das mulheres portadoras do diabetes mellitus ultrapassando o dos homens. Esse quadro torna-se ainda mais grave quando se considera os casos não classificados como diabetes devido às taxas de glicose encontrarem-se nos limiares, ou pelo completo desconhecimento dos sintomas da doença. De acordo com a Fundação Oswaldo Cruz, "50% dos diabéticos não sabem que possuem a doença" (IDF, 2017).

3.1 Gerenciando a glicose

A ingestão de alimentos, sejam eles carboidratos, proteínas ou gorduras, induz as células e órgãos acessórios presentes no trato gastrointestinal a decompô-los por meio de processos químicos e de contração mecânica, provida pelo peristaltismo - a motilidade intestinal. Água, tampões e enzimas são os principais componentes empregados nesse processo de redução do bolo alimentar em partículas extremamente pequenas e solúveis. O quimo, a denominação dessa forma solúvel, é então passado ao duodeno onde recebe secreções hepáticas, a bile, e pancreáticas para a finalização do processo de digestão absorvendo vitaminas, íons, água e produtos da digestão pelas células do epitélio intestinal para ganhar a corrente sanguínea ou linfática, e serem distribuídas através do organismo (DIABETES.CO.UK, 2018).

A liberação de insulina pelas células β do pâncreas é dependente do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), das elevadas concentrações de glicose no sangue e de certos aminoácidos. A insulina propicia a entrada da glicose e aminoácidos em diversas células teciduais, enquanto estimula a fosforilação da glicose nos hepatócitos e converte a glicose 6-fosfato em glicogênio - tanto no fígado quanto nas células musculares. Assim, a insulina intensifica a síntese de proteínas no fígado e no tecido adiposo (TORTORA *et al.*, 2010).

Após um período médio de quatro horas da ingestão do alimento, praticamente todos os nutrientes já foram absorvidos, levando à queda na concentração de glicose. Inicia-se então um dos principais desafios metabólicos: manter a concentração de glicose sanguínea entre 70 e 110 mg/100 mL (3,9 – 6,1 mmol/L). Tais níveis são importantes por duas razões principais: os eritrócitos obtêm todo o seu ATP a partir da quebra da glicose – a inexistência de mitocôndrias nos eritrócitos determina a ausência de ambos os ciclos de Krebs e da cadeia de transporte de elétrons; e sem a glicose, não ocorre a produção de ATP no sistema nervoso – uma vez a incapacidade dos ácidos graxos em transpor a barreira hematoencefálica faz com que a glicose seja a molécula combustível predominante (TORTORA *et al.*, 2010).

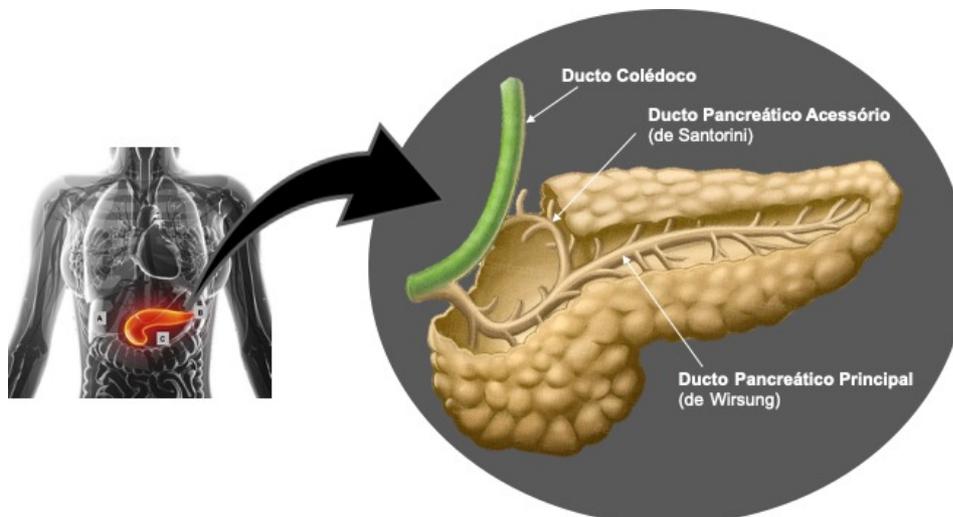
De maneira antagônica, à medida que a concentração de glicose sanguínea abaixa, ocorre a liberação de hormônios anti-insulina. As células α do pâncreas liberam glucagon com velocidade superior à liberação de insulina pelas células β , cujo principal alvo é o fígado. A glicose passa então a ser liberada na corrente sanguínea (TORTORA *et al.*, 2010).

3.2 O pâncreas

O pâncreas é um órgão do sistema digestivo anatomicamente posicionado atrás do estômago, como mostrado na Figura 1, apresentando uma morfologia transversalmente alongada e com aparência esponjosa. Designado como glândula anficrina, por possuir tecidos secretórios endócrinos e exócrinos, o pâncreas, juntamente com o fígado – também um órgão com tecido secretório, representam as maiores glândulas do corpo humano (PAULSEN *et al.*, 2011).

Figura 1 - Posicionamento do pâncreas no tronco abdominal.

A seta indica uma ampliação do pâncreas humano.

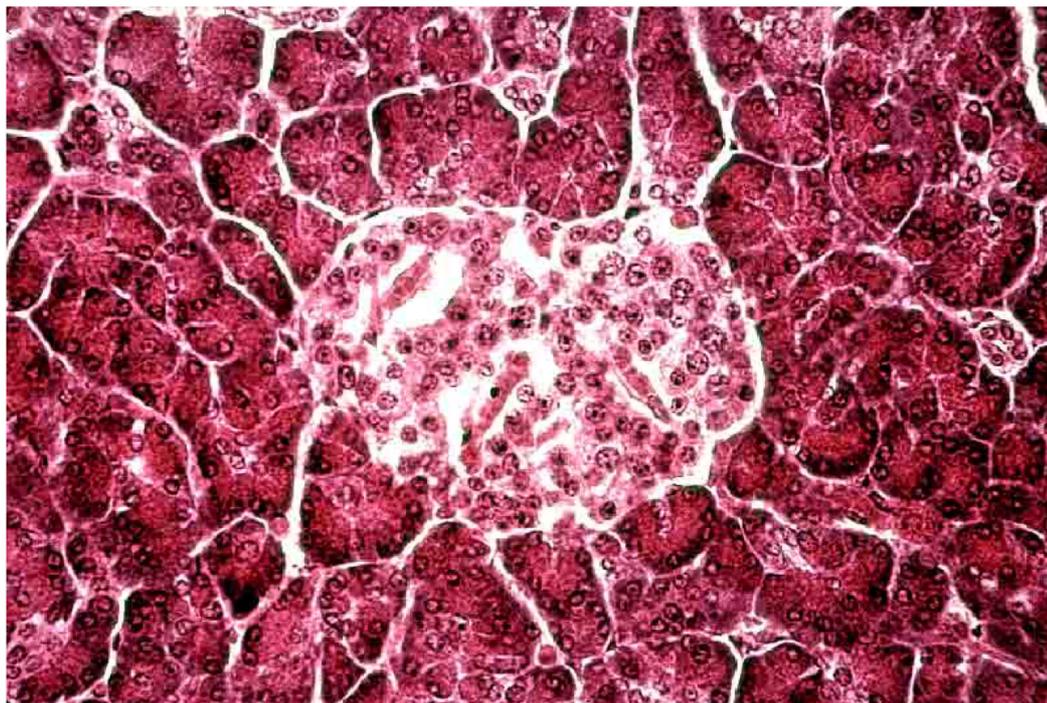


Fonte: Edição dos originais da @Science Photo Library (2018) e CentralX® Atlas (2011) pelo Autor (2019)

Sua porção exócrina é responsável pela produção de sucos pancreáticos que contém as enzimas encarregadas pela degradação molecular dos alimentos digeridos, juntamente com a bile produzida no fígado, e que são liberadas no duodeno via ducto pancreático. Sua porção endócrina produz hormônios diretamente secretados nos vasos sanguíneos cuja a função é regulação da glicose no sangue. (PANCREATIC CANCER UK, 2018).

Já a porção endócrina do pâncreas encontra-se agrupada nos aglomerados de células chamadas de ilhotas de Langerhans apresentadas na Figura 2. Nessas ilhotas densamente vascularizadas encontram-se as células α produtoras de glucagon, as células β produtoras de insulina, as células δ produtoras de somatostatina, as células PP produtoras de polipeptídeos pancreáticos e as células ϵ produtoras de grelina. Quando os níveis de glicose no sangue encontram-se abaixo do intervalo normal (70-130 mg/dL, em jejum), células α secretam o glucagon sinalizando ao fígado para quebrar o glicogênio em glicose e secretá-la na corrente sanguínea. Antagonicamente, quando o sangue apresenta altos níveis de glicose, as células β secretam insulina para absorver esse excedente. Atuante em praticamente em todas as células musculares, sanguíneas e adiposas, dentre outras, a insulina faz com que os níveis glicose voltem para um nível dentro da faixa normal (GOH, 2006).

Figura 2 – Ilhotas de Langerhans em meio aos ácinos pancreáticos



Fonte: Vanderbilt University (2018)

Caso o organismo não seja capaz de produzir insulina ou de administrá-la eficientemente, essa glicose irá se acumular no sangue. O diabetes mellitus, ou simplesmente diabetes, é a resultante desse excesso de glicose acumulado no sangue.

3.3 O diabetes

O diabetes manifesta-se mais frequente de três maneiras: o tipo 1 desenvolve-se da incapacidade do organismo em produzir insulina pois o sistema imunológico do indivíduo ataca as células pancreáticas responsáveis pela produção de insulina. Esse tipo apresenta uma incidência maior em crianças e jovens, mas pode ocorrer em qualquer idade.

O tipo 2 representa os indivíduos com incapacidade de produzir, ou de administrar, a insulina em quantidades suficientes à demanda. Esse tipo, associado à obesidade e ao sedentarismo, apesar de muito frequente em adultos também pode ocorrer em qualquer idade. O tipo 3 é o diabetes gestacional que, geralmente, desaparece após o parto.

O volume de insulina liberada pelas células β pancreáticas flutua de acordo com a frequência, natureza e via do estímulo. Grande parte da população não desenvolve hiperglicemia pois as células β liberam insulina em quantidades adequadas à demanda. Entretanto, em indivíduos obesos, a modulação realizada pelas células β diminui e esse declínio funcional contínuo torna-se uma das principais causas do diabetes tipo 2 (AL-GOBLAN *et al.*, 2014).

A gordura acumulada nos tecidos leva à secreção dos hormônios glicerol, e outras substâncias tais como o hormônio leptina, as citocinas, a adiponectina, e substâncias pró-inflamatórias. Isso leva a uma diminuição da capacidade das células em responder à ação da insulina no transporte de glicose (açúcar) da corrente sanguínea para os tecidos. Indivíduos que apresentam uma distribuição de gordura mais periférica, são mais sensíveis à insulina do que aqueles com distribuição de gordura visceral, ou seja, mais central. A essa diminuição de sensibilidade, ou de resposta, à insulina denominamos resistência à insulina (AL-GOBLAN *et al.*, 2014).

A ineficiência ou inexistência de insulina, que é um estimulador de transporte, faz com que a glicose circulante no sangue não seja absorvida para seguir sua via metabólica. O excesso de glicose circulante no sangue passa então a promover sérios danos, especialmente aos nervos e vasos sanguíneos. As complicações decorrentes desse quadro podem então evoluir para doença cardíaca, acidente vascular cerebral, cegueira, amputação de membros e óbito (DHOLAKIA *et al.*, 2017). A ocorrência de tais riscos aumenta consideravelmente quando o diabetes se associa a outros fatores de risco como, por exemplo, o tabaco (COLUMBIA U, 2018).

Existem ainda alguns tipos menos frequentes como a diabetes MODY (do inglês *Maturity Onset Diabetes of the Young*) que se refere a formas hereditárias de mutação autossomática. Contudo, pancreatites e lesões pancreáticas como Neoplasia Intraepitelial Pancreática, NIPan3, e a Neoplasia Mucínica Papilar Intraductal, NMPI, podem causar cicatrizes que levam sua região vicinal à perda de função, situação que pode resultar em problemas digestivos e/ou diabetes (COLUMBIA U, 2018).

Contudo, o desequilíbrio das taxas de glicose pode gerar consequências graves mesmo para um indivíduo não diabético. Níveis altos de glicose sanguínea causam acidente vascular encefálico, parada cardíaca, angina, aterosclerose, neuropatia periférica, retinopatia diabética, doenças renais, disfunções sexuais, aborto etc. (COLUMBIA U, 2018).

3.4 Diabetes mellitus

O diabetes mellitus corresponde a uma série de anomalias relacionadas à incapacidade de produzir ou utilizar a insulina produzida pelo organismo. Suas consequências podem ser a hiperglicemia (excesso de glicose no sangue), glicosúria (presença de glicose na urina), poliúria (excesso de urina devido à incapacidade renal de absorver água), polidipsia (sede excessiva) e polifagia (fome excessiva) (WHO, 2018).

3.5 Tipos de diabetes

3.5.1 Diabetes mellitus insulino-dependente tipo I

Nessa versão metabólica multissistêmica, o diabetes é insulino-dependente e apresenta-se como uma doença autoimune. As células do sistema imunitário (especificamente linfócitos T autoreativos) que são responsáveis pela defesa contra agentes invasores externos identificam células, tecidos ou até mesmo órgãos do próprio organismo para o combate e destruição. Em geral, o tipo I inicia-se na infância e agrava-se na puberdade. A instabilidade glicêmica desse indivíduo é diretamente relacionada ao condicionamento físico, a padrões alimentares e à administração de insulina. A inexistência, ou a existência em níveis muito baixos, de insulina determina o baixo aproveitamento da glicose dos tecidos muscular e adiposo, bem como seu armazenamento no fígado sob forma de glicogênio (BRASILEIRO, 2000).

O tipo I é caracterizado pela hiperglicemia, pelos distúrbios hidroeletrólíticos e cetoacidose: a falta ou a ineficiência da insulina impede a passagem de glicose às células, que, para não pararem de funcionar, passam a metabolizar ácidos graxos para obtenção de energia. Entretanto, o subproduto dessa síntese são as cetonas, ou corpos cetônicos, que vão acumulando-se no sangue (e produzem alta toxicidade no organismo).

As complicações desse tipo incluem aterosclerose progressiva das artérias - que podem levar à necrose isquêmica das extremidades dos órgãos internos e à obstrução microvascular, causando lesão na retina, nos glomérulos renais e dos nervos periféricos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

3.5.2 Diabetes mellitus não-insulino-dependente tipo II

Esse tipo mais difundido não está relacionado à autoimunidade, ele desenvolve-se geralmente em indivíduos obesos após os 30 anos de idade. Essa patologia desenvolve-se como uma consequência da ineficiente ligação entre a insulina e seus receptores nas membranas celulares (os receptores se tornam insensíveis à insulina). O diagnóstico ocorre em exames de rotina (sangue e urina) de indivíduos assintomáticos. As alterações metabólicas são menos acentuadas e a regulação mais fácil do que a insulino-dependente tipo I (BRASILEIRO, 2000).

No início da doença podem ocorrer a poliúria e apolidipsia. Quando o organismo se encontra em desequilíbrio, observa-se uma desidratação grave em decorrência da diurese, pela hiperglicemia e baixa ingestão de líquidos. Quanto o tipo II acomete indivíduos não obesos, seu tratamento é insulino-dependente e muito similar ao diabetes tipo I (BRASILEIRO, 2000).

Até meados da corrente década, classificava-se o diabetes como tipo 1, 2 ou 3. Porém, num estudo recente com pacientes diabéticos, Ahlqvist *et al.*, (2018) reclassificaram o diabetes nos cinco tipos descritos na Tabela 1. Essa nova reclassificação além de ajudar na identificação dos casos com alto risco de complicações, esclarece o motivo de alguns pacientes diabéticos responderem ao tratamento padrão de maneira tão diversa.

Tabela 1 – Proposta para a nova classificação dos tipos de diabetes, descrita nas Diretrizes do Biênio 2017-2018 da Sociedade Brasileira de Diabetes.

Agrupamento	Forma	Características	Incidência
1	Autoimune severa	Tipo I - não ocorre produção de insulina pelo pâncreas	Crianças e jovens com peso normal.
2	Deficiência severa de insulina	Tipo I – apresentam danos nas células produtoras de insulina, portanto produzem insulina em quantidades muito baixas	Não informado
3	Resistência severa à insulina	Diabéticos insulino resistentes	Pessoas obesas
4	Branda	Diabéticos não insulino resistentes	Pessoas obesas
5	Branda	Indivíduos desenvolvem em idades avançadas	Pessoas idosas

Fonte: Ahlqvist *et al.* (2018)

3.6 O transplante de pâncreas como fator de melhoria da qualidade de vida

Para um considerável número de pessoas em estágios de diabetes severamente avançados, principalmente do tipo I, a esperança de uma melhoria da qualidade de vida resta no transplante de pâncreas. O transplante de pâncreas oferece a perspectiva de euglicemia a longo prazo e de acordo com Dholakia *et al.* (2017), em alguns casos, é capaz de reverter algumas das complicações diabéticas. Em 2016 houveram mais de 2.300 procedimentos de transplante de pâncreas (ONT-WHO, 2016) em todo mundo. No Brasil, apenas em 2018, houveram 146 transplantes de pâncreas, com o valor acumulado entre janeiro de 2008 a dezembro de 2018 de 1.588 transplantes (RBT, 2018).

A maioria dos transplantes, ou enxertos, de pâncreas provém de doadores com morte cerebral e batimento cardíaco, DBD (do inglês *Donor after Brain Death*). Entretanto, a agência de Administração de Recursos e Serviços para Saúde americana, HRSA, (do inglês *Health Resources and Services Administration*) informou que apenas 3 pessoas em 1.000 morrem de uma forma que permita a doação de órgãos.

Ademais, o rigoroso critério de seleção para os doadores classifica apenas órgãos de doadores altamente selecionados para serem implantados, da mesma forma, em pacientes também intensamente selecionados. Alguns dos critérios de seleção são a idade inferior a 60 anos, o Índice de Massa Corporal, IMC, menor que 35 kg/m² e um estilo de vida saudável - sem a presença de álcool. Consequentemente, a maioria dos países descarta cerca de 40% dos órgãos doados (DHOLAKIA *et al.*, 2017). Adicionam-se a esse veto de órgãos os custos onerosos da seleção dos órgãos doados e a falta de doadores. Essa realidade produz então um nicho muito restrito de pessoas capazes de beneficiarem-se de alotransplantes.

Por outro lado, a perspectiva para o receptor do órgão também é lúgubre: o tempo de espera do transplante é de aproximadamente dois anos (JOHN HOPKINS, 2019); o procedimento deve acontecer dentro de uma janela relativamente curta de 18-24 h seguindo-se a disponibilidade do órgão; e após o implante, caso não ocorra rejeição, os 10 anos de expectativa de vida seguem rotinas estritas sob imunossuppressores - cujos efeitos colaterais potenciais podem ser a depressão, a ansiedade, pressão alta, colesterol alto, osteoporose, dentre outros (MAYO, 2019).

3.7 Alternativas convencionais ao transplante de pâncreas

Além do transplante de pâncreas, outras terapias capazes de oferecer a euglicemia a diabéticos do tipo 1 são a restauração de células β e o transplante de ilhotas pancreáticas. Enquanto a restauração de células β permite uma reposição de insulina de maneira mais fisiológica do que aquela oferecida por dispositivos invasivos ou pelas bombas de insulina, o transplante de ilhotas pancreáticas tem sido visto sob grande escrutínio devido à baixa eficiência do protocolo de Edmonton. Tal deficiência foi atribuída à severos estressores fisiológicos e mecânicos que incluíam a baixa eficiência de isolamento das ilhotas, os efeitos imunossuppressores na proliferação das células β , a resposta inflamatória do hospedeiro, rupturas na membrana basal e a ausência de revascularização (SALVATORI *et al.*, 2014).

Aliado ao baixo desempenho da reposição de células β agregam-se outros fatores limitantes como a necessidade de utilização de 2 a 4 pâncreas (cadavéricos) inteiros para se obter uma contagem de ilhotas suficientes para um único receptor (SALVATORI *et al.*, 2014); um cenário crítico haja vista a restrita disponibilidade de doadores. Contudo, Thompson *et al.* (2011) relataram que se comparado à terapia

médica intensiva, a terapia com as ilhotas pancreáticas oferece uma redução nas complicações vasculares retinopáticas (BRUNI *et al.*, 2014).

Todavia, para os pacientes tratados com insulina exógena, o transplante de pâncreas é o procedimento que provê a insulina com maior eficiência, além de melhorar as complicações secundárias do diabetes e a qualidade de vida do paciente.

3.8 Soluções da Engenharia de Tecidos

O pâncreas é um órgão complexo e a peculiaridade de sua estrutura matricial dificulta a replicação de sua estrutura pelos biomateriais atualmente disponíveis (GOOR *et al.*, 2017). Porém, o advento da tecnologia possibilitou aos campos da ciência dos materiais e da engenharia de tecidos, o desenvolvimento de soluções inovadoras capazes de abordar limitações como a falta de doadores, a morbidade cirúrgica e até mesmo a rejeição de tecidos. Dentre as soluções que visam restaurar as funções endócrinas em pâncreas insulino-dependente encontram-se a produção de fármacos de degradação lenta, o encapsulamento de ilhotas pancreáticas e a bioengenharia de órgãos, por meio da tecnologia de descclularização (SALVATORI *et al.*, 2014).

A descclularização é o processo de descarte das células viáveis de um órgão ou tecido nativo (como artérias, válvulas, coração, rim, fígado, pâncreas etc.) por meio de perfusão de soluções e métodos físicos enquanto preserva-se a sua geometria tridimensional e a integridade estrutural da matriz extracelular adjacente. Ao término do processo, a estrutura descclularizada retém a sua relevância com o complexo microambiente *in vivo*.

Posteriormente, o órgão descclularizado pode ser repovoado com as células-tronco do próprio paciente, constituindo um novo órgão compatível, que não oferece o risco de rejeição pelo sistema imunológico do paciente ou a necessidade de utilização eterna de imunossuppressores (MACCHIARINI *et al.*, 2008).

3.9 A Matriz Extracelular, MEC

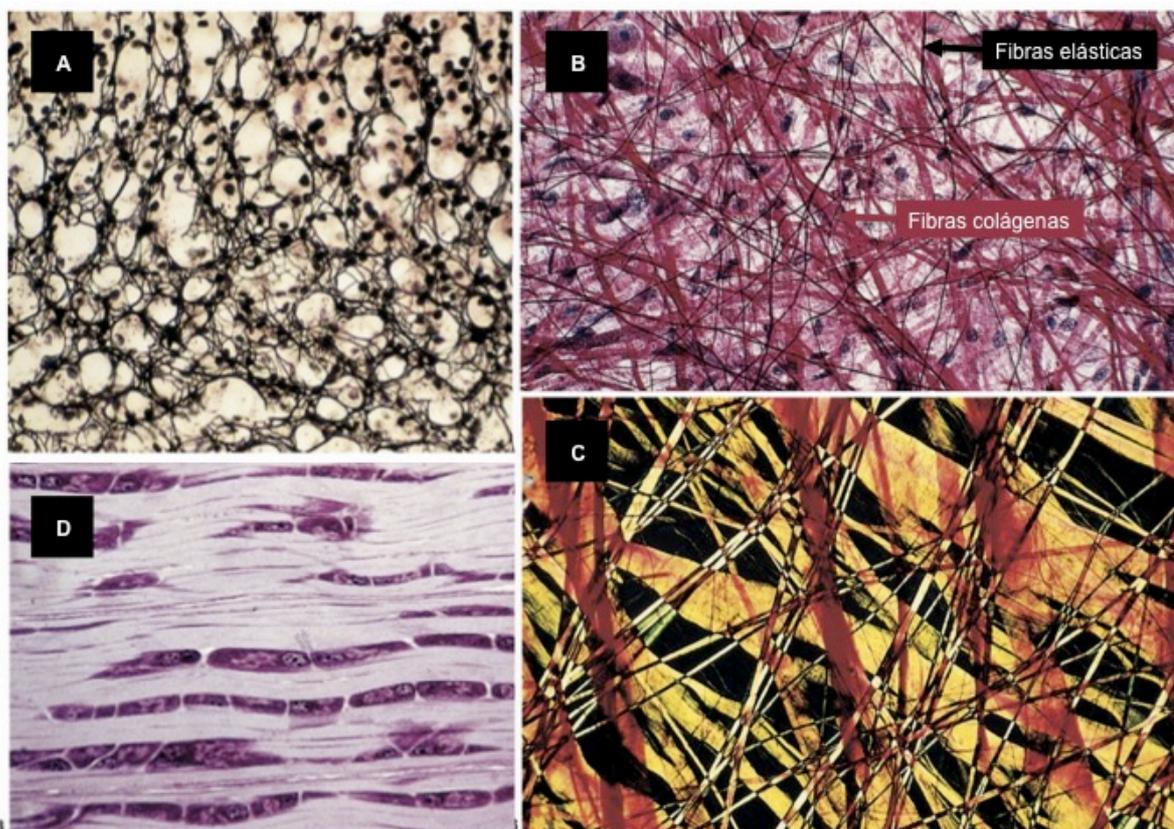
A MEC é representada por todas as estruturas adjacentes às células e é parte integrante de todos dos sistemas orgânicos. Sua estrutura altamente eficiente e versátil é responsável pelas configurações bioquímicas, espaciais, físicas e

mecânicas necessárias às funções e homeostase celulares. Fundamentalmente, a MEC é constituída de água, proteínas diversas e polissacarídeos, e, de acordo com a combinação molecular destes, produz os diferentes tipos de órgãos com características morfológicas e estruturais específicas. Dessas combinações moleculares também originam as diversas estruturas internas e externas do órgão que funcionam como receptores celulares, canais membranares, e como fibras de sustentação (como as integrinas, fibronectinas etc.). São esses componentes estruturais que estabelecem a adesão, a migração, a sinalização e a diferenciação celular. Seu grau de funcionalidade deve-se, em grande parte, à constante remodelação matricial, que pode ser enzimática ou não, e que também regulamentam as forças de tração, resistência, cisalhamento, gradientes elétrico e iônico e os múltiplos níveis de hidratação (FRANTZ *et al.*, 2010).

Notoriamente, todo esse aparato extracelular funciona concomitantemente ao complexo nível de vascularidade da MEC. O seu sistema vascular é desenvolvido de acordo com a sistemática dos fatores de crescimento endotelial, VEGF (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), o principal regulador do crescimento vascular. Assim, a matriz extracelular adequa a atividade dos fatores de crescimento angiogênicos, regulando sua concentração local, distribuição, biodisponibilidade e sinalização (MARTINO *et al.*, 2015).

Macroscopicamente, os dois componentes principais da MEC são os proteoglicanos, PGs, que preenchem a parte intersticial celular sob forma de gel e são os grandes responsáveis pelas forças mecânicas e pelo nível de hidratação da matriz; e as proteínas fibrosas como colágeno, elastinas, fibronectinas e lamininas (FRANTZ *et al.*, 2010), mostradas na Figura 3. Representando o segundo maior componente do tecido conectivo após a água, o colágeno representa cerca de 30% da massa proteica total do organismo e constitui o principal elemento estrutural da MEC. O colágeno é ainda responsável pela resistência à tração, regulando a adesão e a migração celulares, a quimiotaxia e o desenvolvimento tridimensional da matriz.

Figura 3 (a) Corte histológico do córtex da glândula adrenal enfatizando a rede formada pelas fibras reticulares de colágeno do tipo III (corante: prata). (b, c) Mesentério de camundongo jovem mostrando os feixes de fibras de colágeno (em vermelho) e as fibras elásticas (em preto). (c) Mesmo corte de B observado em microscópio de polarização, com os feixes de colágeno em várias espessuras, regiões escuras indicam sobreposição dos feixes. (d) Corte longitudinal de tecido conjuntivo denso modelado de tendão. Mostra o arranjo dos fibroblastos paralelo aos feixes de fibras de colágeno (corante: parasosanilina e azul de toluidina).



Fonte: Junqueira; Carneiro (2013)

A elastina, proteína com alta resistência à tração encontrada no tecido conjuntivo, é o principal componente das fibras elásticas e permite que as fibras elásticas possam se esticar e retomar ao seu comprimento original (VASUDEVAN *et al.*, 2013).

Os fibroblastos locais, ou recrutados de tecidos vizinhos, são responsáveis pela secreção de grande parte do colágeno intersticial e também pelo rearranjo das fibras colágenas, de acordo com os níveis de tensão introduzidos na matriz. Esse será o

fator determinante do grau de alinhamento das fibras. Para instituir elasticidade ao tecido e conferir sua distensão máxima, o colágeno associa-se à elastina. Já o direcionamento e organização intersticial da MEC é fornecido pela fibronectina (FN) que também medeia as funções celulares (VAN DEN BERG, 2012).

Nas formações de coágulos e danos vasculares, ocorre a estimulação para a penetração de monócitos (células do sistema imunológico) na MEC danificada. Os produtos de degradação da MEC diferenciam os monócitos em macrófagos, e estes, passam a secretar fatores de crescimento juntamente com outros componentes, estimulando a migração e a proliferação de fibroblastos. Os fibroblastos passam então a depositar localmente grandes quantidades de FN, ácido hialurônico e colágeno dos tipos I e III. Essa deposição massiva provoca um estresse mecânico na matriz, induzindo a diferenciação dos fibroblastos em outros tipos de células residentes no tecido (DE WEVER *et al.*, 2008).

Caso os monócitos diferenciem-se em miofibroblastos, os quais apresentam alta capacidade de síntese e contração, há a formação de feixes colágenos rígidos que levam ao enrijecimento do tecido. Esse tecido rígido perturba a membrana basal de forma a desestabilizar sua polaridade apical-basal. Em prol da restauração da homeostase, células teciduais migram naquela direção e assim ocorre a consolidação da fibrose. As lesões repetidas podem comprometer a remodelação vascular, levando à incapacidade de regeneração regular e produzindo uma fibrose aberrante, cujas limitações elásticas terminam por promover os fenótipos tumorais, assim como ocorre no mecanismo de cicatrização de feridas (DE WEVER *et al.*, 2008).

Em geral, pode-se dizer que existem dois grupos principais de matrizes: as intersticiais, envolvendo as células; e as pericelulares, próximas às células - interfaceando ou ancorando tecidos e órgãos de modo a mantê-los próximos ou conectados.

Todos os tipos de células (epiteliais, fibroblastos, endoteliais e de defesa) participam na síntese e secreção das macromoléculas constituintes das matrizes. Variações geradas nessa estrutura afetam não apenas as propriedades biomecânicas mas também o sistema de comunicação celular, que acontece por meio de sinalização e modulação. Sua eficiência é fundamental para a homeostase.

3.10 – O colágeno

O colágeno é o principal elemento estrutural para a manutenção da integridade dos tecidos e de todos os órgãos parenquimais, onde eles constituem o principal componente intersticial. Atuam nas membranas basais, promovem microambientes pericelulares em prol da unidade celular, e medeiam a interação com integrinas, glicoproteínas e receptores especializados de proteoglicanos, proporcionando a adesão - para que a ancoragem celular favoreça a diferenciação, o crescimento e reatividades celulares. Os diversos tipos de colágeno também contribuem para o armazenamento e distribuição de fatores de crescimento e citocinas, atuando como veículos de transporte para o fornecimento de elementos terapêuticos no desenvolvimento e reparação de órgãos e tecidos (VASUDEVAN *et al.*, 2013).

O nome colágeno, do grego cola, é utilizado como termo genérico para proteínas que formam uma hélice característica de três cadeias polipeptídicas com repetições do tripeptídeo prolinéico Gly-X-Y. Gly para glicina, o menor aminoácido, aparece obrigatoriamente sempre na mesma posição, a qual ficará disposta no centro da tripla hélice; enquanto X e Y equivalem, geralmente, à prolina e hidroxiprolina respectivamente.

A síntese de seu precursor, o procolágeno, ocorre por fibroblastos intracelularmente. Após secretado, o procolágeno é clivado por peptidases específicas em tropocolágeno, cujas moléculas vão sendo arranjadas em quartetos escalonados para formar as fibras de colágeno (as moléculas são separadas por 400 Å e as linhas adjacentes por 680 Å, repetindo a cada 5ª linha); arranjo que ajuda a mineralização (VASUDEVAN *et al.*, 2013).

A repetição formadora de hélices (Gly-X-Y) é o motivo predominante da formação de fibrilas (I, II, III) resultando em domínios helicoidais triplos de 300 nm de comprimento que corresponde a cerca de 1000 aminoácidos. Em outros tipos de colágeno, esses domínios são muito mais curtos ou contêm interrupções helicoidais não triplas. O conteúdo da 4-hidroxiprolina é essencial para a formação de pontes de hidrogênio intramoleculares, contribuindo para a estabilidade da conformação helicoidal tripla. Cada uma das três cadeias forma uma hélice esquerda com um passo de 18 aminoácidos por volta, onde cada curva é separada por 2,9 Å. Escalonadas por um resíduo em relação ao outro, são superenoveladas em torno de um eixo central para a direita para formar a tripla hélice (VIDAL; VOLPE, 2005).

Ligações cruzadas covalentes entre resíduos de lisina e hidroxilisina atuam fortalecendo as fibras de colágeno. Mas quando o colágeno é aquecido a sua viscosidade diminui e a hélice tripla de “desenrola”, produzindo cadeias aleatórias, a gelatina, que podem permanecer covalentemente ligadas umas às outras ou não - dependendo do grau de aquecimento. Nos vasos sanguíneos, se ocorre a exposição de colágeno, as plaquetas aderem-se a ele e a formação de trombos é iniciada (VIDAL; VOLPE, 2005).

Os colágenos são depositados na matriz extracelular, onde a maioria deles forma montagens supramoleculares. Quatro colágenos são proteínas de membrana do tipo II que também existem em uma forma solúvel liberada da superfície celular por derramamento. Os colágenos desempenham papéis estruturais e contribuem para propriedades mecânicas, organização e forma dos tecidos. Eles interagem com as células através de várias famílias de receptores e regulam sua proliferação, migração e diferenciação. Alguns colágenos têm uma distribuição restrita de tecidos e, portanto, funções biológicas específicas (VIDAL; VOLPE, 2005).

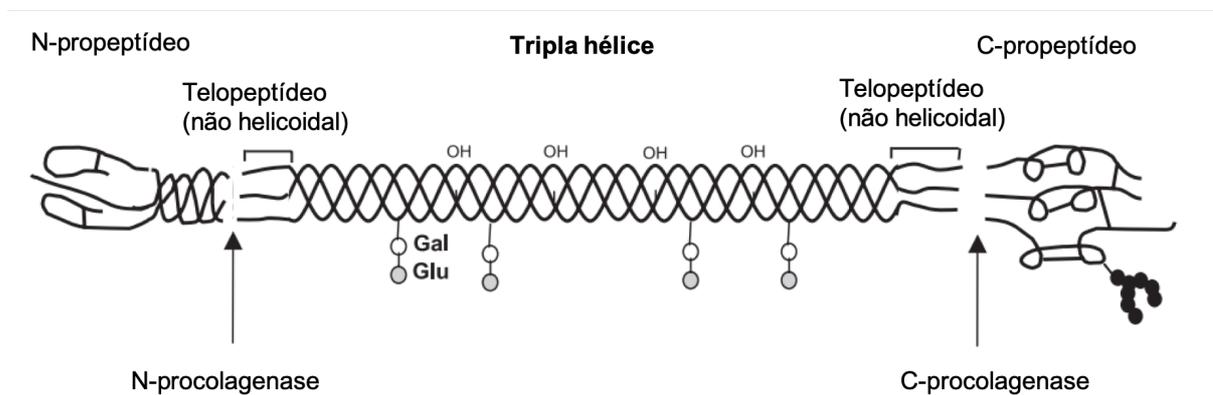
A família do colágeno compreende 28 membros que contêm pelo menos um domínio tri-helicoidal (RICARD-BLUM, 2011). Organizados com base em sua estrutura supramolecular, são descritos como: colágenos formadores de fibrilas, que representam 90% dos colágenos; colágenos associados à fibrila (FACIT); colágenos formadores de redes; fibrilas de ancoragem; colágenos transmembranares; colágenos da membrana basal e outros com funções exclusivas (GELSE *et al.*, 2003).

Os colágenos clássicos de formação de fibrilas incluem os colágenos tipo I, II, III, V e XI e caracterizam-se por sua capacidade de agregações supramoleculares altamente orientadas. Um típico arranjo fibrilado com diâmetros entre 25 e 400 nm. Colágenos associados à fibrina com hélices triplas interrompidas (FACIT), tipos IX, XII e XIV, associam-se como moléculas únicas à grandes fibrilas e desempenham um papel na regulação de diâmetro das fibrilas de colágeno (GELSE *et al.*, 2003).

O colágeno tipo I é o mais abundante e melhor estudado. Representando mais de 90% da massa orgânica do osso, fornece rigidez torcional, resistência à tração e define propriedades biomecânicas consideráveis em relação ao suporte de carga, em particular após calcificação. Trata-se do tipo principal de tendões, fâscias, pele, ligamentos, córnea e muitos tecidos conjuntivos intersticiais, com exceção de poucos tecidos como a cartilagem hialina, cérebro e corpo vítreo. A tripla hélice do colágeno

tipo I, ilustrada na Figura 4, é geralmente formada como um heterotrímero de duas cadeias idênticas $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ (GELSE *et al.*, 2003).

Figura 4 - Estrutura molecular de colágenos fibrilar com os vários subdomínios, bem como os locais de clivagem para as procologenases. Dispostos em tendão de forma paralela, seu supramolecular assemelha-se a uma rede. Colágeno tipo I. Localização: cartilagem articular.



Fonte: GELSE *et al.* (2003)

O colágeno do tipo II, formador de fibrilas, é predominante na cartilagem hialina. Responsável por cerca de 80% do conteúdo total de colágeno, também integra o corpo vítreo no epitélio da córnea, a notocorda, o núcleo pulposo dos discos intervertebrais, o epitélio embrionário e as transições mesenquimais. A tripla hélice do colágeno tipo II é composta de três cadeias homotriméricas $\alpha 1$ de tamanho e propriedades biomecânicas semelhantes às do colágeno tipo I (GELSE *et al.*, 2003).

O colágeno tipo III é um homotrímero de três cadeias $\alpha 1$ e é amplamente distribuído em tecidos contendo colágeno I, com exceção do osso. Componente importante das fibras reticulares no tecido intersticial dos pulmões, fígado, derme, baço e vasos, esta molécula também associa-se ao colágeno tipo I em fibrilas mistas, aparecendo em abundância nos tecidos elásticos (GELSE *et al.*, 2003).

O colágeno tipo IV é o componente estrutural mais importante das membranas basais que integra lamininas, nidogênios (glicoproteínas monoméricas presentes na lâmina basal) e outros componentes. Sua estrutura é caracterizada por três domínios,

resultando em uma hélice tripla flexível. A forma predominante é representada por cadeias heterotrímeras com uma $\alpha 1$ e duas $\alpha 2$ (GELSE *et al.*, 2003).

O colágeno tipo V forma a estrutura central de heterofibrilas de colágenos tipos I e III específicas da matriz óssea orgânica, do estroma corneano e da matriz intersticial dos músculos, fígado, pulmões e placenta. Analogamente, o colágeno do tipo XI forma o núcleo de heterofibrilas de colágeno tipo II (GELSE *et al.*, 2003).

O colágeno microfibrilar tipo VI é altamente reticulado por dissulfeto e contribui para uma rede de filamentos de contatos entrelaçadas com outras fibras de colágeno. Fragmentos não-colagenosos dos tipos IV, XV e XVIII têm demonstrado influenciar a angiogênese e a tumorigênese, além de várias outras reatividades celulares. Os colágenos dos tipos VIII e X formam redes hexagonais, enquanto os tipos XIII e XVII chegam a atravessar as membranas celulares (GELSE *et al.*, 2003).

3.11 Os primórdios dos transplantes xenogênicos

Talvez o registro mais longínquo de uma tentativa de recuperação funcional de organismos humanos seja representado pela obra "A perna etíope" ilustrada pela Figura 5, produzida no século XIV. O milagre de São Cosme e São Damião ocorrido em 474 d.C, que ilustra a substituição de uma perna cancerosa de um romano pela perna de um escravo negro precede em 1480 anos a primeira tentativa de transplantes a obter sucesso da ciência moderna.

Figura 5 - A perna etíope. Obra do Mestre da Capela Rinuccini Matteo di Pacino, (1350–75, Santa Croce, Florença, Itália). Museu de arte de Raleigh, Carolina do Norte, presente da fundação Samuel H. Kress (outras renderizações incluem "O milagre da perna negra" do inglês "*The miracle of the moor's leg*").



Fonte: Museu de Arte Walters, exibição: Revelando a presença africana na Europa renascentista. Mount Vernon-Belvedere, Baltimore, Maryland, Estados Unidos.

Os experimentos com transplante alogeneicos e xenogeneicos vem sendo registrados desde o século XVIII, porém o sucesso só foi alcançado em 1954, quando o Dr. Joseph Murray transplantou o fígado de um jovem saudável de 23 anos para o seu irmão gêmeo univitelino. Fato que lhe rendeu o prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 1990 (HRSA, 2018; DEAN, 2012). Em 1966, os doutores William D. Kelly e o Richard C. Lillehei realizaram o primeiro transplante duplo de pâncreas e rins (o transplante isolado de pâncreas acontece apenas em 1968), possibilitando que uma mulher jovem que possuía diabetes avançada se torne euglicêmica e insulino-independente (DSMS, U MINNESOTA, 2017).

Com as descobertas de novas tecnologias e de novos fármacos a sobrevivência dos transplantados tem se estendido consideravelmente. Porém, a demanda por transplantes excede a capacidade de atendimento, que é restrito não apenas à quantidade de doadores, mas também à identificação da compatibilidade entre os indivíduos envolvidos. Assim, tentando ampliar esse alcance, as ciências tecnológicas e biomédicas integraram-se para desenvolver soluções que estão evoluindo do paliativo para o curativo.

Algumas dessas soluções oferecem estruturas tridimensionais cerâmicas, poliméricas ou compósitas dos mais diversos materiais. Tais estruturas visam o fornecimento de suporte para a cultura de células voltadas à reposição de tecidos, ou até mesmo a produção de órgãos inteiros: tais como *biocell printing* (prototipagem rápida 3D com baixo risco de contaminação), arcabouços em gel (plasma rico em plaquetas), arcabouços em hidroxiapatita (sua ocorrência natural no tecido ósseo oferece a biocompatibilidade e osteocondução inerentes), eletrofiação, fiação úmida etc. Entretanto, Carvalho *et al.* (2015) descrevem limitações de desempenho severas para esses sistemas sintético, tais como a vascularização ineficaz, a baixa distribuição celular dentro dos *scaffolds*, fato que conseqüentemente leva à baixa densidade celular total.

Uma outra solução que vem sendo empregada desde primórdios do século XVII é o xenotransplante: de acordo com Cooper (2012), sangue de diversos animais, enxertos de pele de sapo e até mesmo fatias de testículo de chimpanzé (para o rejuvenescimento sexual masculino) eram popularmente transplantados para humanos. Em 1964, uma época que não havia disponibilidade de rins para transplante, Dr. Keith Reemtsma transplantou um rim de chimpanzé em uma mulher que viveu por mais 9 meses até que ela sucumbiu por um distúrbio eletrolítico. O Dr. Thomas Starzl transplantou em 1992 um fígado de babuíno em um homem que sobreviveu por 70 dias após a cirurgia; e em 1993, o Dr. Carl Groth transplantou ilhotas de Langerhans suínas em pacientes diabéticos (ALTMAN, 2000; PEARCE, 2017; ERICZON, 2014). Apesar de alguns pacientes apresentarem peptídeos suínos em seu sangue, a realização do Dr. Groth foi recebida com grande entusiasmo pois a diferença entre as insulinas humana e suína é de apenas um aminoácido, fator que confere sua baixa imunogenicidade ao organismo humano. Já a insulina suína altamente purificada é muito próxima à insulina humana biosintética (esta diferindo apenas por ser mais solúvel, o que a faz ser absorvida mais rapidamente).

Cooper (2012) ainda argumenta que uma série de condições relativas a doadores que sofreram óbito por insuficiências generalizadas, morte encefálicas e outros acometimentos podem vir a comprometer órgãos, como por exemplo o coração, e que irão certamente interferir em seu desempenho após transplante. Porém tais distúrbios jamais comprometeriam recipientes de xenotransplantes, devido ao estrito controle de procedência, rigoroso controle de patogenias e contaminantes e

as possibilidades de melhoramentos epigenéticos desde o estágio de fecundação dos animais doadores.

Mesmo apesar da possibilidade de uma vida à base de imunossuppressores, os xenotransplantes tornam-se ainda mais relevantes quando se considera que o número de doadores de órgãos não é capaz de atender à longa fila de espera para transplantes (principalmente em casos como o de transplante de ilhotas pancreáticas cuja quantidade de células necessárias para o transplante em um único indivíduo requer a totalidade de dois a quatro pâncreas cadavéricos) (SALVATORI *et al.*, 2014). Somando-se à essas considerações encontram-se ainda as estatísticas do crescente número de óbitos envolvendo doadores vivos (como os de fígado, por exemplo).

Não obstante, Carvalho *et al.* (2015) aponta que matrizes extracelulares (MECs) vem sendo utilizadas em cirurgias cardíacas por décadas. Extensivamente testadas em humanos tanto como arcabouços com colonizações celulares quanto como produtos acelulares (válvulas, *stents* etc.), reproduzem com acurácia o ambiente necessário para o desenvolvimento celular.

3.12 A imugenicidade dos transplantes xenogeneicos

O emprego da técnica de descclularização xenogeneica, é amplamente difundido nas mais diversas aplicações clínicas: em estudos de miopatias genéticas e suas respostas terapêuticas (ZHANG *et al.* 2014); nas reconstruções de tumores do trato gastrointestinal para a validação de fármacos (WANG *et al.*, 2017); e ainda em enxertos de vasos sépticos, como no caso dos emplastos de pericárdio bovino e eqüino na região aórtica e ilíaca femoral (TÖPEL *et al.*, 2016). São as propriedades de remodelagem construtiva da MEC que proveem os aspectos estruturais necessários para a biointegração (MORONI; MIRABELLA, 2014).

A descclularização de órgãos e de tecidos foi a estratégia encontrada pela engenharia de tecidos para a redução da imunogenicidade frente aos transplantes xenogênicos. Uma vez que a introdução de células ou órgãos alheios ao organismo humano resultava na rejeição imediata pelo sistema do complemento e pela imunoglobulina M, IgM, barreiras naturais ao transplante de espécies cruzadas (MORONI; MIRABELLA, 2014).

O xenoantígeno responsável pela rejeição é o epítipo α -galactosil, um carboidrato de estrutura única (Gal α 1–3Gal β 1–4GlcNAc-R) e que constitui um sítio de

ligação a anticorpos ou linfócitos. Sua distribuição é única em mamíferos e expressa abundantemente em glicoconjugados de mamíferos não primatas, prosimianos e macacos do Novo Mundo.

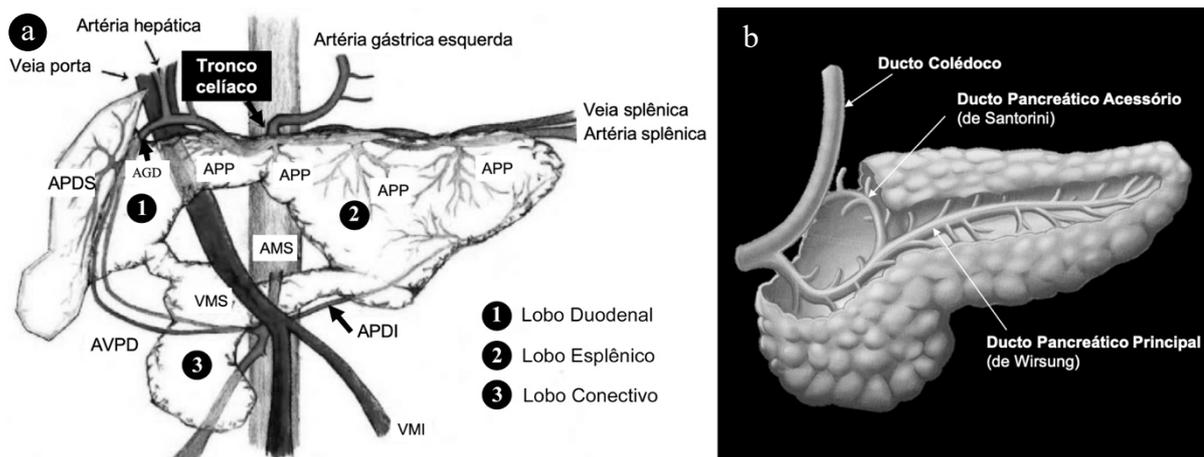
Porém, o epítopo α -gal não é expresso em glicoconjugados de macacos e humanos do Velho Mundo; contrastantemente esses mamíferos produzem anticorpo anti-Gal que liga-se especificamente ao epítopo α em quantidades muito grandes. Essa ausência do epítopo α -gal é o resultado de um evento evolutivo em primatas ancestrais do Velho Mundo que ocorreu há menos de 28 milhões de anos (O anti-Gal é o anticorpo natural mais abundante em humanos e macacos do Velho Mundo e constitui \pm 1% das imunoglobulinas em circulação, intervindo na rejeição de órgãos de xenoenxerto de porco para humanos e macacos) (MACHER; GALILI, 2008).

Uma solução alternativa bem mais complexa seria a do emprego de DNA recombinante na produção de animais transgênicos. Sem o epítopo α -galactosil ambas as células *Natural Killer*, NK, (ecto-5'-nucleotidase) e o sistema do complemento (CD55 e CD59) deixariam de serem ativadas (FLAHERTY, 2002).

3.13 A anatomia suína

Em grande parte dos suínos, o pâncreas é composto por três lobos com uma superfície nodular de margens irregulares. Na Figura 6 (a) é possível observar o lobo pancreático esplênico localizado na porção dorsal, conectado simultaneamente ao baço e ao estômago - anatomicamente coincidindo com a cauda e o corpo do pâncreas humano mostrado na Figura 6 (b). O lobo duodenal adjacente ao duodeno (coincidindo com a cabeça do pâncreas humano), e o lobo conectivo (processo uncinado), que é uma extensão anexada à veia porta. A ponte pancreática apresenta-se como uma conexão anatômica entre os lóbulos esplênico e conectivo (FERRER *et al.*, 2008).

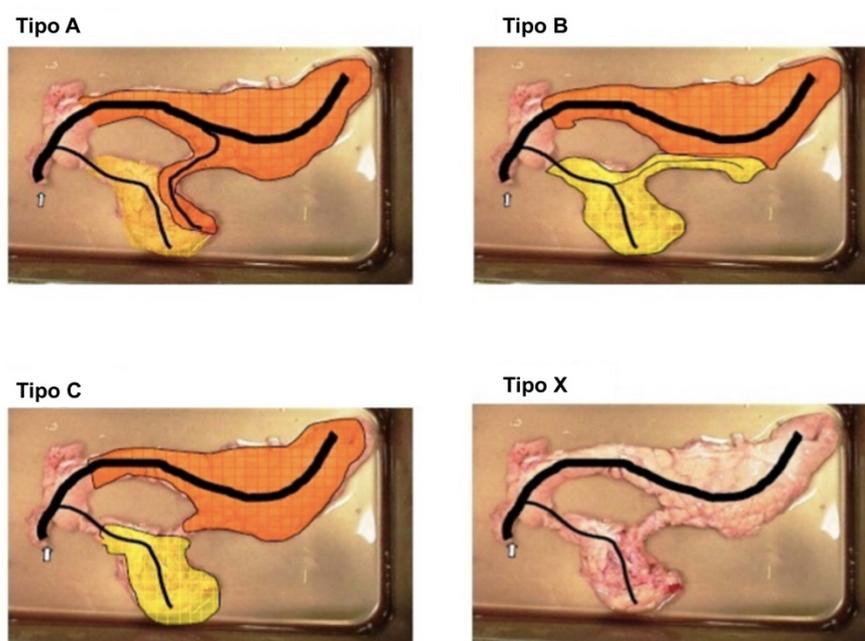
Figura 6 – (a) Diagrama anatômico vascular regular de um pâncreas suíno. (b) Representação esquemática básica de um pâncreas humano. AGD- Artéria Gastroduodenal; VMI – Veia Mesentérica Inferior; APDI – Artéria Pancreaticoduodenal Inferior; AVPD – Arcada Vascular Pancreaticoduodenal; APP – Artéria Pancreática Posterior; AMS – Artéria Mesentérica Superior; VMS – Veia Mesentérica Superior; APDS – Artéria Pancreaticoduodenal Superior.



Fonte: (a) Ferrer *et al.* (2008) e (b) CentralX® Atlas (2011)

O pâncreas suíno é um órgão retroperitoneal e apresenta diferenças significativas com o pâncreas humano. A Figura 7 mostra que dentre as alterações encontram-se a drenagem vascular, o número de dutos pancreáticos e o número e distribuição dos lóbulos pancreáticos. A veia esplênica drena corpo e a cauda pancreáticos e as porções restantes são drenadas pelos ramos provenientes da veia mesentérica superior e da veia portal. Analisando uma amostra de 65 porcos, 39% exibiram comunicação ductal entre o lobo conectivo e os lobos duodenal e esplênico. 31% exibiram comunicação ductal apenas do lobo esplênico para o conectivo, e em 2,8% a única comunicação era do lobo conectivo para o esplênico. Em 50% dos porcos não havia comunicação do ducto com o lobo conectivo e o esplênico. Um dos porcos exibiu dois dutos pancreáticos, um ducto entre o lobo duodenal e esplênico e um ducto para o lobo conectivo (FERRER *et al.*, 2008).

Figura 7 - Variações anatômicas dos dutos pancreáticos mostrada pela perfusão de corante. Apenas 39% dos suínos exibiram comunicação entre o lobo conectivo e os lobos duodenal e esplênico. Tipo A: 31% com comunicação apenas do lobo esplênico para o lobo conectivo. Tipo B: 2,8% com comunicação entre lobo conectivo e lobo esplênico. Tipo C: 50% sem comunicação entre o lobo esplênico e o conectivo, mas com comunicação para o lobo duodenal. Tipo X: 11% difere dos tipos A, B e C.



Fonte: FERRER *et al.* (2008).

As artérias celíaca e mesentérica superiores suprem o pâncreas de modo que o lobo duodenal recebe o fluxo sanguíneo pela artéria pancreaticoduodenal superior, que é um ramo da artéria gastroduodenal; o lobo esplênico é provido pela artéria esplênica e pela artéria pancreaticoduodenal inferior, derivações da artéria mesentérica superior que também suprem o lobo conectivo e a ponte. A anatomia vascular do pâncreas suíno é mais eficiente através da aorta supra renal, correspondendo aos humanos, entretanto os dutos pancreáticos e suas ramificações podem ser amplamente variáveis, o que torna os lobos altamente incongruentes (FERRER *et al.*, 2008).

Dentre a literatura, a raça suína Landrace é a mais indicada para a utilização em xenotransplantes devido à sua maior densidade em volume de ilhotas pancreáticas (3,4%) se comparadas às demais (1 a 2%). De origem dinamarquesa, a

Landrace é a espécie suína mais produzida no Brasil. De pele branca e carne magra, podem chegar aos 300 Kg mas são abatidos quando atingem os 80 Kg, por volta dos 7 meses de vida. Apresentam excelente capacidade reprodutiva, por isso representam o maior número de matrizes (MARANGONI, 2019).

3.14 Agentes e técnicas de descclularização

Os *scaffolds*, matrizes extracelulares descclularizadas, são caracterizadas através de ensaios físico-químicos, mecânicos e biológicos produzidos para assegurar o seu bom desempenho como biomaterial natural.

3.14.1 Métodos físicos de descclularização

a) Congelamento: usado com frequência para descclularização de tecido tendinoso e ligamentar, e tecido nervoso. Durante a fase de congelamento, observa-se a contração e o aumento da densidade para a maioria das substâncias. Porém, a água exibe um comportamento diferenciado: ao invés de contrair ela expande-se a temperaturas mais baixas, uma vez que com a redução do movimento de suas moléculas ocorre o rearranjo estrutural em padrões hexagonais (dos cristais de gelo) intercalados por *gaps* (CHAPLIN, 2018).

Assim, diversos estudos têm utilizado essa propriedade de congelamento da água para romper as membranas celulares sem a necessidade de utilização de substâncias químicas para promover a quebra celular. Vale salientar que, geralmente, utiliza-se um crioprotetor em prol da manutenção da integridade estrutural da matriz extracelular, entretanto, ciclos de congelamento-descongelamento podem produzir alterações mecânicas consideráveis, uma vez que ao congelar-se rapidamente um tecido, formam-se cristais de gelo intracelulares que interrompem as membranas celulares e causam lise celular (GILBERT *et al.*, 2006).

b) Imersão e agitação: é uma das práticas mais comuns de descclularização, onde realiza-se a imersão do material numa solução química composta por detergentes em um agitador. O tempo de descclularização é diretamente proporcional ao

potencial de agitação, à disfunção mecânica das células, à concentração da solução, à densidade e composição do material (formulações empregadas para esôfagos são diferentes daquelas necessárias para traqueia, que apresenta cartilagem hialina). Alguns órgãos já descelularizados por meio dessa técnica foram bexiga (entre 1 e 2h), esôfago, traqueia (entre 12 e 72h), músculo esquelético, válvulas cardíacas, nervos periféricos, medula espinhal, cartilagem e pele (GILBERT *et al.*, 2006).

O mesmo objetivo pode ser alcançado por diferentes protocolos de combinações de detergente/enzimas desde que mantida a desoxirribonuclease (DNase) ou ribonuclease (RNase) para remover os resíduos de ácidos nucleicos (GILBERT *et al.*, 2006).

c) A pressão como um agente de descelularização: a imposição de um gradiente de pressão melhora a atuação dos agentes de lise celular ao mesmo tempo que expulsa os detritos celulares da MEC. Principalmente em relação a órgãos ocos como vasos sanguíneos e o trato intestinal. Entretanto há relatos na literatura de que em certos casos, enquanto houve manutenção da integridade estrutural de músculos lisos, ocorreu a destruição dos componentes da membrana basal. Porém a eficácia deste método é mais evidente para tecidos ou órgãos que não são caracterizados por matriz densamente organizada (por exemplo fígado, pulmão) ou para laminar camadas de tecido de órgãos com planos naturais de dissecação, como o intestino delgado e a bexiga urinária (GILBERT *et al.*, 2006).

Alguns protocolos sugerem o uso de pressões hidrostáticas altas em prol da redução ou eliminação dos produtos químicos, que são agressivos à estrutura matricial. Em alguns casos o uso de pressões altas apresenta-se mais eficaz na remoção do material celular do que o método de imersão em detergentes sob a pressão atmosférica normal. Porém, houveram casos mencionando os efeitos danosos da pressão em ambos colágeno e elastina, bem como a ocorrência da alteração das propriedades mecânicas dessas fibras. Entretanto, é sugerido que para a manutenção da estrutura nativa da matriz, deve evitar-se o congelamento associado ao às altas pressões hidrostáticas (GILPIN, 2017).

d) Fluidos supercríticos como um agente de descelularização: apresentam boas taxas de transporte com baixa viscosidade, permitindo protocolos de

descelularização curtos e simples. Uma de suas vantagens é a utilização de uma substância inerte (como por exemplo dióxido de carbono que atinge o ponto supercrítico a 7° C sob 7,4MPa) para a remoção do material celular com mínima alteração da MEC resultando num produto seco, embora alguns estudos sugerem que o dióxido de carbono cause a desidratação e fragilização da MEC. (CASALI, *et al.*, 2018).

3.14.2 Métodos biológicos e químicos

a) O efeito do pH na descclularização: o pH produz efeitos diferenciais em termos de preservação da matriz, remoção celular e resposta do hospedeiro. Uma solução com pH mais baixo suprime os danos à MEC, principalmente com relação à perda de GAG e o conteúdo de elastina, enquanto, apesar de não remover efetivamente o DNA, leva a uma menor resposta imunológica do hospedeiro - em estudos de implantes de curto prazo (TSUCHIYA *et al.*, 2014).

b) O efeito das bases alcalinas na descclularização: apesar de terem sido usadas na descclularização de tecidos densos como a pele e produzirem uma maior remoção do material genético, as bases alcalinas (hidróxido de amônio, hidróxido de sódio etc.) degradam componentes matriciais como as fibrilas de colágeno, alteram propriedades viscoelásticas, reduzindo as propriedades mecânicas da MEC (POORNEJAD *et al.*, 2016).

c) O efeito dos ácidos na descclularização: o uso de ácidos permite a solubilização do material citoplasmático e a perturbação do material genético. Entretanto, os ácidos também solubilizam colágeno, resultando na redução da resistência mecânica da MEC (GILPIN; YANG, 2017).

d) Detergentes aniônicos: são detergentes brandos que promovem a solubilização proteica dos componentes celulares ao mesmo tempo que mantêm as proteínas estruturais nativas da MEC e sua atividade enzimática. A taxa de eficiência é função da composição do material e da arquitetura a ser descclularizada, ou seja, é necessária a calibração em função da densidade do material. Um representante dessa classe é TritonX-100 (GILPIN; YANG, 2017).

e) Detergentes iônicos: são detergentes fortes capazes de solubilizar lípidos, membranas citoplasmáticas e desnaturar proteínas, como por exemplo o TritonX-200. Alguns estudos mencionam alguma desnaturação de colágeno e sua difícil remoção da matriz remanescente o que resulta numa influência negativa para a citocompatibilidade (GILPIN; YANG, 2017).

f) Detergentes zwitteriônicos: a carga elétrica líquida igual a zero nos grupos hidrofílicos de detergentes zwitteriônicos mantém as proteínas nativas durante o processo de descélularização. Detergentes como a sulfobetaína-10 (SB-10) e 16 (SB-16) são capazes de preservar a MEC mais eficientemente do que detergentes aniônicos enquanto produzindo uma remoção celular próxima a 95%. Entretanto, essa eficiência tem sido contestada visto que num estudo de descélularização de bexiga com detergente zwitteriônico (8 mM CHAPS) apresentou destruição da rede de colágeno muito maior do que outros detergentes iônicos e aniônicos (como o SDS 1% e o Triton X - 100 3%) (GILPIN; YANG, 2017).

Em prol da adequação dos métodos e processos de descélularização a serem empregados nesse estudo, produziu-se uma compilação dos diversos protocolos de descélularização presentes na literatura. A Tabela 2 em sequência permite o comparativo entre esses diferentes protocolos de descélularização de pâncreas relacionando os materiais e os métodos utilizados.

Tabela 2 - Comparativo entre os protocolos de descclularização de pâncreas em suínos e camundongos.

Quadro comparativo dos protocolos de descclularização					
Fontes	Decellularized pancreas as a native extracellular matrix scaffold for pancreatic islet seeding and culture (Damodaran, Vermette, 2018)	Engineering an endocrine Neo- Pancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans (NAPIERALA, 2017)	Cold-perfusion decellularization of whole-organ porcine pancreas supports... (ELEBRING <i>et al.</i> , 2017)	Endocrine pancreas engineered using porcine islets and partial pancreatic <i>scaffolds</i> (KATSUKI Y <i>et al.</i> , 2016)	Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pâncreas bioengineering (MIRMALEK <i>et al.</i> , 2013)
Animal	Camundongos	Camundongos fêmeas e machos pesando entre 150 e 400 g	Suínos jovens, 30-50Kg, heparinizados	Suínos fêmeas, 20-23Kg	Suínos jovens, 20kg, heparinizados intravenosamente
Excisão do órgão		Todos os órgãos explantados foram colocados em um béquer de 100 ml preenchido com tampão de Ringer-lactato frio e usado diretamente para descclularização	PBS (pH 7,4, 4°C) com heparina (17 UI/ml) através da veia porta (aorta e a veia porta colhidas juntamente com o pâncreas). Canulou-se uma extremidade da aorta e todas as outras saídas, exceto a veia porta, foram ligadas.	O pâncreas foi removido em bloco juntamente com o segmento duodenal superior. Removeu-se o duodeno e canulou-se via ducto pancreático principal e veia mesentérica superior.	Os pâncreas foram canulados via duto pancreático e veia mesentérica superior.
Metodologia	- Pâncreas injetado com PBS através do ducto pancreático no final do duodeno com uma agulha de calibre 26; - agulha presa junto com o pâncreas usando uma pinça hemostática;	Para evitar contaminação, o procedimento completo foi realizado sob condições estéreis em um gabinete de fluxo de ar laminar - Os pâncreas canulados foram ligados a um sistema de perfusão;	- 5 mM EDTA, 0,02% (m/v) azida sódica, água ultrapura, 4° C por 1h a 1,2 l/h em bomba peristáltica com degaseificador; - pâncreas congelados a -20° C em PBS com 5 mM EDTA, 0,02% azida sódica até o início da descclularização;	- O pâncreas foi lavado com PBS a 20 ml/min por 3-4h e congelado a -80°C por 24 h antes da descclularização; - os pâncreas foram descongelados e lavados com PBS a 20 ml/min por 6 h através do ducto pancreático principal para remover o sangue;	- 10 IU/ml heparina de sódio em PBS (8 g/l cloreto de sódio, 0,2 g/l cloreto de potássio, 1,15 g/l fosfato de sódio dibásico anidro, 0,2 g/l fosfato de potássio monobásico anidro em água deionizada);

<p>Metodologia</p>	<p>- o pâncreas foi montado em um sistema de circulação e perfundido continuamente com SDS estéril a 0,5% usando uma bomba peristáltica Masterflex® L/S Easy-Load II na vazão de 8 ml min⁻¹ por 12 h; - lavado com água Milli-Q estéril por 15 min; - perfundido com água Milli-Q com benzonase (90 IU/ml) por 15 min; - lavagem final com água Milli-Q por 15 min; - perfusão com PBS e 10% de FBS e mistura de penicilina/estreptomicina (10.000 Um/L) por 24 h; - perfusão final de MECD com 10% de SFB e penicilina/estreptomicina por 36 h.</p>	<p>- 1% Triton X - 100 perfundido a 10 ml/min. por 60 min através da veia porta; - 0,5% SDS perfundido por 120 min; - 1% Triton X-100 perfundido por 15 min a 10 ml/min; - órgãos enxaguados com PBS pH 7,4 a 2 ml/min por 4 h.</p>	<p>- após descongelamento gradual, conectado ao sistema de perfusão a 4°C, 1,2 l/h com água destilada, 5 mM EDTA, 0,02% azida sódica por 8h; - 4% (m/v) desoxicolato de sódio, 6% (v/v), Triton X-100, 0,4 mM PMSF por 8 h; - água destilada por 96 h, 40 IU/mL de DNase I desoxirribonuclease I em PBS com CaCl e MgCl por 4 h, 37°C; - 120 h de lavagem com água destilada. * Todas as soluções de descclularização continham 0,02% (m/v) azida sódica para prevenir o crescimento bacteriano. Os pâncreas descclularizados foram mantidos em PBS com 0,02% (m/v) azida sódica, a 4°C por curto período de tempo ou a -20°C por longo período de armazenamento.</p>	<p>- o pâncreas foi perfundido com tripsina a 0,05% a 20 mL/min durante 6 h; - enxaguado com PBS à mesmo taxa por 3 h; - descclularizado com 0,1% Triton X-100 e 0,05% EGTA por 24-36 h a 20 ml/min pelo ducto pancreático principal; - o pâncreas foi finalmente enxaguado com PBS por 12 h.</p>	<p>- o pâncreas foi perfundido com 1% Triton X-100 e 0,1% hidróxido de amônio - enxaguado com PBS a 0,75 l/h por 5 dias.</p>
---------------------------	--	--	---	--	--

3.14.3 Quantificação de material genético e proteico remanescente no *scaffold* após descelularização

Análise histológica

De acordo com Gui *et al.* (2009) as amostras descelularizadas devem ser fixadas em formol tamponado 10% (v/v) por 1 h, saturadas com parafina, seccionadas em lâminas de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina, HE; para estruturas nucleares, Tricômio de Masson, TM, para o colágeno, ou Elastina-van Gieson, EVG, para elastina. A membrana basal pode ser analisada pela coloração do colágeno IV por meio da encubação com anticorpo policlonal de coelho para colágeno, seguido do IgG de cabra anti-coelho conjugada com FITC. As lâminas são então contrastadas com DAPI e observadas em um microscópio invertido equipado com AxioCam HR e software AxioVision Versão 4.5.

3.14.4 Caracterizações físico-químicas e mecânicas para análise de integridade estrutural do *scaffold*

Liofilização

Em prol da formação ou do aperfeiçoamento das imagens produzidas pela microscopia eletrônica, é necessário o revestimento das amostras biológicas com uma camada condutora de metal. Além de se tornarem perceptíveis ao feixe de elétrons do microscópio, essa camada de revestimento inibe cargas estáticas, reduz os danos térmicos e melhora o sinal do elétron secundário necessário para o exame topográfico no Microscópio Eletrônico de Varredura, MEV. A técnica de revestimento utilizada é baseada na resolução e aplicação desejadas, uma dessas técnicas é a liofilização (LEICA-MICROSYSTEMS, 2013).

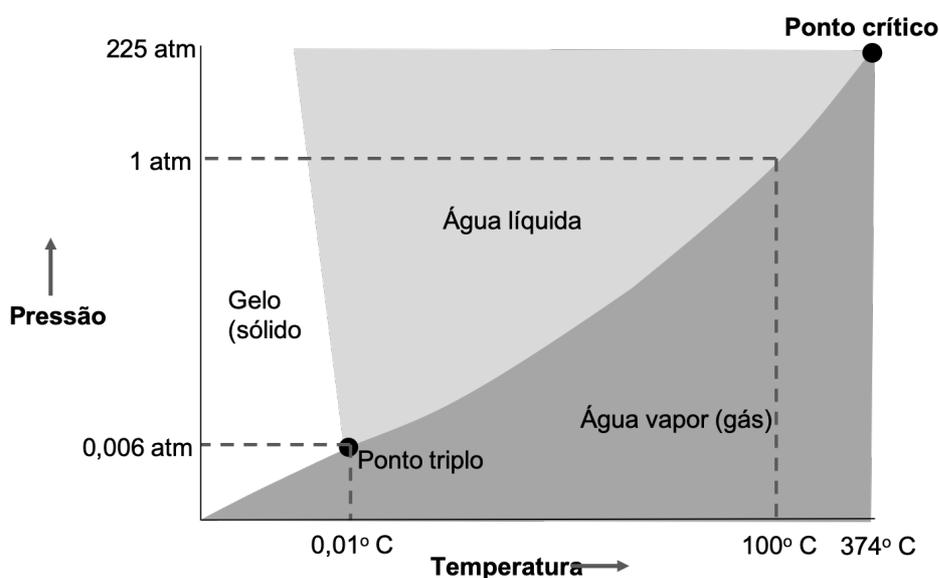
A liofilização é um processo de desidratação normalmente utilizado para preservar materiais perecíveis, prolongar a vida útil ou tornar o material mais conveniente para o transporte. A liofilização funciona em 3 fases principais onde o material é congelado – fase mais crítica, a pressão é reduzida e depois o material é

aquecido para permitir que a água congelada no material seja sublimada (KEANE, 2015).

O congelamento pode ser feito com nitrogênio líquido, em um freezer ou em uma prateleira no próprio liofilizador. O resfriamento do material abaixo do seu ponto triplo, Figura 8, garante que a sublimação ocorrerá ao invés da fusão, preservando a forma física do material. Esse processo é um tanto mais fácil de realizar usando grandes cristais de gelo que podem ser produzidos por congelamento lento ou outros processos (Drug Development & Delivery, 2018).

Para materiais biológicos, é necessário evitar a produção de cristais de gelo muito grandes capazes de romper as estruturas celulares. Opta-se então pelo congelamento rápido. Para materiais que tendem a precipitar-se, permite-se o crescimento dos cristais, também pelo método do congelamento rápido (FDA, 2019).

Figura 8 – Ponto triplo



Fonte: Drug Development & Delivery (2018)

A secagem primária, ou sublimação, é a segunda fase da liofilização, na qual a pressão é reduzida e o calor é lentamente adicionado ao material. O vácuo acelera a sublimação e o condensador frio fornece uma superfície para o vapor de água aderir e solidificar, além de proteger a bomba de vácuo do vapor d'água. Cerca de 95% da água no material é removida nesta fase.

A terceira fase da liofilização é a secagem secundária, ou adsorção, onde eleva-se a temperatura acima da temperatura da fase de secagem primária para que as ligações entre a água molecular e o material sejam ionicamente removidas.

Os materiais liofilizados retêm uma estrutura porosa. Após o processo de liofilização, o vácuo pode ser quebrado com um gás inerte antes que o material seja selado. A maioria dos materiais podem ser secos a 1-5% de umidade residual (FDA, 2019).

3.14.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Para analisar a morfologia da superfície dos *scaffolds*, utiliza-se a análise em microscopia eletrônica de varredura, MEV. Essa microscopia fornece imagens topográficas de alta ampliação e resolução por meio da transcodificação da energia emitida por um feixe de elétrons de pequeno diâmetro que interage com a superfície da amostra. Na configuração mais tradicional, a emissão é termoiônica por um filamento de tungstênio: o filamento é aquecido pela passagem de uma corrente, e representa o cátodo pelo qual são emitidos elétrons de energia controlada. Para varrer a superfície, o feixe primário será corrigido e direcionado por lentes eletromagnéticas antes de atingir a amostra (GOODHEW; HUMPHREYS, 2000).

A emissão prevaiente é a de elétrons secundários de baixa energia, que fornece informações sobre a morfologia; e dos elétrons retroespalhados por espalhamento elástico, que mostram a diferença de densidade pelo número atômico - permitindo, por exemplo, a análise de contraste químico. À medida que os elétrons penetram na matéria eles passam a se difundir aleatoriamente (GOODHEW; HUMPHREYS, 2000).

Cada um dos sinais gerados pela interação do feixe com a amostra requer um detector adequado. O limite de resolução do equipamento é então determinado pelo diâmetro da região da amostra que, excitado pelo feixe primário, emite o sinal considerado (GOODHEW; HUMPHREYS, 2000).

3.14.4.2 Calorimetria de varredura diferencial – DSC

As macromoléculas e agregados macromoleculares (> 5000 Daltons), como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, podem formar estruturas bem definidas que

suportam mudanças conformacionais induzidas termicamente. Essas reorganizações estruturais resultam na absorção do calor causado pela redistribuição de ligações não covalentes. Os calorímetros de varredura diferencial medem essa absorção de calor (DUROWOJU *et al.*, 2017).

Uma biomolécula apresenta um equilíbrio entre suas conformações nativas (dobradas) e desnaturadas (desdobradas), quanto maior o ponto médio de fusão (T_m), mais estável é a molécula. A DSC mede a entalpia (ΔH) de desdobramento associada à desnaturação térmica e também à alteração na capacidade térmica (ΔC_p) da desnaturação. A DSC explica os fatores associados ao dobramento e à estabilidade de biomolecular associadas às forças das interações intermoleculares (entropia, hidrofobicidade, ligações de hidrogênio etc.) (DUROWOJU *et al.*, 2017).

Assim, a calorimetria de varredura diferencial é usada para caracterizar a estabilidade de uma proteína ou biomolécula em sua forma nativa por meio da determinação da variação de calor associada à desnaturação da molécula quando aquecida a uma taxa constante (DUROWOJU *et al.*, 2017).

O ensaio inicia-se com o preenchimento do cadinho de amostra com a amostra seca enquanto o cadinho de referência permanece vazio. Ambos são aquecidos juntos a uma taxa de varredura constante. A desnaturação da proteína causa uma diferença de temperatura (ΔT) entre os cadinhos, resultando em um gradiente térmico pelas unidades Peltier e a absorção de calor. Isso define uma voltagem, que é convertida em potência, e que é usada para controlar o Peltier para retornar o ΔT (o diferencial de temperatura) para 0° C. Opcionalmente, os cadinhos podem também atingir o equilíbrio térmico passivamente por meio da condução (DUROWOJU *et al.*, 2017).

A área abaixo do pico de DSC é a entalpia de desdobramento de proteínas em concentração normalizada e tem unidades de calorias (ou joules) por mole. Em determinados casos, os modelos termodinâmicos podem ser ajustados aos dados para obter a energia livre de Gibbs (ΔG), a entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}), a entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}), a entropia (ΔS) e a mudança da capacidade de calor (ΔC_p) associada à transição (DUROWOJU *et al.*, 2017).

3.14.4.3 Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier - ATR-FTIR

Com o ATR-FTIR mede-se a capacidade da substância para absorver, transmitir, ou refletir radiação de infravermelho, IR. Essa técnica é implementada em estudos biológicos porque é capaz de sondar *in situ* camadas únicas ou múltiplas de espécies adsorvidas/depositadas em uma interface sólido/líquido. O acessório ATR opera medindo as mudanças que ocorrem em um feixe IR, direcionado para um cristal opticamente denso com um alto índice de refração em um determinado ângulo. A refletância interna cria uma onda evanescente que se estende além da superfície do cristal até a amostra mantida em contato com o cristal (THERMOFISHER, 2019).

A onda evanescente será atenuada nas regiões do espectro de IR onde a amostra absorveu energia. Após o feixe atenuado retornar ao cristal e ao detector do espectrômetro de IR, há registro de um sinal de interferograma, que é usado para gerar um espectro IR (THERMOFISHER, 2019).

3.14.4.4 Microtomografia de raios X – microCT

A microtomografia computadorizada, microCT, é uma imagem de raio-x em 3D, pelo mesmo método usado em tomografia computadorizada ou CAT, porém em pequena escala com resolução maciçamente aumentada. Representa a microscopia 3D, onde a estrutura interna de objetos em escala muito fina é representada de forma não destrutiva. Sem preparo de amostras, sem manchas, sem cortes finos - uma única digitalização fará a imagem da estrutura 3D completa da amostra em alta resolução (BRUKER, 2019).

O funcionamento baseia-se na amostra, sobre um disco giratório, ser iluminada com uma fonte de raios-X por um microfoco enquanto um detector de raios-X planar coleta as imagens de projeção ampliadas. Enquanto a amostra gira, centenas de visualizações angulares são adquiridas. O computador então sintetiza uma pilha de fatias de seção transversal virtual através do objeto e permite a manipulação das seções cruzadas de modo que a interpolação dessas seções ao longo de diferentes planos permita a inspeção da estrutura interna e a seleção volumes de interesse, simples ou complexos (BRUKER, 2019).

Os métodos de descelularização impactam a resposta dos hospedeiros aos *scaffolds* biológicos, e podem oferecer forte toxicidade ao crescimento celular. Embora seja impossível eliminar todos os componentes celulares, tais como DNA, mitocôndrias, membranas lipídicas e proteínas citosólicas, as técnicas de caracterização permitem a quantificação de diversos critérios, que abrangem desde a reminiscência de componentes celulares no *scaffold* até a retenção de sua estabilidade estrutural.

A Tabela 3 a seguir oferece um comparativo entre os processos de caracterização empregados nos diferentes protocolos estudados.

Tabela 3 - Comparativo de Caracterizações para Descelularização

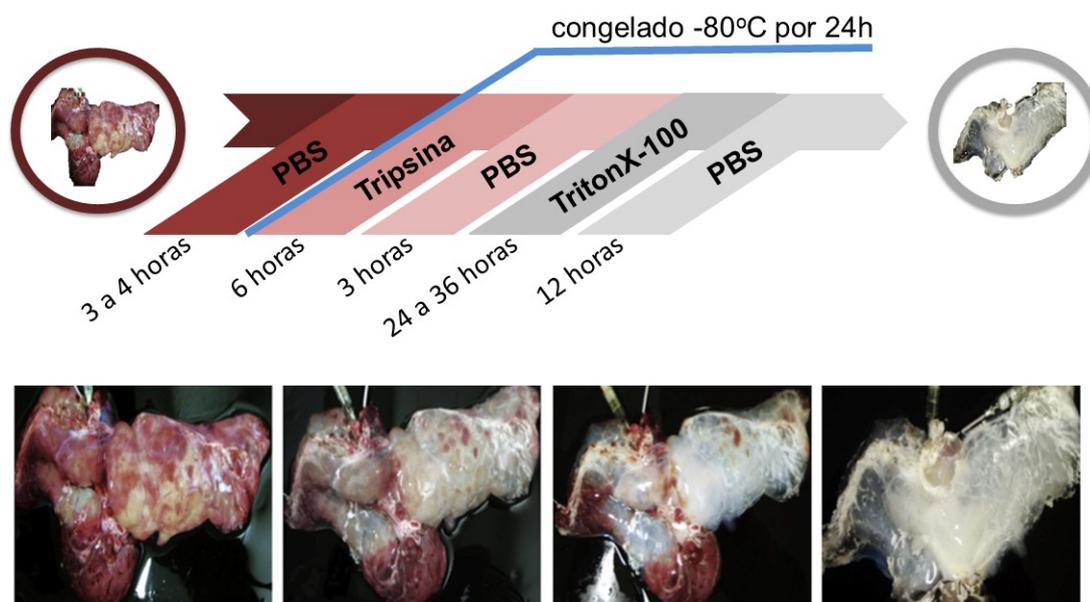
Artigo	Órgão	Técnica	Resultado
Whole Organ Decellularization - A Tool for Bioscaffold Fabrication and Organ Bioengineering BAPTISTA <i>et al.</i> (2009)	fígado rim pâncreas intestino	Fluoroscopia de Raios X HE Imunohistoquímica	Confirmou que os canais vasculares estavam intactos e acelularidade endotelial
Decellularization of Human and Porcine Lung Tissues for Pulmonary Tissue Engineering O'NEILL <i>et al.</i> (2013)	Pulmão (suíno e humano)	DNA - Quant-iT, HE, Fluorescência Colágeno - Sircol Azul dimetileno (sGAG), MEV, Imunohistoquímica Teste mecânico com célula de carga	MECD suína como um substituto adequado e prontamente disponível para pesquisa e aplicações de engenharia de tecido pulmonar humano
Whole-organ tissue engineering: Decellularization and recellularization of three-dimensional matrix liver scaffolds SABETKISH <i>et al.</i> (2015)	Fígado (camundongo e ovelha)	HE, Imunohistoquímica DAPI Análise bioquímica MEV, Teste de torção Ressonância magnética e angiografia Quantificação de DNA	Preservação das propriedades biomecânicas
Evaluation of different decellularization protocols on the generation of pancreas-derived hydrogels. GAETANI <i>et al.</i> (2018)	Pâncreas (suíno)	HE, Corante Hoescht Quantificação de DNA residual, Ensaio de gelificação, (sGAGs) Espectroscopia de massa	Retenção de todas as classes de proteínas presentes no tecido nativo.
Endocrine pancreas engineered using porcine islets and partial pancreatic scaffolds. KATSUKI <i>et al.</i> (2016)	Pâncreas (suíno)	HE Imunohistoquímica Molde de corrosão	Método minimamente disruptivo para descelularização de órgão inteiro em um modelo animal de grande.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e equipamentos utilizados na etapa inicial do protocolo de Katsuki *et al.* (2016)

O presente estudo baseou-se inicialmente no protocolo de descelularização proposto por Katsuki *et al.* (2016), o qual é representado esquematicamente na Figura 9.

Figura 9 – Sequência da descelularização de pâncreas suíno por perfusão retrógrada. As imagens mostram quatro fases da descelularização que não estão relacionadas à escala temporal ilustrada abaixo.



Fonte: Adaptado de KATSUKI (2016)

. Os materiais e os métodos empregados foram adaptados à realidade e recursos locais. Assim: os suínos fêmeas LWD (raça mista de Landrace, Large White e Duroc) entre 20-23 Kg foram substituídos por suínos da raça Duroc Jersey; e o Midazolam 0,2 mg/Kg e a Medetomidina 0,08 mg/Kg não foram utilizados, uma vez que os tecidos animais obtidos representavam subprodutos originários de animais já abatidos pela indústria de corte suína local.

4.2 Seleção e preparação de tecidos

À priori, evisceração no abatedouro iniciou-se pela abertura do abdômen e exposição das vísceras dos suínos. Nesse momento foi realizada uma inspeção do Serviço de Inspeção Federal (S.I.F.), vinculado ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) para avaliação e a verificação de eventuais problemas de doença pela averiguação de órgãos internos e integridade corporal dos animais abatidos. Caso detectada alguma anormalidade fundada em doenças ou maus tratos, esses animais são imediatamente retirados da linha de abate e enviados para local onde realiza-se um diagnóstico mais detalhado. Para os suínos que seguem o trânsito normal na linha de abate, ocorre a retirada dos órgãos e vísceras abdominais (coração, fígado, intestinos grosso e delgado, pâncreas, etc.), e a lavagem com água sob pressão. Esse é o ponto de obtenção das vísceras, as quais foram coletadas e preparadas para transporte (ROSA, 2019).

Doze pâncreas de porcos fêmeas da raça Duroc Jersey (14 semanas, com cerca de 70-95 Kg) obtidos de um abatedouro local (Frigo Rita, Itaguara/MG), foram excisados em bloco com o segmento duodenal superior e o baço. Os órgãos frescos foram acondicionados em sacos plásticos individuais preenchidos com gelo e transportados, por um período inferior a 60 minutos, dentro de caixas térmicas para o laboratório de Bioengenharia da UFMG, LabBio.

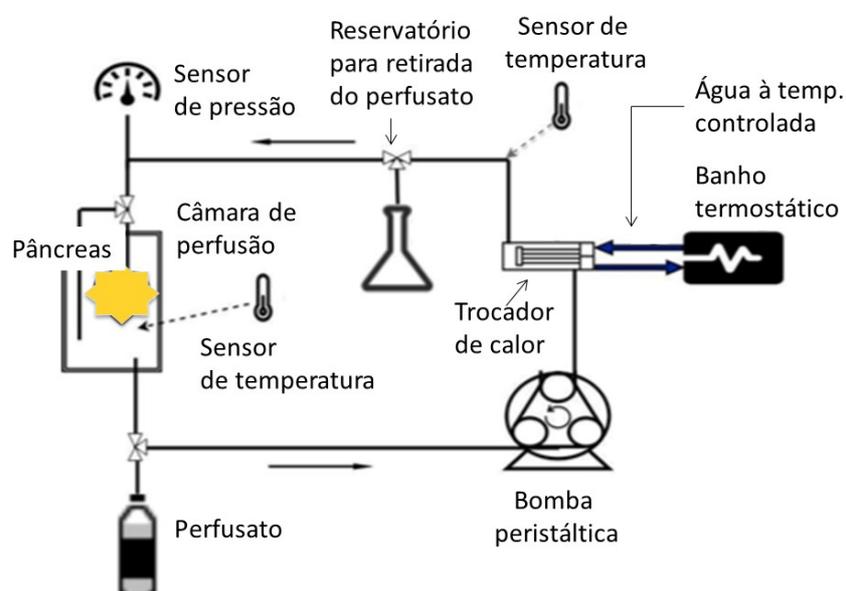
Excetuando-se os vasos e artérias que irrigam o pâncreas a partir do duodeno, todos os demais foram cuidadosamente dissecados e ligados com fio de sutura agulhado em Nylon 4-0 (Procare, Brasil) antes de serem removidos dos órgãos adjacentes - como o estômago, fígado, tecido mesentérico e intestinos. Após a sutura da artéria esplênica, o baço foi removido e o duodeno, após enxague do seu conteúdo, foi suturado em ambas as extremidades.

A preparação do pâncreas foi executada delicadamente, a fim de prevenir danos vasculares e teciduais, com uma duração média para o procedimento de 2 h por unidade. Após aparar a glândula, o peso médio foi (383 ± 84) g, para uma faixa de peso total dos distintos pâncreas situada entre 271 a 554 g. A artéria esplênica foi canulada com BD Asepto 21G (BD Medical, Brasil) e conectada ao sistema de perfusão descrito a seguir.

4.3 Sistema de perfusão por bomba peristáltica

A Figura 10 permite entender o esquema do sistema de perfusão utilizado neste estudo.

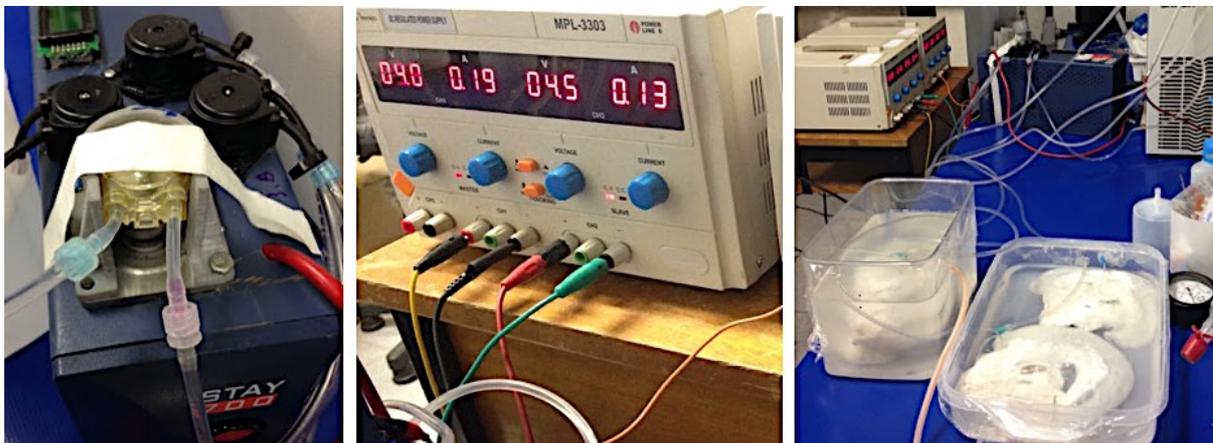
Figura 10 – Esquema ilustrando o sistema de perfusão composto por uma bomba peristáltica e banho termostático utilizado para descelularização de pâncreas suínos.



Fonte: HANIEL (2016)

O sistema de perfusão desenvolvido por Haniel (2016), e ilustrado pelas Figuras 10 e 11, é composto por uma bomba peristáltica (LabBio/UFMG, Brasil) e um termostato de aquecimento e resfriamento Eco Gold (LAUDA, Alemanha). As soluções de perfusão foram mantidas em vazão controlada de 8 ml/min (KATSUKI *et al.*, 2016). A pressão de perfusão foi monitorada e mantida na média ($3,4 \pm 0,8$) kPa durante o procedimento. A temperatura foi mantida constante a 4° C (ELEBRING, 2017) durante todo o processo de descelularização.

Figura 11 – Vista geral do sistema de perfusão por bomba peristáltica utilizado para descélularização de pâncreas suínos. (a) Bomba peristáltica. (b) Fonte reguladora de velocidade de perfusão. (c) Sistema de perfusão triplo.



Fonte: Autor (2019)

4.4 Aprimoramento da tecnologia de descélularização

Com a bomba peristáltica previamente regulada, o primeiro ciclo de perfusão enxaguou o sangue dentro da vasculatura do pâncreas suíno por perfusão retrógrada com PBS pH 7,4 (cloreto de sódio 8,2 g/L [Sulfal Química Ltda., Belo Horizonte, Brasil], 1,1 g/L de fosfato de sódio anidro dibásico [Neon, São Paulo, Brasil], 0,4 g/L de fosfato de sódio anidro monobásico [Sulfal Química Ltda., Belo Horizonte, Brasil]) (USP, 2019), 0,02% (p/v) de azida sódica (Química Moderna, São Paulo, Brasil) (MIRMALEK-SANI *et al.*, 2013; ELEBRING *et al.*, 2017) e 0,4 mg Clexane (Sanofi Aventis, Brasil) em água bidestilada a 8 ml/min por 2 h.

A solução de descélularização foi constituída de 0,5% (v/v) Triton X-100 (Neon, São Paulo, Brasil), 0,05% (v/v) hidróxido de amônio (Química Brasileira Ltda., Belo Horizonte, Brasil), 0,25% (v/v) EDTA (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), PBS pH 7,4 e 0,02% azida sódica. O tempo de lavagem foi relativo ao tamanho do órgão e variou entre 14 h (para o menor) e 28 h (para o maior), seguido de um enxágue que variou entre 48–96 h com água bidestilada para remover os restos celulares remanescentes. O *scaffold* descélularizado resultante foi armazenado em PBS pH 7,4 com 0,02% azida sódica sob refrigeração a 4°C.

O protocolo de descelularização utilizado foi uma versão modificada da sugerida por Katsuki *et al.* (2016), uma vez que de acordo com a Resolução RDC de 26 de outubro de 2010 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, a disponibilidade de penicilina está atrelada à prescrição médica. Sendo assim, utilizou-se a azida sódica, um substituto adequado e já empregado em outros protocolos de descelularização (ELEBRING *et al.*, 2017).

A azida sódica (NaN_3) é um forte inibidor metabólico da cadeia respiratória, que coíbe o crescimento microbiano e atividades microbianas distintas, tais como a degradação, oxidação, etc. A azida sódica é utilizada para o preparo de controles abióticos sem produzir alterações físico-químicas nas matrizes (CABROL *et al.*, 2016).

4.5 Análise histológica

Para o preparo das lâminas histológicas de HE segmentou-se amostras retangulares de 3x2 cm de ambos os lobos duodenais, conectores e esplênicos do pâncreas controle nativo e descelularizado. As amostras foram inseridas em tampão formalina a 10% (Sigma-Aldrich, Brasil) pH 7,5 por 12 h e em etanol (Sigma-Aldrich, Brasil) a 70% para armazenamento até o processamento padrão para produção de lâminas histológicas HE e MT utilizado pelo Laboratório do Sistema Linfóide e da Regeneração (Departamento de Morfologia, UFMG, Brasil).

Subsequentemente, as lâminas histológicas foram fotografadas no Laboratório de Imunologia e Mecânica do Pulmão (Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG, Brasil).

4.6 Preparação das amostras - Liofilização

Oito amostras de tecido nativo e oito amostras de *scaffolds*, previamente conservadas em PBS pH 7.4 com azida sódica, foram seccionadas em cubos de aproximadamente $1 \times 1 \times 0,5 \text{ cm}^3$ e mergulhadas em nitrogênio líquido para congelamento rápido. As amostras foram acondicionadas individualmente em recipientes plásticos dentro do liofilizador de piso modelo Liotop K105 (Bélgica, Brasil) mostrado na Figura 12 (Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG).

Figura 12 – Liofilizador de piso modelo Liotop K105



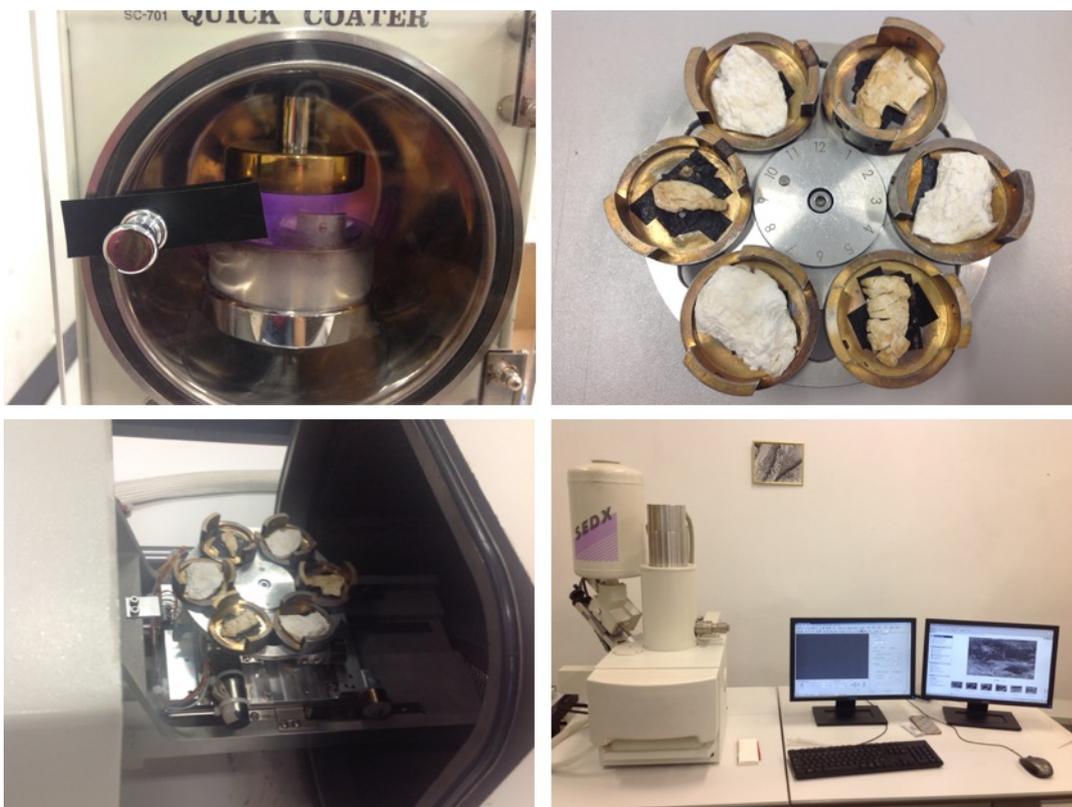
Fonte: IRIS P&T (2019)

Submetendo as células a congelamento rápido e super-rápido (velocidade de 100° C/s) a água intracelular e pericelular passa do estado líquido para o sólido formando cristais de gelo diminutos, processo denominado vitrificação. Com velocidade de congelamento baixa (-1° C/min) a amostra perde água por efeito osmótico e a célula apresentará deformações ficando enrugada e distorcida (GROSS, 2014).

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV, com Espectroscopia de Energia Dispersiva - EDS

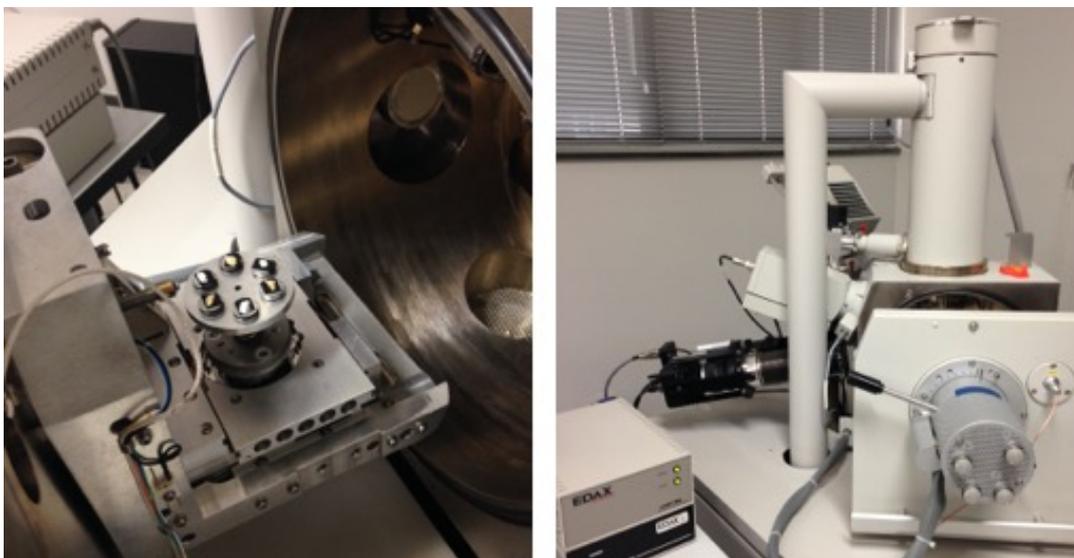
Os equipamentos para obtenção de imagem topológica utilizados foram o microscópio eletrônico de varredura modelo Superscan SSX-550 SEM-EDX (Shimadzu, Japão) lotado no Laboratório de Caracterização e Microscopia do CEFET-MG Campus I e mostrado na Figura 13; e o modelo Jeol JSM-6360LV lotado no Laboratório de Microscopia DEMET da Escola de Engenharia da UFMG mostrado na Figura 14.

Figura 13 – MEV das amostras de tecido nativo e *scaffold*, CEFET-MG: (a) Processo de metalização das amostras nativas e *scaffold*; (b) Amostras afixadas ao porta-amostras e *stub*; (c) Amostras ajustadas à melhor orientação em relação ao feixe de elétrons e ao coletor; (d) Estação de trabalho para análise dos dados obtidos



Fonte: Autor (2019)

Figura 14 – MEV das amostras de tecido nativo e *scaffold*, UFMG. (a) Porta amostras; (b) Visão geral do aparelho.



Fonte: Autor (2019)

Os segmentos da amostra foram cortados em fragmentos abertos de $2,5 \times 2,5 \times 0,5 \text{ cm}^3$ e liofilizados por 48 h. Então as amostras secas foram metalizadas com uma fina camada (com até 20-30 nm de espessura) por aspersão com ouro, *sputtering*, para aumentar a condutividade da superfície da amostra. Neste sistema, o ouro é removido de um eletrodo maciço, por bombardeamento com íons pesados de argônio, e deposita-se sobre todas as reentrâncias e proeminências da superfície da amostra. Embora seja possível usar evaporação térmica em alto vácuo, o sistema de *sputtering* é mais eficiente. Além de ouro, alguns materiais podem necessitar de uma cobertura adicional com carbono, obtida no evaporador convencional de alto vácuo. Após a metalização, a amostra está pronta para ser examinada no MEV (GROSS, 2014).

A microscopia eletrônica foi realizada no Laboratório de Caracterização e Microscopia do CEFET-MG em um aparelho Superscan SSX-550 SEM-EDX (Shimadzu, Japão) e no Laboratório de Microscopia da UFMG em um aparelho Jeol JSM-6360LV (Jeol Usa Inc., EUA), a uma tensão acelerada de 10 kV com espectroscopia de energia dispersiva, EDS (Noran Quest, ThermoFisher Scientific, EUA) acoplada ao microscópio Jeol. Os tecidos nativos e descelularizados foram cortados em amostras de 1 cm^3 e rapidamente congelados em nitrogênio líquido,

liofilizados (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG, Brasil) e montados em cadinhos de alumínio com fita adesiva de carbono.

4.8 Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infravermelho com Transformada de Fourier - ATR-FTIR

Os espectros de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ de tecidos nativos liofilizados ($0,022 \pm 0,016$) g e descelularizados ($0,015 \pm 0,005$) g foram coletados por um IRAffinity-1 DSC (Shimadzu, Japão) no Laboratório de Biocombustíveis (DEMEC UFMG, Brasil). O modo ATR utilizou uma superfície de cristal de diamante como elemento de reflexão com incidência de 45° a uma resolução de 4 cm^{-1} .

4.9 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

Amostras individuais liofilizadas pesando ($0,01 \pm 0,003$) g foram colocadas em painéis de alumínio, ao lado de painéis vazias para servir de referência. O teste foi realizado em painéis não herméticos com faixa de aquecimento de 30° e 250° C/min e taxa de aquecimento de 10° C/min fornecida pelo DSC-60 (Shimadzu, Japão) mostrado pela Figura 15.

Figura 15 - DSC 60 no Laboratório de Caracterização e Microscopia CEFET-MG



Fonte: Autor (2019)

4.10 Microtomografia de Raios X – micro-CT

A análise de microtomografia foi realizada no Laboratório de Biomateriais da Escola de Engenharia (DEMET UFMG, Brasil) em um equipamento SkyScan 1174 (Bruker micro-CT, Bélgica), utilizando tensão de 40 kV, corrente de 800 μ A e tamanho de pixel de 17,18 μ m, sem filtro. Amostras nativas e descelularizadas liofilizadas foram colocadas em uma mesa giratória e as imagens foram adquiridas a cada 0,7°. As projeções obtidas (formato TIFF de 16 bits) foram reconstruídas em camadas 2D usando o software NRecon (Skyscan, Bruker micro-CT, Bélgica). A análise tridimensional foi realizada utilizando o software CTAn (Skyscan, Bruker micro-CT, Bélgica) e as imagens dos modelos 3D foram geradas no software CTVol (Skyscan, Bruker micro-CT, Bélgica).

4.11 Testes Mecânicos de Tensão/Deformação

As propriedades mecânicas dos tecidos nativos e descelularizados foram comparadas pela máquina universal de ensaios Instron/EMIC-DL3000 no Laboratório de Materiais da Escola de Engenharia (DEMET UFMG, Brasil). Utilizou-se uma célula de carga Trd 20, Extensômetro Trd 15 e Software Tesc 3.01.

As amostras, previamente conservadas em PBS com azida sódica, foram seccionadas transversalmente em 30x10x2 mm³, e selecionadas aleatoriamente dentre os lóbulos conectivos, duodenais e esplênicos. As duas extremidades das tiras foram presas às garras conectadas às células de carga com uma lixa nº 80 (Norton, Brasil), enrolada em fita adesiva para evitar o deslizamento, e montadas na Instron. As medições foram realizadas estirando-se as amostras à temperatura ambiente até sua ruptura numa taxa de deformação de 3 mm/min e com um espaçamento inicial de 30 mm entre as garras, conforme mostrado na Figura 16.

Testou-se 3 amostras para cada lobo pancreático para ambos, tecido nativo e *scaffold*, perfazendo um total de 18 amostras.

Figura 16 – Ensaio de tração Instron/EMIC-DL3000 no Laboratório de Materiais DEMET UFMG



Fonte: Autor (2019)

4.12 Estatísticas

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados pelo teste *t-Student* para significância e considerados significativamente diferentes se $p < 0,05$ (BALESTRINI *et al.*, 2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo baseou-se inicialmente no protocolo de descelularização proposto por Katsuki *et al.* (2016), porém, limitações técnicas acarretaram mudanças para que o protocolo nos possibilitasse atingir o grau de descelularização alcançado por eles. Tais mudanças, que inclusive levaram à redução de custos e materiais, foram a utilização de pâncreas frescos obtidos em abatedouros, a introdução da azida de sódio em substituição à penicilina, a descelularização dos tecidos pancreáticos sob temperatura controlada e a utilização do hidróxido de amônio na solução detergente.

A principal estratégia de escolha do protocolo de descelularização era introduzir a menor quantidade de perturbação possível na MEC, sempre assegurando de que danos à estrutura do colágeno deveriam ser extremamente limitados. Através da análise de diversos protocolos (COOPER *et al.*, 2018; SENSINI; CRISTOFOLINI, 2018; ELEBRING *et al.* 2017; KATSUKI *et al.*, 2016; MAGHSOUDLOU *et al.*, 2016; KAJBAFZADEH *et al.*, 2015; KEANE *et al.*, 2015; GUYETTE *et al.*, 2014; MORONI; MIRABELLA, 2014; GOH *et al.*, 2013; MIRMALEK *et al.*, 2013; BARAKAT *et al.*, 2012; KEANE *et al.*, 2012; SHERIDAN *et al.*, 2012; CRAPO *et al.*, 2011; GILBERT *et al.*, 2006), Triton X-100, EDTA e hidróxido de amônio apresentaram boas vantagens em relação à remoção e preservação das propriedades mecânicas. Além de ser um agente quelante, Maghsoudlou *et al.* (2016) argumentaram que a adição de EDTA pode atuar na reticulação de colágeno, produzindo uma matriz mais densa que favorece a repopulação celular.

O hidróxido de sódio melhora a atuação do detergente por meio de quebra alcalina. O Triton X-100 age solubilizando a membrana celular enquanto o hidróxido de sódio rompe as ligações de hidrogênio entre as bases do DNA, convertendo o DNA de fita dupla, dsDNA (do inglês *double stranded DNA*), em DNA de fita simples, ssDNA (do inglês *single stranded DNA*). Já o EDTA sequestra os íons Mg^{++} que protegem a estrutura celular das enzimas de degradação do DNA. Entretanto, a adição de solução alcalina (com pH próximo de 12) à descelularização promove um entumescimento resultante da carga negativa induzida no colágeno da matriz, causando uma redução da viscoelasticidade e da parcela de GAGs intrínseca ao tecido (GILPIN; YANG, 2017). Assim, utilizou-se o hidróxido de amônio, uma base mais suave que o hidróxido de sódio.

Um dos alvos imediatos da descelularização é preservar a estrutura do órgão nativo para que o *scaffold* possa atuar como um substrato para o crescimento celular em prol da geração de um órgão funcional. Proteínas integrantes da membrana basal da MEC como o colágeno, elastina, lamininas, fibronectina e GAGs, glicosaminoglicanos, desempenham um papel fundamental na adesão, na diferenciação das células introduzidas por recelularização e na integridade mecânica do órgão. Os GAGs, além de ajudar a controlar o movimento celular e macromolecular ligando os fatores de crescimento e citocinas através da lâmina basal, também sequestram água por meio da produção de forças repulsivas com suas “caudas” negativamente carregadas (TSUCHIYA *et al.*, 2014)

Tsuchiya *et al.* (2014) discutem que a utilização de solução detergente com pH acima de 8, enquanto aumenta a eficiência da descelularização por meio da desnaturação do DNA em fita única (o que ocorre por volta do pH 12), reduz drasticamente a preservação global da matriz. O meio alcalino atua solubilizando os GAGs intrínsecos à matriz e conseqüentemente comprometendo a integridade mecânica do *scaffold*; leva à depleção de elastina, gerando, após o implante, a degradação do tecido por calcificação, e ainda degrada as membranas basais vasculares devido à menor retenção de laminina e fibronectina.

Surpreendentemente, estudos de *scaffolds* implantados revelaram que uma faixa de DNA residual presente após métodos de descelularização pode ou não induzir uma resposta imunológica no hospedeiro, porém esta resposta será muito menos severa do que a observada nos casos de descelularização completa às custas da extenuação da matriz extracelular. Ou seja, a minimização da resposta do hospedeiro é mais dependente de um arcabouço intacto (MACCHIARINI *et al.*, 2008).

A preferência pela utilização de pâncreas frescos ao invés de congelados a -80° C deveu-se à possibilidade da formação de gelo extracelular e desidratação da matriz; com conseqüente o efluxo de água durante o descongelamento. Cristais de gelo extracelulares podem causar danos mecânicos à MEC e nem todos os órgãos e tecidos toleraram gelo extracelular (LU *et al.*, 2012). Gilpin e Yang (2017) relatam que embora os conteúdos colágenos, de GAGs e a resistência mecânica sejam similares ao do tecido nativo, lâminas matriciais de fibroblastos descelularizados retiveram 88% de seu material genético nativo.

O controle de temperatura à 4° C seguiu o protocolo sugerido por Elebring *et al.* (2017), que visavam a maximização da preservação da ultraestrutura da matriz

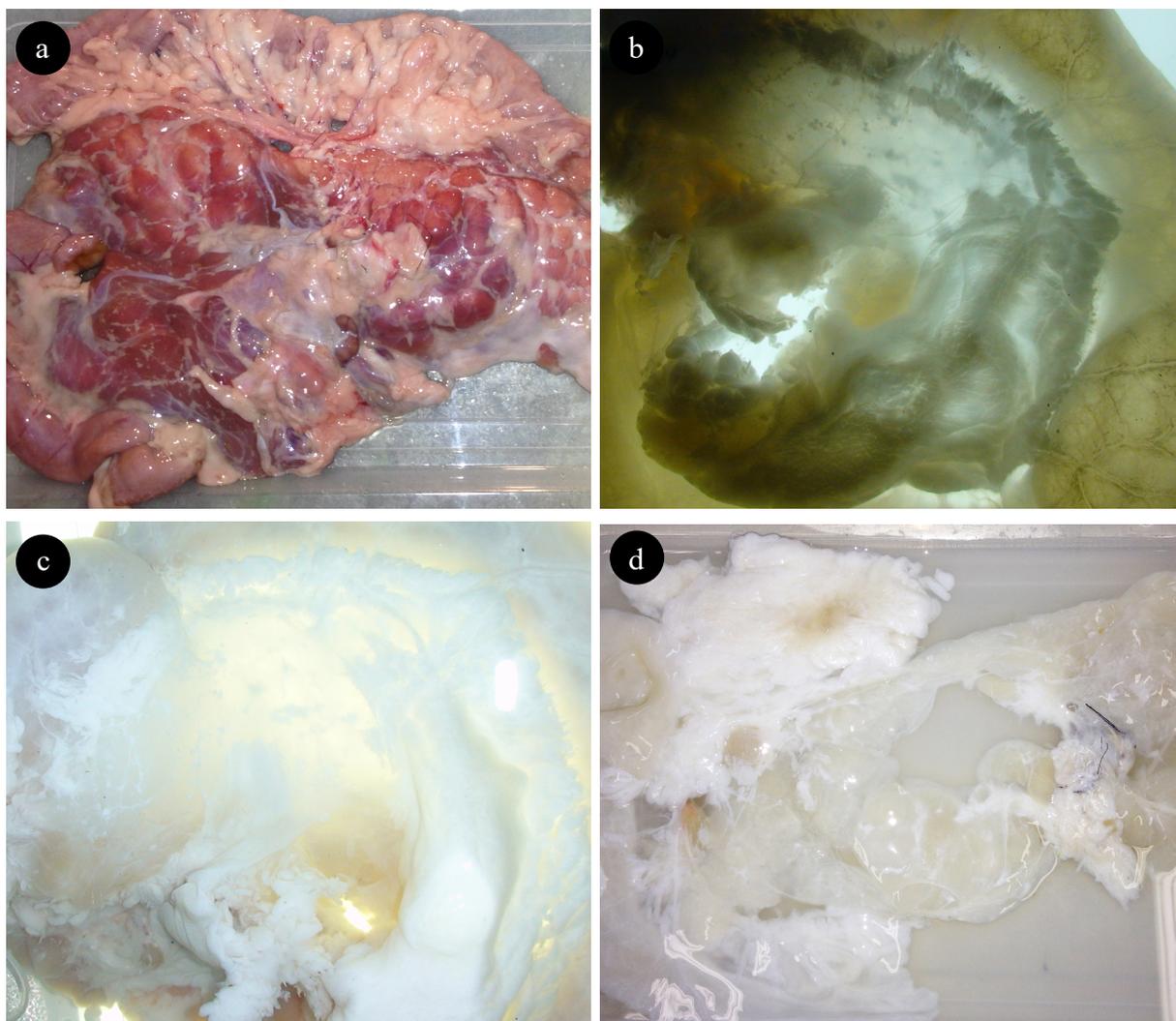
extracelular pela inibição das enzimas exócrinas presentes nos ácinos pancreáticos. À temperatura ambiente, o processo de descélularização estimula a tripsina juntamente com o bicarbonato de sódio, no duodeno, a ativar uma cascata de proenzimas pancreáticas (proteases, lipases, amilases) na matriz extracelular. A tripsina também insere perturbações na elastina, fibronectina, laminina, GAGs e na ligação cruzada da estrutura do colágeno. A redução da temperatura para 4° C impacta a hidrólise com um decréscimo de 3 vezes na produção dessas proenzimas (KEANE *et al.*, 2012; GILBER *et al.*, 2006; MORONI; MIRABELLA, 2014).

Ao final, uma descélularização eficiente foi alcançada pela perfusão retrógrada através do tronco celíaco, a qual provê ambos os lobos duodenais e esplênicos do pâncreas suíno. Canulando-se o tronco celíaco logo após a sua derivação da aorta também tira proveito da conexão do lobo esplênico com a artéria mesentérica superior e a ponte.

Durante todo o processo de descélularização, o pâncreas permaneceu imerso em solução de perfusão em constante renovação. À medida que a descélularização prosseguia, a solução de imersão tornava-se turva com uma coloração avermelhada, enquanto o pâncreas se tornava opaco.

Nas primeiras horas de descélularização, o duodeno já aparentava-se branco. Na sexta hora de descélularização, o pâncreas apresentava uma tonalidade bem mais clara e o tecido adiposo vicinal tornou-se branco. Vasos e dutos internos já eram perceptíveis e o duodeno apresentava-se translúcido. Após 9 h de descélularização, a translucidez do tecido pancreático (para o pâncreas de menor peso) já era detectável. Próximo da décima segunda hora de descélularização, como mostrado pela Figura 17, o pâncreas estava integralmente translúcido.

Figura 17 - O ciclo de descélularização: (a) Pâncreas nativo. (b) 6 h de descélularização. (c) 9 h de descélularização. (d) 14 h de descélularização.



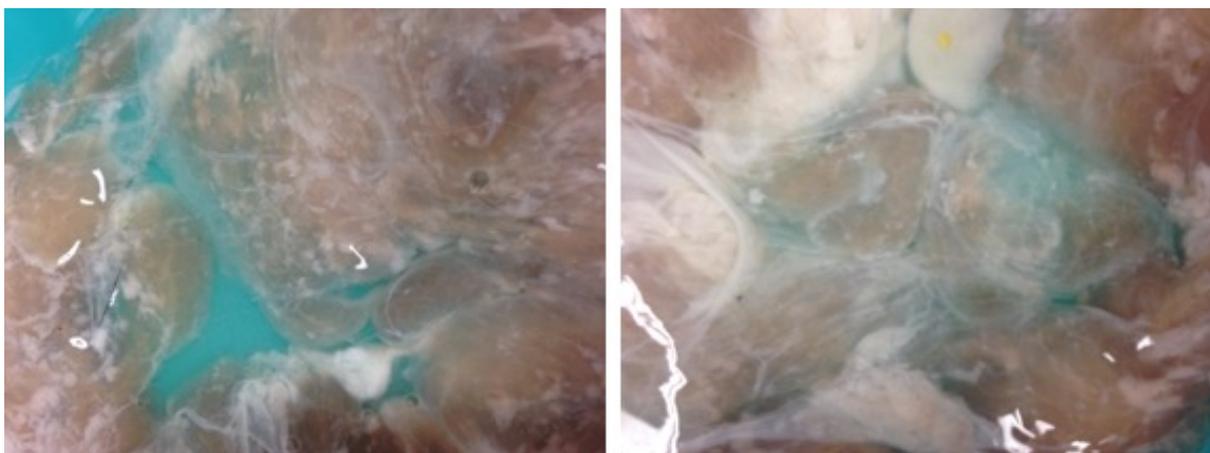
Fonte: Autor (2019)

Obteve-se uma estrutura tridimensional estável e homogeneamente translúcida. A avaliação macroscópica visual determinou que o *scaffold* reteve a sua forma nativa, bem como uma grande rede vascular visualmente inalterada entre o pâncreas e o duodeno, sem apresentar nenhum ponto avermelhado que pudesse indicar a retenção de células.

A perfusão através do tronco celíaco produziu uma redução considerável do tempo de descélularização original observada via ducto pancreático. De acordo com o mostrado pela Figura 18, embora houvessem alguns pontos translúcidos na descélularização via ducto pancreático, esses foram escassos e concentraram-se

principalmente no entorno do duodeno e nas extremidades dos lobos pancreáticos e duodeno. As áreas restantes pareciam não terem sido afetadas pelo detergente. Esses achados estão de acordo com o reportado por Goh *et al.* (2013), que indicaram que a descelularização via ducto pancreático havia sido mais lenta e menos eficaz na remoção celular.

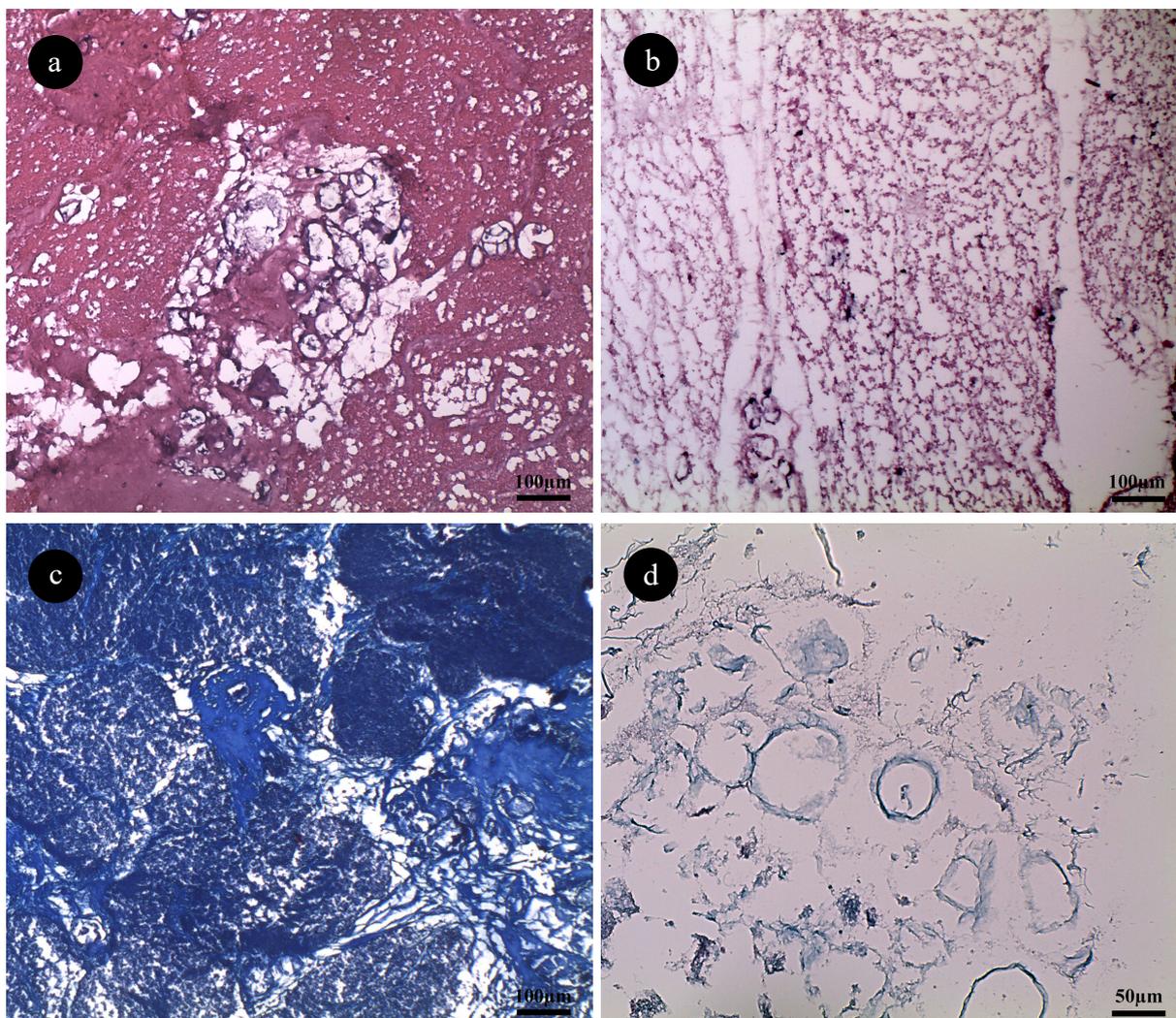
Figura 18 - A descelularização via ducto pancreático apresentou alguns pontos translúcidos mas não produziu resultados satisfatórios.



Fonte: Autor (2019)

A análise histológica do tecido mostrou, por meio das Figuras 19 (a, b), a remoção eficiente dos componentes celulares presentes no controle nativo. A coloração de HE da matriz demonstra a preservação da matriz extracelular após a remoção das células nativas (MEC cora em rosa enquanto os remanescentes celulares aparecem em roxo). A matriz de colágeno apareceu intacta, assim como suas paredes vasculares mais finas. Por meio da Figura 19 (c), observa-se que o TM confirmou a remoção celular devido à ausência de citoplasma corado (manchas citoplasmáticas coram em rosa e o colágeno aparece em azul), e exibiu a integridade das paredes pertencentes a dutos, representados pelas estruturas circulares na Figuras 19 (d).

Figura 19 - Análise histológica (aumento 10x). (a) HE de tecido nativo. (b) HE de tecido descelularizado. (c) TM do tecido nativo. (d) TM do tecido descelularizado.



Fonte: Autor (2019)

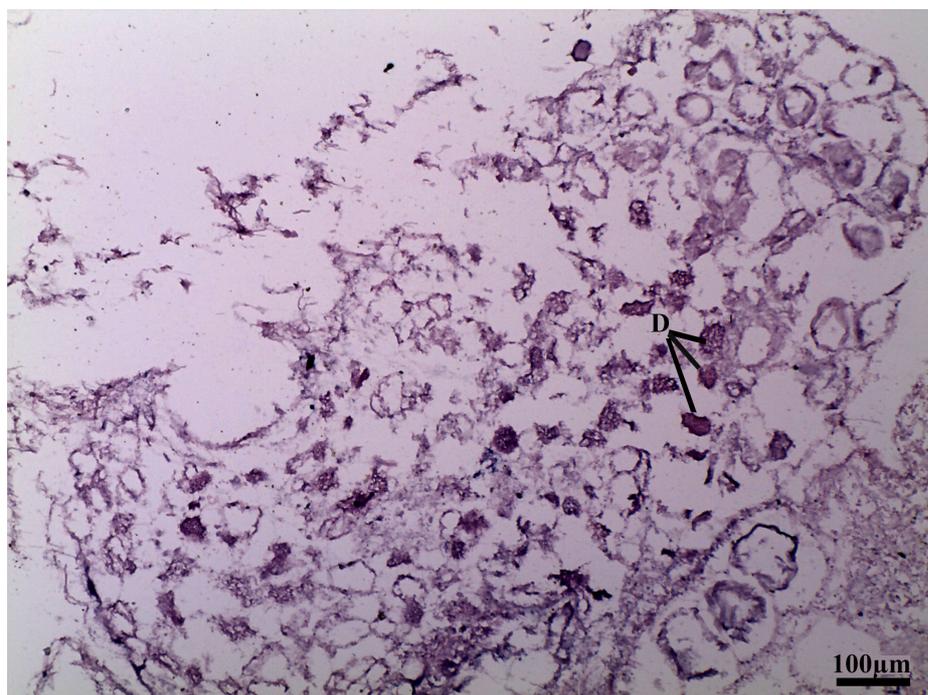
O desenvolvimento de respostas inflamatórias frente à presença de remanescentes celulares é notório. Keane *et al.* (2012) discutiram as possibilidades de rejeição do *scaffold* após a implantação *in vivo* causadas por descelularizações ineficazes. Struecker *et al.* (2014) argumentaram que a variação de pressão produz uma maior homogeneidade da perfusão. Como algumas células encontram-se em áreas mal perfundidas elas não entram em contato com as soluções de perfusão. Essas células se tornam isquêmicas e perecem, permanecendo dentro do órgão após a descelularização.

Assim, torna-se necessário a remoção dessas células inacessíveis seja pelo aumento da taxa de perfusão (pressão), pelo prolongamento dessa perfusão ou pela

introdução de detergentes adicionais. Porém, detergentes adicionais certamente produziram danos à MEC (CRAPO *et al.*, 2011). Uma maneira de minimizar esses efeitos deletérios seria melhorar a microperfusão pela aplicação de pressão oscilante, condição que geraria protocolos de descelularização mais suaves à MEC (STRUECKER *et al.*, 2014)

No contexto eficiência de descelularização do presente estudo, o aumento da pressão de perfusão mostrou-se inversamente proporcional à eficiência da descelularização. Quanto maior foi a pressão de perfusão aplicada, menor foi a remoção de células observada. A Figura 20 mostra que a uma perfusão retrógrada de 20 ml/min (KATSUKI *et al.*, 2016) produzindo uma pressão de $(7,9 \pm 3,2)$ kPa, gerou consideravelmente mais detritos celulares do que o observado na perfusão retrógrada a 11 ml/min.

Figura 20 – O aumento da pressão de perfusão levou à menor eficiência na remoção dos detritos celulares (D).

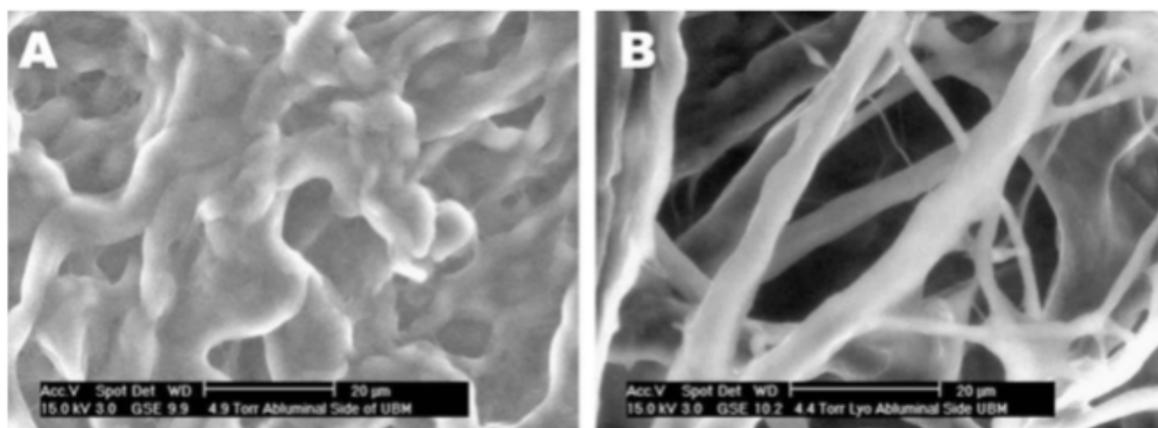


Fonte: Autor (2019)

Com relação ao armazenamento do *scaffolds* após a descelularização, existem algumas considerações a serem observadas. Os *scaffolds* biológicos, em sua maioria, sempre apresentarão um estado de desidratação ao longo do processo de

descelularização. O estado desidratado, além de estender o prazo de validade do material, não permite a ocorrência da lixiviação contínua dos fatores de crescimento solúveis (como VEGF e β -FGF). Já no estado hidratado, os *scaffolds* absterem alterações na arquitetura do tecido, tais como o colapso das fibras de colágeno umas sobre as outras e a formação de ligações físicas entre as moléculas da MEC. Porém, o estado hidratado favorece a adesão e migração celular *in vitro* com mais eficiência do que as versões de *scaffolds* reidratados. A Figura 21 mostra como a microscopia eletrônica de varredura é capaz de revelar as alterações produzidas pelos estados hidratado e desidratado.

Figura 21 - Microscópio de varredura mostrando as mesmas fibras de colágeno em formas distintas: (a) Forma hidratada; (b) Forma liofilizada. O colágeno na forma hidratada tem uma aparência entumescida, enquanto as fibras do colágeno liofilizado (desidratado) aparecem compactas.



Fonte: Badylak (2009)

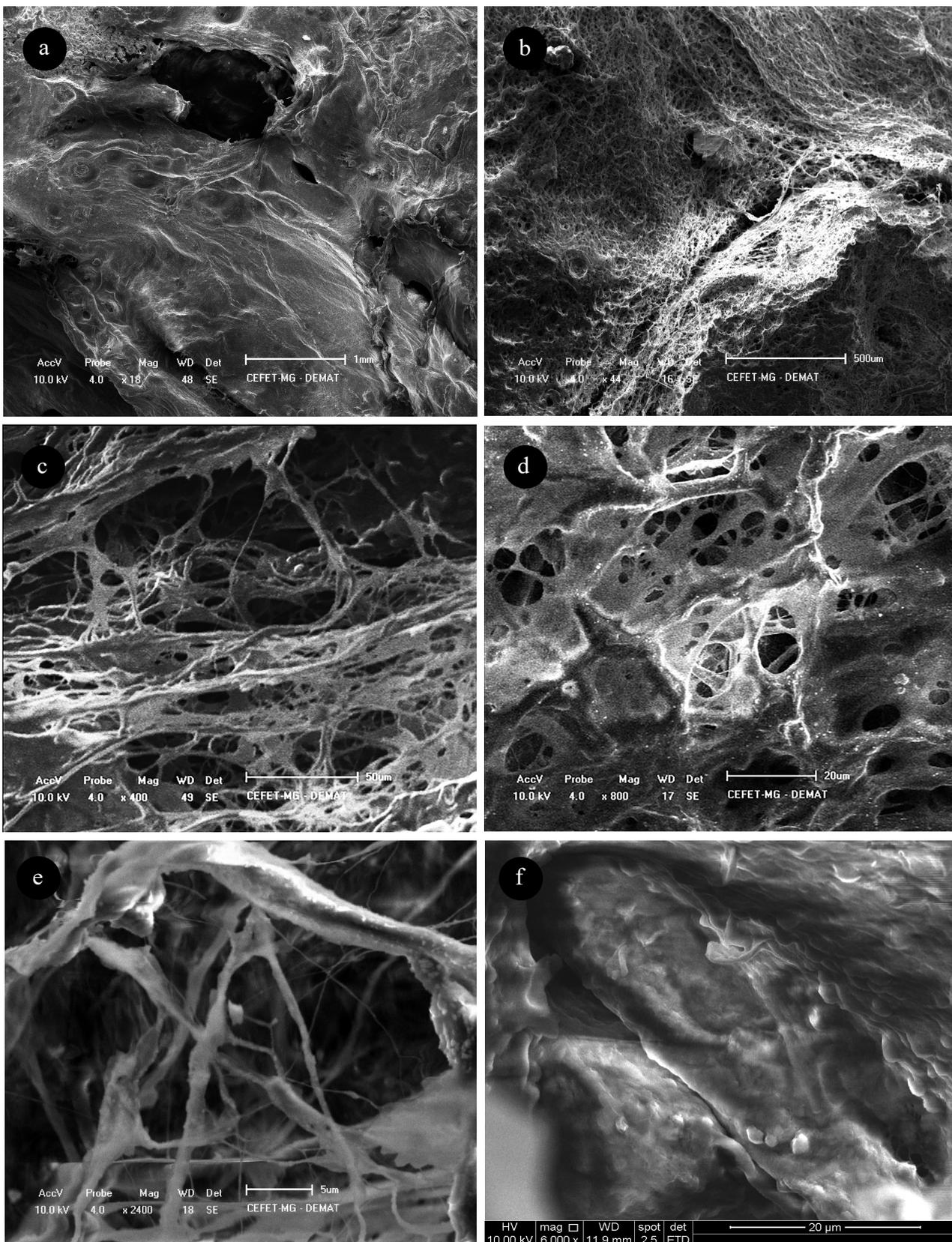
A liofilização é um método de desidratação que simplifica o manuseio dos *scaffolds* e limita a perda de fatores de crescimento durante o armazenamento. Essa técnica de conservação é comumente usada para preservar tecidos de enxerto biológico, como osso e tendão, e materiais biológicos comercialmente disponíveis, como os aloenxertos dérmicos da Bard® (EUA), Acell Vet™ (EUA) e Oasis™ (Cook Biotech, Inc., EUA) (BADYLAK *et al.*, 2009).

Embora a liofilização possa prolongar a vida de prateleira do *scaffold*, sem causar alterações significativas nos valores de resistência, ela pode alterar a

morfologia da fibra de colágeno e, com isso, o crescimento *in vitro* de células sobre aquele material. A liofilização pode diminuir significativamente a espessura dos *scaffolds* (tipicamente em ~30%), resultando em uma morfologia da fibra mais compactada, e diminui a capacidade do material de reabsorver a mesma quantidade de água que estava presente antes do processo de liofilização, possivelmente devido ao rompimento de GAGs dentro do tecido (BADYLAK *et al.*, 2009). Além de conservação, a liofilização é também a técnica empregada para preparo das amostras para ensaios no microscópio eletrônico de varredura (MEV).

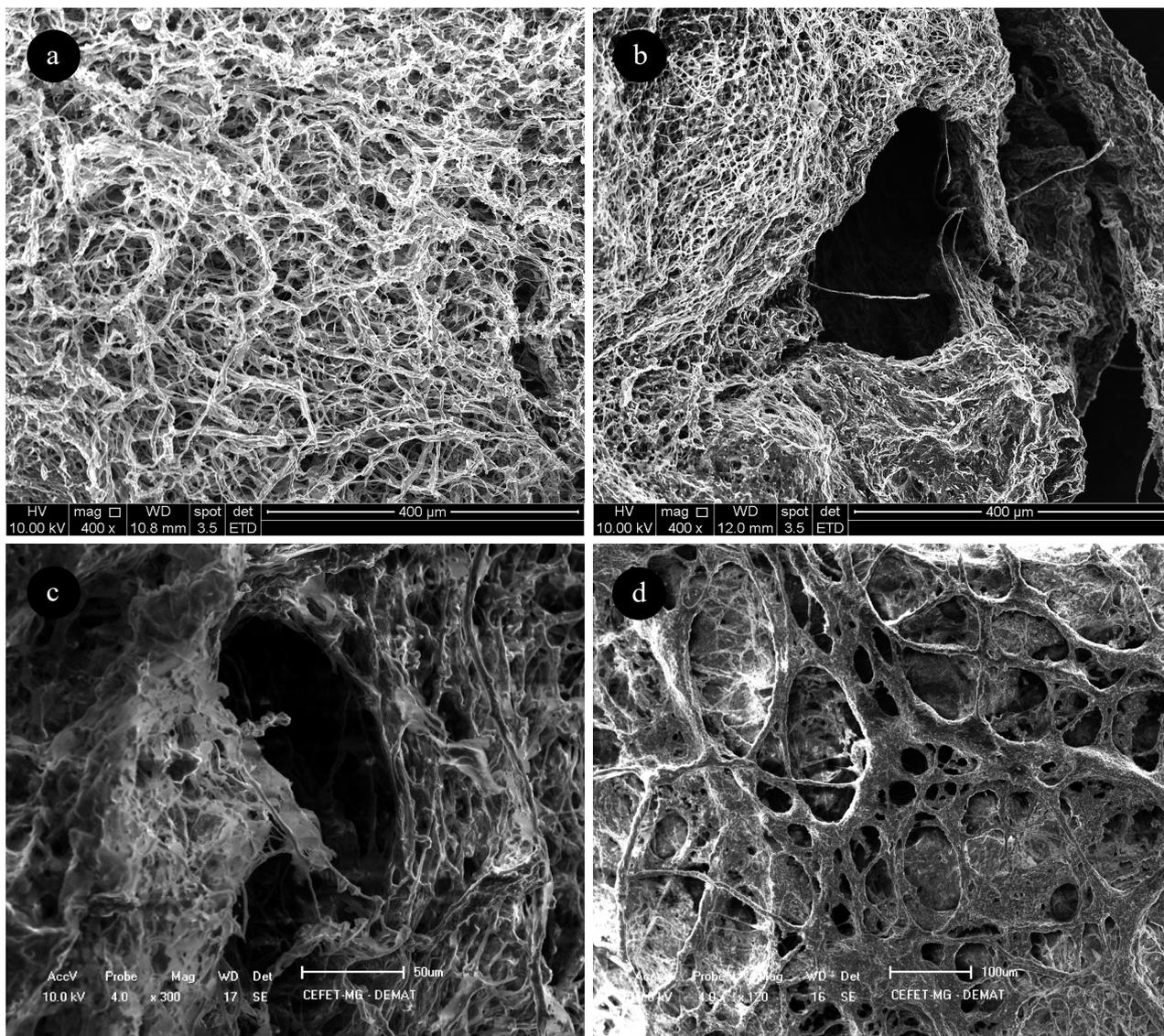
Analisando ambos os tecidos pela MEV, como o mostrado na Figura 22 (a), observou-se uma superfície contínua e sedosa, rica em células e com aberturas muito definidas de vasos ou dutos na estrutura nativa. De maneira antagônica, o tecido descelularizado, a partir de agora chamado *scaffold*, ostentou uma superfície fibrosa e multicomplexa, completamente ausente das células. A Figura 22 (b), revela o *scaffold* como um ambiente acelular composto por uma vasta rede de fibras. Os aumentos progressivos providos pelas Figuras 22 (c), (d) e (e) apresentam a estrutura colágena da MEC com diversos tipos e calibres, intercaladas por canais vazios. Canais que seguem conectando microestruturas e microambientes bem definidos ao longo de toda estrutura, até onde era visível, como, por exemplo a Figura 22 (e) que mostra a estrutura de um vaso desprovido de sua lâmina endotelial.

Figura 22 - MEV da matriz extracelular: (a) - A superfície do pâncreas nativo mostra-se lisa e cheia de células; aumento 18x - escala 1 mm. (b) - A superfície do *scaffold* aparece fibrosa e porosa; aumento 44x - escala 500 μm . (c - e) Os aumentos progressivos revelam fibras colágenas de diversos calibres e configurações; aumentos 400x – escala 50 μm , 800x – escala 20 μm , 2400x - escala 5 μm , respectivamente. (f) Um vaso, ou ducto pancreático, aparece desnudo de sua camada endotelial; aumento 6000x - escala 20 μm .



Fonte: Autor (2019)

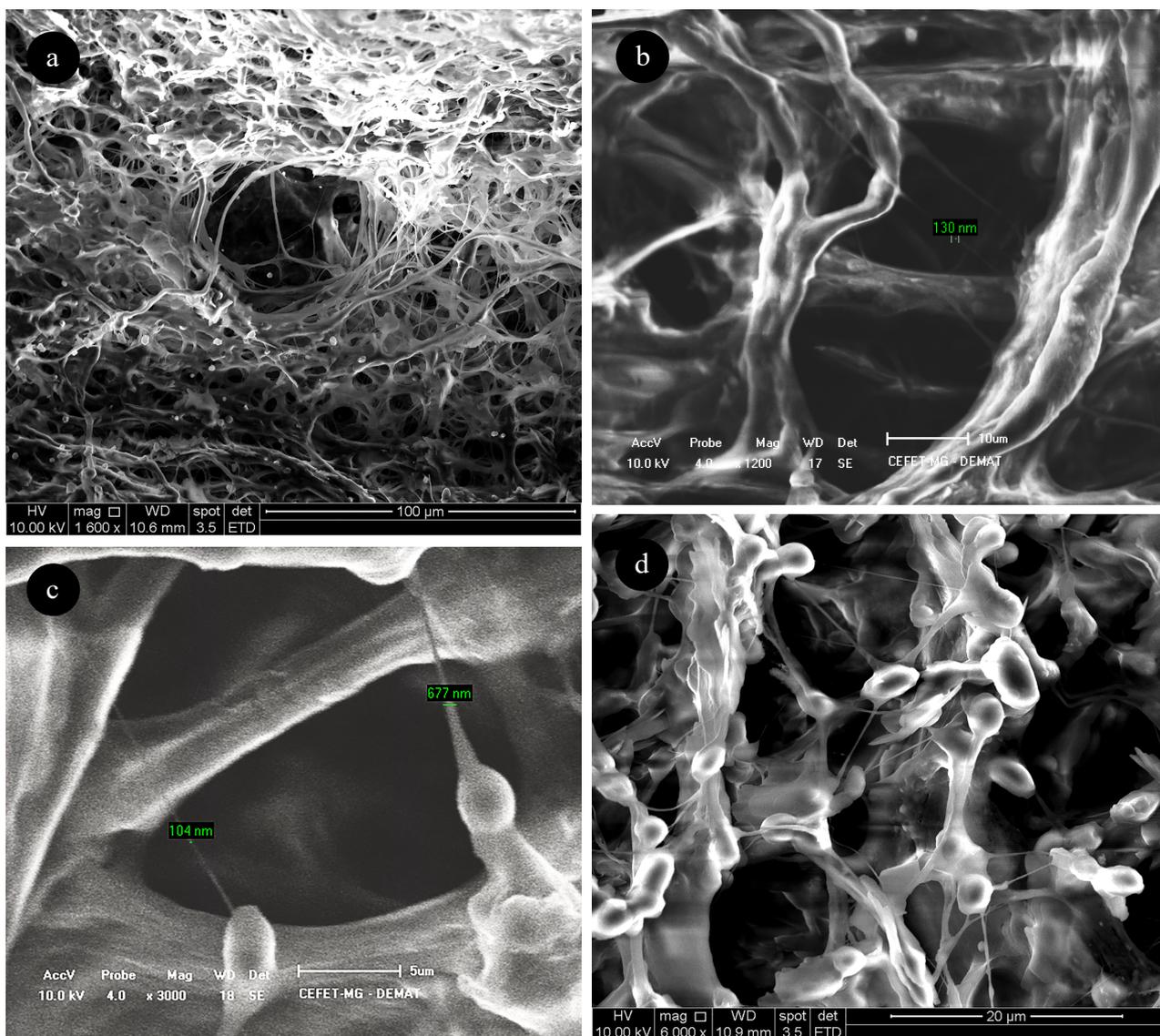
Figura 23 – MEV revela a morfologia das fibras de uma sessão do lobo duodenal do *scaffold*. As imagens mostram que as aberturas de ductos ou vasos presentes na superfície fibrosa do *scaffold* retiveram sua integridade estrutural. (a) Aumento 300x – escala 50 μm . (b) Aumento 400x – escala 400 μm . (c) Aumento 4000x – escala 40 μm . (d) Aumento 120x – escala 100 μm . Source: Author.



Fonte: Autor (2019)

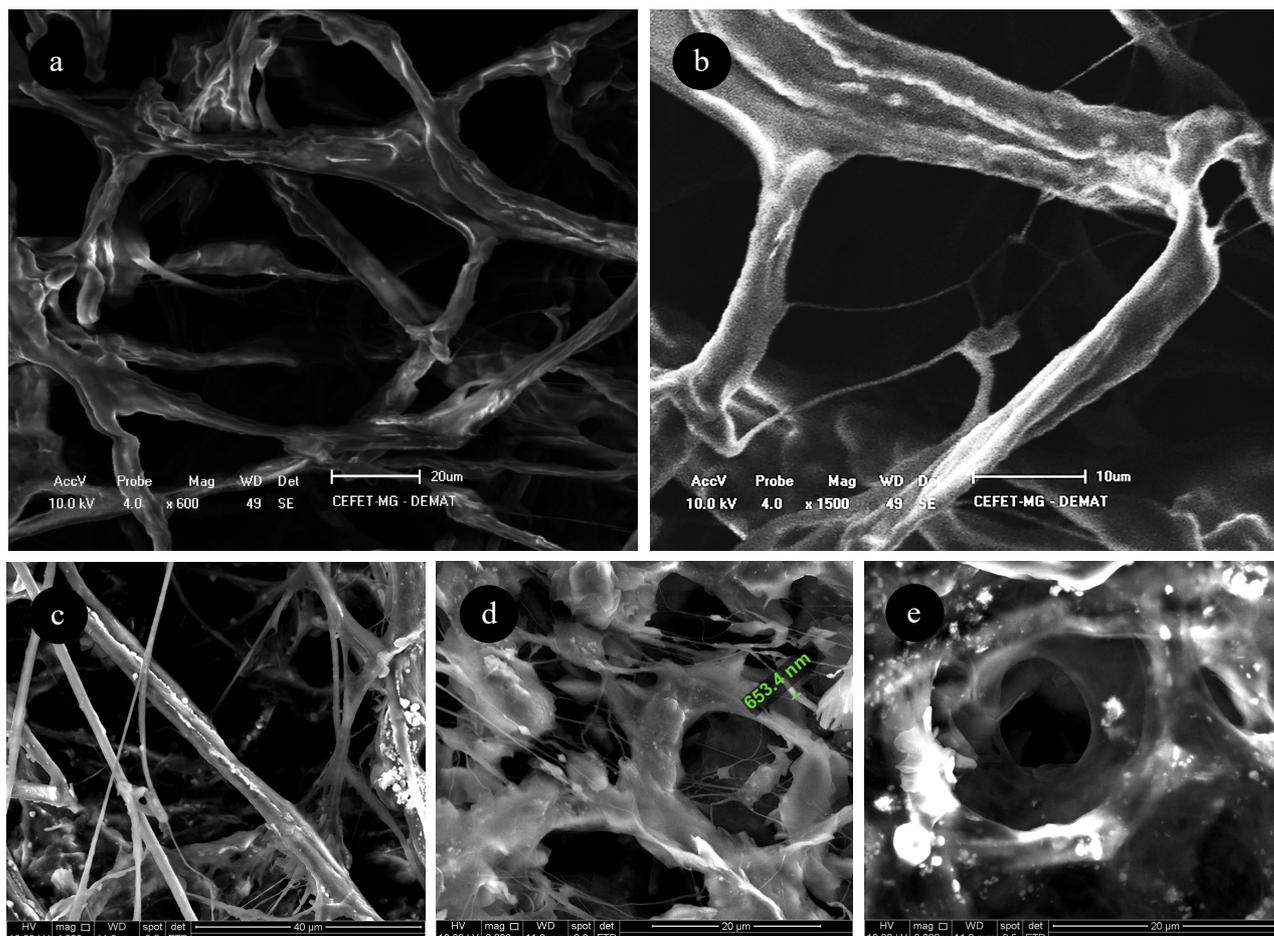
As fibras colágenas aparecem expostas em configurações reticulares, agrupadas em feixes, com estruturas aparentemente intactas, conforme as Figuras 23, 24 e 25. Nanofibrilas, como mostrado nas Figuras 23 (b) e (c), também permaneceram estruturalmente íntegras. Tais resultados conservaram-se dentre todos os outros grupos experimentais.

Figura 24 – MEV de uma sessão do lobo esplênico do *scaffold* revela microambientes acelulares e o início da formação das fibras colágenas a partir dos fibroblastos. Aumentos maiores mostram microambientes íntegros livres de detritos. As formações de aparência granular branca são remanescentes do PBS utilizado previamente na preservação das amostras. (a) Aumento 1600x – escala 100 μm . (b) Aumento 1200x – escala 10 μm . (c) Aumento 3000x – escala 5 μm . (d) Aumento 6000x – escala 20 μm .



Fonte: Autor (2019)

Figura 25 – MEV de uma sessão do lobo conectivo do *scaffold* também revela uma gama de configurações fibrilares íntegras. Novamente, nanofibrilas, assim como os microambientes, foram conservados. As formações granulares brancas são remanescentes da utilização prévia de PBS na conservação das amostras. (a) Aumento 600x – escala 20 μm . (b) Aumento 1500x – escala 10 μm . (c) Aumento 4000x – escala 40 μm . (d) Aumento 6000x – escala 20 μm . (e) Aumento 8000x – escala 20 μm .

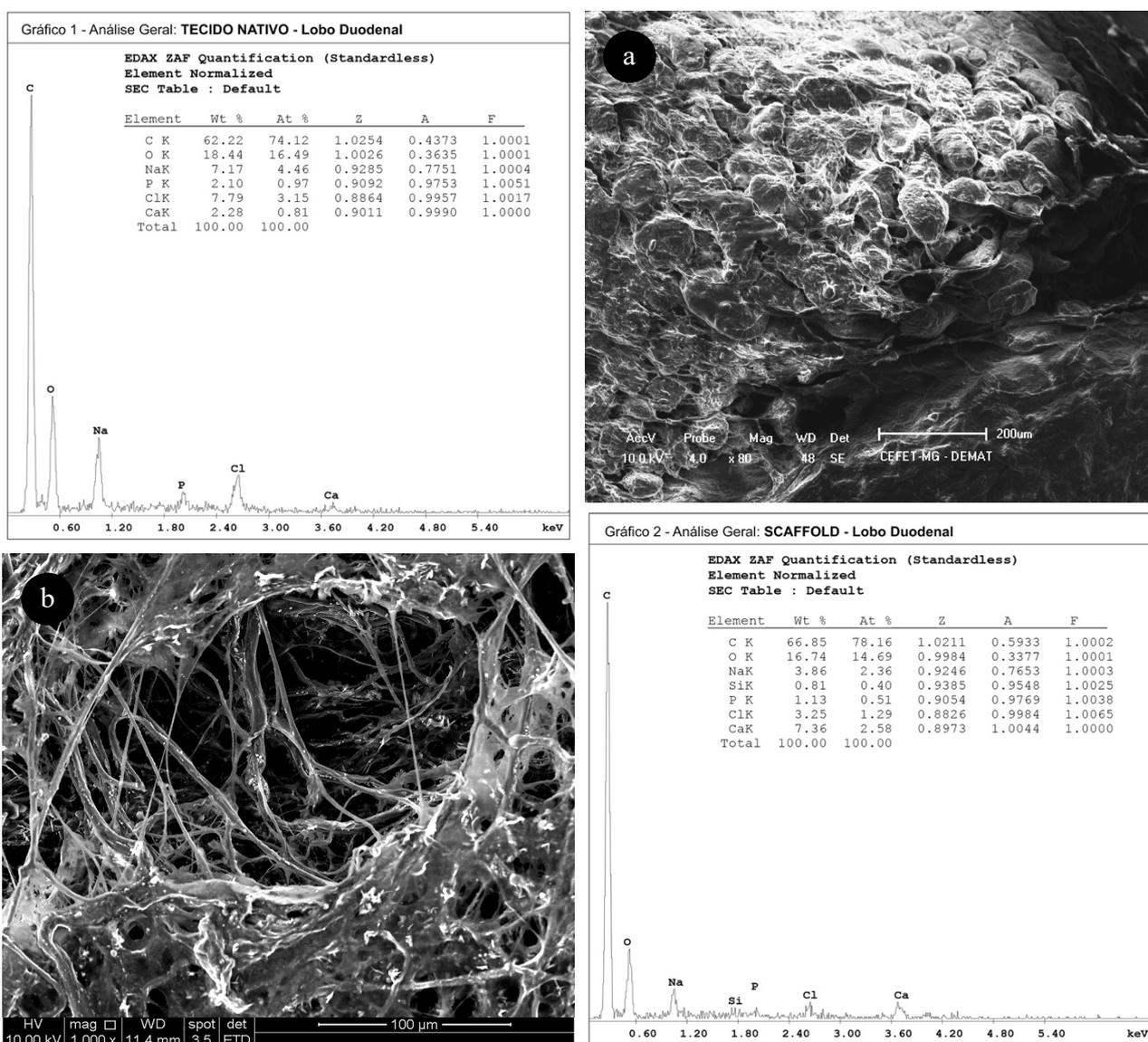


Fonte: Autor (2019)

Uma análise química semi-quantitativa foi realizada em áreas distintas da topografia do *scaffold* por um EDS acoplado ao MEV. O perfil EDS das amostras de ambos o tecido nativo e *scaffold*. Para o lobo duodenal do tecido nativo, as proporções mostradas no Gráfico 1 da Figura 26 [62,22 % carbono (C), 18,44% oxigênio (O), 7,17% sódio (Na), 2,10% fósforo (P), 7,79% cloro (Cl) e 2,28% cálcio (Ca)], apresentam-se muito próximas às do *scaffold* mostradas pelo Gráfico 2, Figura 26

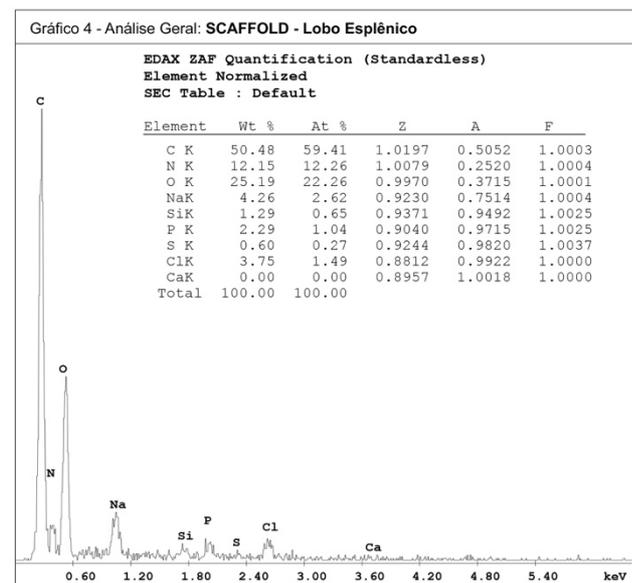
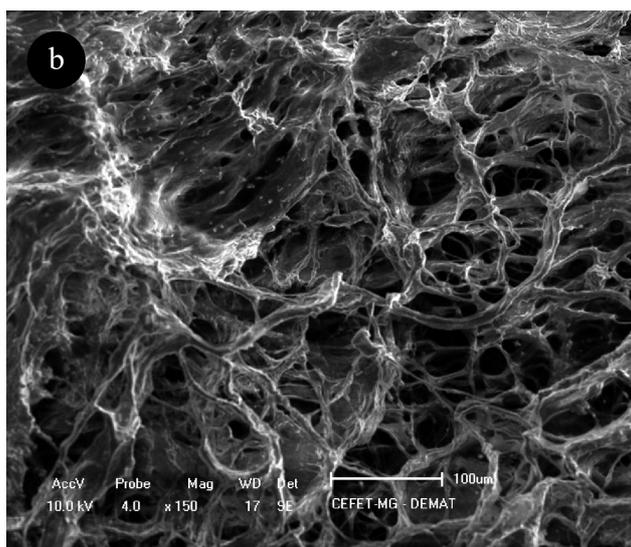
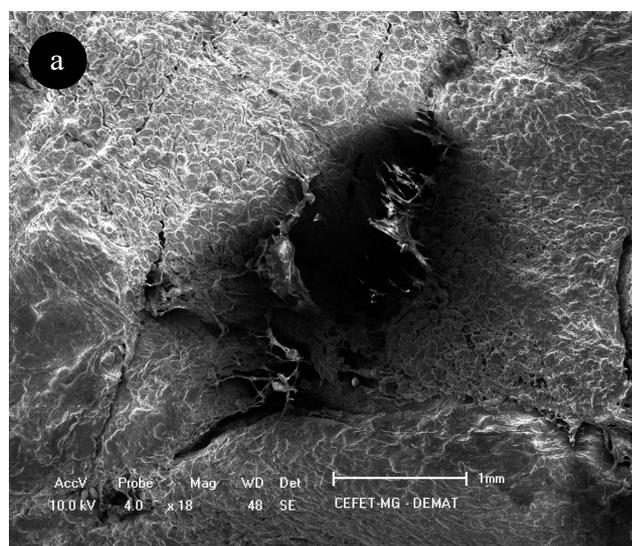
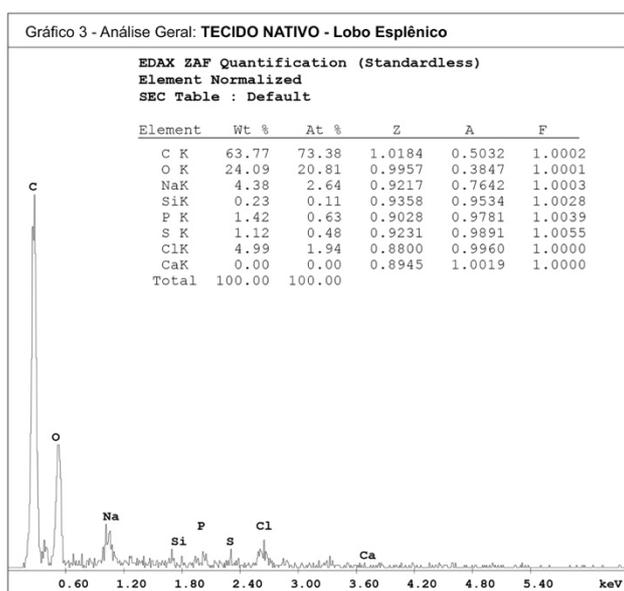
[66,85 % carbono (C), 16,74% oxigênio (O), 3,86% sódio (Na), 0,81% silício (Si), 1,13% fósforo (P), 3,25% cloro (Cl) e 7,36% cálcio (Ca)].

Figura 26 – Comparando as análises MEV EDS de sessões dos lobos duodenais do tecido nativo e do *scaffold*, verificou-se uma baixa variação em suas composições químicas. Os registros de sódio, cloro, fósforo e silício são consistentes com o armazenamento das amostras em PBS. Gráfico 1 – Quantificação da composição química de uma sessão de lobo duodenal do tecido nativo. (a) MEV da sessão de tecido nativo utilizada no EDS; aumento 80x – escala 200 µm. Gráfico 2 – Quantificação da composição química de uma sessão do lobo duodenal do *scaffold*. (b) MEV da sessão de tecido utilizado no EDS; aumento 1000x – escala 100 µm.



Fonte: Autor (2019)

Figura 27 – Similarmente à figura anterior, a análise de MEV EDS de uma sessão dos lobos esplênicos para o tecido nativo e para o *scaffold*, detectou uma baixa variação no conteúdo químico da ECM. Os registros de sódio, cloro, nitrogênio e fósforo são consistentes com o armazenamento das amostras em PBS com azida sódica. Gráfico 3 – Quantificação da composição química de uma sessão de lobo esplênico do tecido nativo. (a) MEV da sessão de tecido nativo utilizada no EDS; aumento 18x – escala 1mm. Gráfico 4 – Quantificação da composição química de uma sessão de lobo esplênico do *scaffold*. (a) MEV da sessão de *scaffold* utilizada no EDS; aumento 150x – escala 100 μm .



Fonte: Autor (2019)

As proporções apresentadas pelos Gráficos 3 e 4 da Figura 27, relativas ao lobo esplênico do tecido nativo e do *scaffold*, também são similares. A presença de nitrogênio é em decorrência da utilização de azida sódica, como bacteriostático, no preparo do PBS. As amostras foram examinadas a 10 kV usando o software EDAX ZAF Quantification.

Os ensaios de EDS registraram uma baixa variação dos níveis atômicos de cada elemento após a descelularização. Ou seja, o método de descelularização utilizado preservou tanto a estrutura tridimensional da MEC quanto os elementos químicos de sua composição.

Um aspecto muito importante que é resultante direto da remoção celular por descelularização foi o aumento da porosidade, e a conseqüente redução das capacidades distensíveis da MEC. Em um ambiente menos compacto, haverá um desdobramento das fibras de colágeno e elas passarão a reorientar-se na direção da tensão aplicada. Inicialmente, a rede de colágeno flexível oferece uma alta tensão sob baixo estresse. À medida que o estresse aumenta, a rigidez segue gradualmente realinhando as fibras de colágeno. Começando na região linear, o deslizamento das fibras em relação umas às outras sofre falha contínua até a ruptura completa da estrutura (SHERIDAN *et al.*, 2012).

Um outro aspecto que explica a integridade mecânica das fibras de colágeno é a conformação em tripla hélice. Em conformação helicoidal, a molécula é capaz de atrasar a degradação de sua cadeia enquanto sofre abstrações de hidrogênio por radicais livres (SENSINI; CRISTOFOLINI, 2018). Drifka (2016) apontou que parece existir uma relação entre a reorientação direcional durante alinhamento de fibras de colágeno e a progressão de câncer pancreático. O tumor desenvolve-se com o colágeno entrelaçado a ele até o ponto de metástase, quando, então, ocorre o alinhamento das fibras de colágeno. Pacientes que apresentam tumores com maiores proporções de alinhamento das fibras colágenas apresentam as menores taxas de sobrevivência (Drifka, 2016).

A conformação de colágeno está diretamente associada às frequências das bandas Amida I e II, as duas principais bandas do espectro de proteínas no infravermelho. Alterações ou reduções na intensidade dessas bandas determinam discrepâncias estruturais. A banda Amida I é principalmente associada à vibração de alongamento C=O e está diretamente relacionada à conformação estrutural. A banda

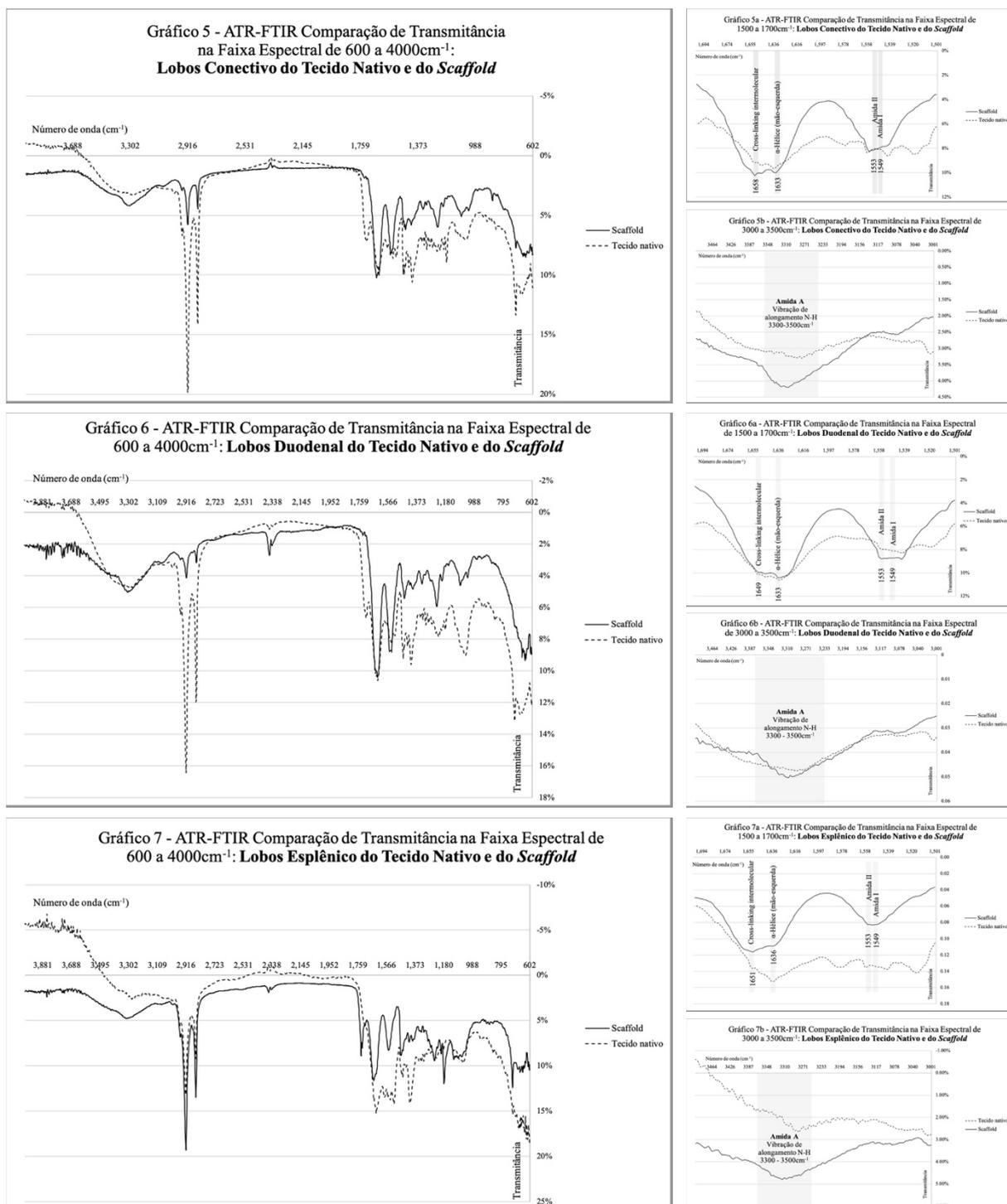
Amida II resulta da vibração de curvatura N-H e da vibração de alongamento C-N, relacionando-se, portanto, à conformação (SENSINI; CRISTOFOLINI, 2018).

Os picos intensos registrados pelo ATR-FTIR para o *scaffold* sugerem conformações de tripla hélice para a Amida I e II. Amida I é um colágeno de α -hélice (mão-esquerda) no estado desnaturado que possui reticulação e ligações de água molecular. Enquanto a reticulação estabiliza as cadeias de colágeno, suas ligações frágeis e a água ligada respondem pelas propriedades viscoelásticas. A Amida A, a um valor espectral mais baixo (3336 cm^{-1}), aponta a formação de ligações de hidrogênio entre N-H e outros grupos, estabilizando a estrutura da tripla hélice (SENSINI; CRISTOFOLINI, 2018).

A estabilidade da estrutura secundária das fibras de colágeno foi avaliada por meio do ATR-FTIR. A intensidade vibracional detectou os desvios na frequência da molécula dentro dos espectros, variações nessas frequências significam irregularidades nas cadeias moleculares. Os Gráficos 5, 6 e 7 da Figura 28 mostram as variações registradas entre as amostras dos lobos conectivo, duodenal e esplênico, respectivamente, obtidas a partir de seções do tecido nativo e do *scaffold*.

Conforme é observado nos Gráficos 5, 6 e 7 (a), correspondentes à região espectral entre 1500 e 1700 cm^{-1} , o *scaffold* apresentou picos intensos na banda da Amida I em 1549 cm^{-1} , indicando conformação de tripla hélice. Há registro para conformação da α -hélice (mão-esquerda) na frequência 1633 cm^{-1} ; em 1658 cm^{-1} aparece uma possível reticulação intermolecular. Os Gráficos 5, 6 e 7 (b), correspondem à região espectral entre 3000 e 3500 cm^{-1} , registrando a banda da Amida A, que também é um indicador de tripla hélice (SENSINI; CRISTOFOLINI, 2018).

Figura 28 - A estabilidade da estrutura secundária das fibras de colágeno foi analisada por ATR-FTIR. Os Gráficos 5, 6 e 7 apresentam as bandas espectrais entre 600 e 4000 cm^{-1} para seções dos lobos conectivo, duodenal e esplênico de ambos o tecido nativo (controle) e o *scaffold*. (a) Os Gráficos registram a faixa espectral entre 1500 e 1700 cm^{-1} para cada um dos lobos do *scaffold*, informando também a sua variação em relação ao tecido nativo. (b) Similarmente, os Gráficos mostram a faixa espectral entre 3000 e 3500 cm^{-1} para cada um dos lobos do *scaffold*, e sua variação em relação ao tecido nativo.



A estabilidade do *scaffold* também pode ser estudada por meio da análise térmica do fenômeno de desnaturação do colágeno. Por DSC, analisam-se as transições de 1ª ordem que dão origem tanto a picos endotérmicos, que podem se

referir a eventos de fusão, volatilização de produtos, dissociações, reduções etc. Quanto a picos exotérmicos, estes podem relacionar-se à cristalização, polimerização, cura, oxidação, e adsorção entre outros. Nas transições de 2ª ordem ocorrem a variação da capacidade calorífica sem a variação da entalpia. Ao invés de picos notam-se deslocamentos da linha de base (em forma de S). Essas transições podem ser associadas a transições vítreas e/ou relaxações de tensões térmicas da cadeia polimérica (VIDAL; VOLPE, 2005).

Detergentes não desnaturam o colágeno, apesar da desidratação que introduzem nas fibras, os arranjos helicoidais triplos preservam-se. Contudo, há possibilidade de alteração da estabilidade da conformação dos quartetos escalonados. A desnaturação, distinta da degradação, implica na ruptura das ligações. Na desnaturação ocorre uma alteração drástica da temperatura de transição vítrea devido à ausência de ligações de hidrogênio entre cadeias polipeptídicas (a elastina aparece mais rígida e quebradiça), evento irreversível. Porém, a reticulação cruzada pode explicar esse comportamento específico (VIDAL; VOLPE, 2005).

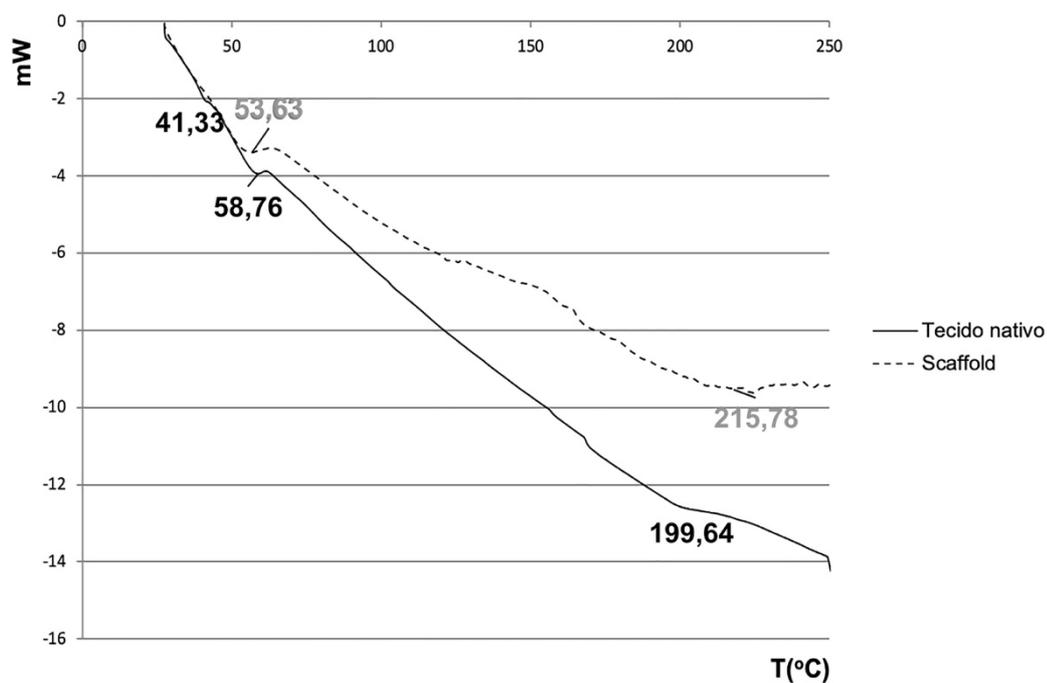
Uma diminuição na temperatura de desnaturação, Figuras 29 e 31 pode representar um sinal de diminuição da estabilidade da tripla hélice. A entalpia calorimétrica é calculada pela área de um pico e dá uma medida absoluta da absorção de energia térmica, de acordo com a quantidade total de proteína analisada (DELGADO, 2018).

Como pode ser observado nas Figuras 29, 30 e 31, os eventos endotérmicos registrados na faixa de 37° a 70° C para o *scaffold* sugerem mudanças na estrutura molecular do colágeno nos três lobos distintos. A alteração da temperatura de desnaturação nos picos endotérmicos pontiagudos e altamente energéticos, mostrados pelas Figuras 29 e 31, são características da tripla hélice. O aumento da temperatura de desnaturação, Figura 30, sugere o aumento da reticulação das fibras de colágeno (SAMOUILLAN *et al.*, 2011).

O aumento da entalpia do desdobramento do colágeno, Figura 31, deve-se à quebra das ligações de hidrogênio entre as triplas hélices e as ligações de hidrogênio, o que leva à formação de uma rede de hidratação ao redor da molécula de colágeno. A entalpia diminui, Figura 31, quando há perda das moléculas de água ligadas e também da cooperação térmica dos demais componentes. Essa perda de água resulta na habilidade menor das fibras em armazenar energia. Essas alterações podem ser

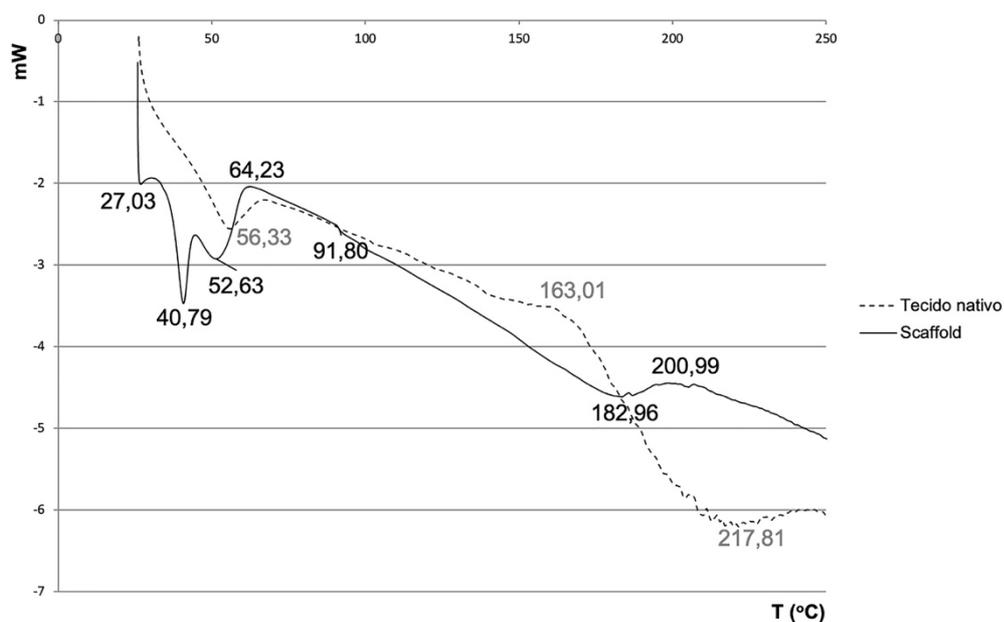
observadas também pelo prolongamento do período de transição térmica e pela assimetria das curvas (SKRZYŃSKI *et al.*, 2009).

Figura 29 - Curva de DSC para as amostras de lobo duodenal de tecido nativo e de *scaffold*.



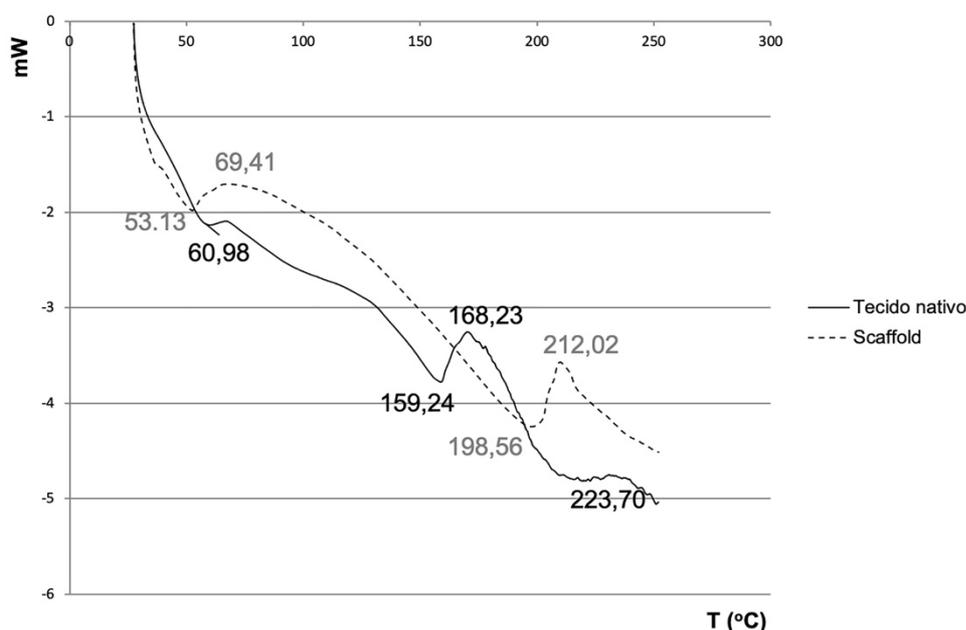
Fonte: Autor (2019)

Figura 30 - Curva de DSC para as amostras de lobo esplênico de tecido nativo e de *scaffold*.



Fonte: Autor (2019)

Figura 31 - Curva de DSC para as amostras de lobo conectivo de tecido nativo e de *scaffold*.



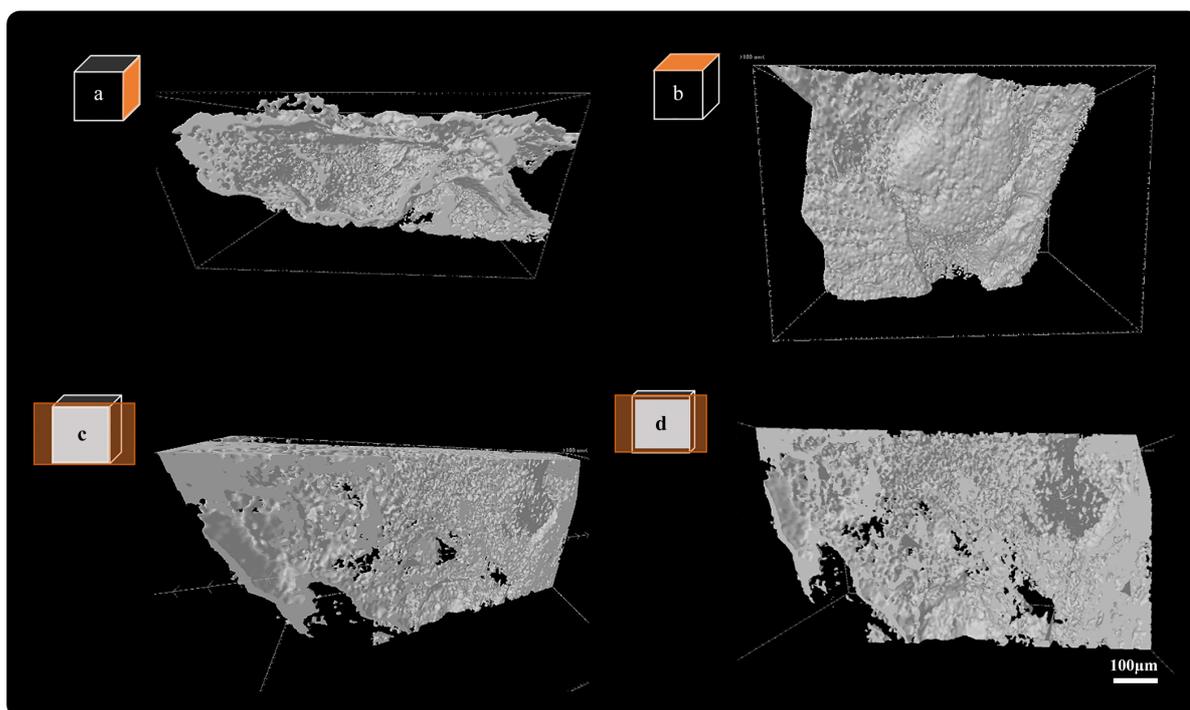
A porosidade, tamanho dos poros e sua interconectividade são parâmetros essenciais para o efeito do substrato nas propriedades mecânicas e químicas, e nos fatores de crescimento e transporte de nutrientes tecidual *in vitro* e *in vivo*. Apenas *scaffolds* altamente porosos permitem a adesão celular enquanto oferecem restrições mínimas à difusão dos agrupamentos celulares.

O tamanho ideal dos poros para a regeneração de tecidos é determinado pelo tipo de tecido. Poros variando entre 50 a 710 μm são indicados para a regeneração óssea, porém, muitos estudos publicados na literatura, consideram os macroporos na faixa de 150 e 350 μm como ideais. Para o crescimento do tecido fibrocartilaginoso os tamanhos recomendados encontram-se na faixa de 200 a 300 μm ; poros relativos à neovascularização são da ordem de 5 μm (KRAMSCHUSTER; TURNG, 2012).

Uma avaliação não invasiva e não destrutiva produzida por um microtomógrafo de raios X, microCT, mediu a porosidade aberta do *scaffold* em 62,7%. Especificamente, 33% dos poros residiam no intervalo 17 - 150 μm , 30% 150 - 350 μm , 23% 350 μm - 1,0 mm e os restantes 14% 1,0 - 1,4 mm. A Figura 32 apresenta a

modelagem tridimensional da amostra, a qual permite a visualização interna desse complexo de poros.

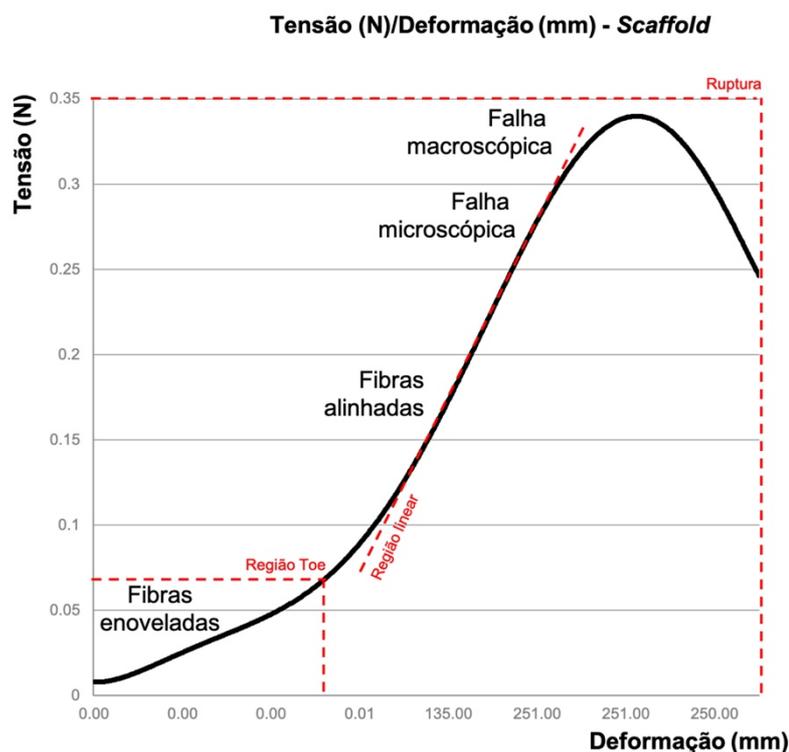
Figura 32 - Microtomografia por Raios X do *scaffold*. Amostra de uma sessão do lobo duodenal. (a) Vista lateral direita mostrando a superfície externa da amostra. (b) Vista superior. (c, d) Cortes longitudinais mostrando a integridade do complexo de poros no interior da amostra.



Fonte: Autor (2019)

Outro quesito a ser considerado é a rigidez do *scaffold*. O módulo de elasticidade dos *scaffolds* pode resultar em diferentes quantidades de tensão aos mesmos níveis de estresse, causando mútua abrasão do *scaffold* com o tecido circundante (KRAMSCHUSTER; TURNG, 2012). A estabilidade da estrutura do *scaffold* sob tensão contínua foi medida por um teste de tração uniaxial. A Figura 33 apresenta a curva média tensão/deformação ($n = 5$) com comportamento hiperelástico bifásico. O módulo de elasticidade medido para as amostras do *scaffold* foi de $(0,05 \pm 0,03)$ MPa contra $(0,007 \pm 0,004)$ MPa para as amostras nativas.

Figura 33 - Teste de tração do *scaffold*. A tensão não-linear ocorre na região toe, onde se dá o desenovelamento das fibras de colágeno em função da carga mecânica aplicada. Na região linear as fibrilas de colágeno estão estiradas e alinhadas em direção ao à carga aplicada. O deslizamento das triplas hélices de colágeno produz uma deformação reversível e o módulo de Young pode ser obtido pela inclinação da curva. Na região de falha microscópica ocorre o estiramento das fibras além do limite estrutural, que leva à deformação plástica. O estiramento das fibras após esse ponto leva à ruptura^{20,21}.



Fonte: Autor (2019)

Quase todos os tecidos colágenos possuem hierarquia estrutural que é intimamente relacionada à hierarquia mecânica. A compreensão clara do mecanismo tensão em função da deformação é fundada no entendimento da contribuição de cada uma dessas estruturas hierárquicas da molécula para o tecido. Tecidos conectivos colágenos consistem em mais ou menos duas frações extracelulares distintas: as fibras colágenas e a matriz amorfa.

Essa matriz amorfa agrupa as microfibrilas colágenas e outras estruturas altamente ordenadas sob uma série de hierarquias na estrutura do tecido. Os componentes não colágenos afetam as propriedades mecânicas do tecido como um

todo, mas as propriedades mecânicas da própria molécula de colágeno permanecem intactas (SASAKI; ODAJIMA, 1996).

Quando se aplica uma tensão na fibrila colágena, a força é dissipada através das estruturas moleculares adjacentes, das reticulações entre os resíduos de aminoácidos em cadeias N-C e dos resíduos de aminoácidos nas regiões helicoidais próximas às cadeias, em sentido inverso, C-N. Assim, a força F aplicada a qualquer ponto será idêntica à força aplicada externamente à matriz em sua integralidade, em decorrência de suas extensas conexões por ligações cruzadas (SASAKI; ODAJIMA, 1996).

O módulo de Young para materiais de natureza viscoelástica tende a aumentar com a taxa de deformação. Entretanto, ensaios de difração de raios-X são capazes de detectar deformações internas à molécula de colágeno, sugerindo a associação de um componente viscoelástico às propriedades mecânicas dessa molécula. Para uma molécula tripla hélice de colágeno do tipo 1, o fator de estabilidade da hélice é a distribuição da força das ligações intramoleculares de hidrogênio. Em um estado totalmente hidratado, a molécula de água em ponte é frequentemente trocada por outras moléculas de água, constituindo um processo de dissipação de energia. Assim, conclui-se que a viscoelasticidade se relaciona à rede de ligação de hidrogênio na molécula de colágeno (SASAKI; ODAJIMA, 1996).

O controle metabólico estrito do diabetes, enquanto reduz complicações neurais, vasculares, retiniais, dentre outras, não oferece a cura. O transplante de ilhotas ou o transplante de pâncreas são os únicos procedimentos capazes de controlar os níveis glicêmicos e as complicações secundárias a longo prazo. Entretanto, a logística de doadores, a mortalidade cirúrgica e necessidade de imunossupressores eternos apresentam-se como apenas alguns dos inúmeros fatores limitantes enfrentados pelos pacientes em estágios avançados de diabetes.

A produção de *scaffolds* acelulares não atende apenas à medicina regenerativa, os *scaffolds* abordam, dentre diversas aplicações, o estudo de patologias, tumores e toxicidade de fármacos. Tudo isso graças à sua capacidade de estimular a migração celular *in-vivo* e a proliferação de células e tecidos vasculares, levando à biointegração completa.

Este estudo cumpriu as metas iniciais de produção *scaffolds* naturais por meio da tecnologia de descélularização. Desenvolveu-se um protocolo de descélularização cuja remoção celular introduziu perturbação mínima estrutural da matriz, conforme

comprovado pelas diversas técnicas de caracterização, viabilizando a produção de um arcabouço tridimensional estável com recursos favoráveis à promoção da angiogênese e à funcionalidade das células β , para a sua eventual produção de insulina.

6 CONCLUSÕES

A descelularização é uma das soluções da engenharia de tecidos que maximizam os recursos naturais já disponíveis para a produção de órgãos e tecidos funcionais e biocompatíveis, com vistas à escalabilidade. Através do levantamento do Estado da Arte foi possível ter uma visão geral das técnicas de processamento de matrizes extracelulares para sua utilização como *scaffolds*, em diferentes níveis de vascularização e resíduos celulares (componentes citoplasmáticos ou nucleares).

Neste estudo, foram investigados os principais protocolos utilizados na descelularização de pâncreas suíno buscando o aprimoramento de uma nova metodologia de processamento para que o biomaterial produzido apresentasse funcionalidade e pudesse potencializar as diversas aplicações celulares - seja pela recelularização, cultivo, proliferação e diferenciação de células pancreáticas para produção de insulina, ou por outras linhagens celulares.

A partir do aprimoramento de metodologias para obtenção de *scaffolds* naturais eficazes, da seleção e da preparação dos tecidos nativos, das modificações no sistema de perfusão e dos insumos químicos minuciosamente determinados, otimizou-se um protocolo que preservou a estrutura colágena, vascular e tridimensional do órgão nativo. Concluiu-se que o conjunto Triton X-100, EDTA, hidróxido de amônio e azida, sob baixa pressão de perfusão e à temperatura controlada, apresentam boas vantagens em relação à remoção de componentes celulares e à preservação das propriedades mecânicas.

Como ponto de destaque deste estudo pode-se citar a utilização de pâncreas frescos ao invés de congelados a -80°C , minimizando-se a possibilidade de formação de cristais de gelo extracelulares e resguardando-se a MEC de prováveis danos mecânicos e desidratação pelo consequente efluxo de água durante o descongelamento; o controle de temperatura do sistema de perfusão à 4°C , inibindo-se as enzimas exócrinas presentes nos ácidos pancreáticos em prol da preservação da ultraestrutura da matriz extracelular; e a perfusão retrógrada através do tronco celíaco, visto que a utilização de vísceras oriundas dos abates comerciais gerou a indisponibilidade de aortas íntegras para a perfusão.

A análise histológica comprovou, comparado ao pâncreas nativo, que o *scaffold* não apresentava material celular visível mas exibia uma matriz extracelular descelularizada intacta. A preservação das propriedades físicas e mecânicas foram

acessadas através das técnicas de espectroscopia de absorção na região de infravermelho (ATR-FTIR); calorimetria exploratória diferencial (DSC); microscopia eletrônica de varredura (MEV), microtomografia de raios-X (microCT) e ensaio de tração.

Finalmente, conclui-se que a descclularização de pâncreas frescos manteve satisfatoriamente a integridade estrutural e mecânica da matriz extracelular nativa, sua vascularidade e preservação da estrutura colágena com uma baixa presença de detritos celulares.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Torna-se necessário determinar as propriedades dos tecidos descelularizados associados aos resultados da reconstrução. O produção de tecidos e órgãos descelularizados com benefícios adicionais é um objetivo importante para pesquisas futuras. Desenvolvimentos recentes na pesquisa de tecidos descelularizados permitiram seu uso como substitutos teciduais na medicina regenerativa devido à sua capacidade de retenção das estruturais complexas do tecido nativo. Consistindo principalmente de colágeno, a MECD além de ser usada como um material de suporte, podem também ser processada em folhas, linhas ou até mesmo pó.

Alguns pesquisadores buscaram desenvolver novos dispositivos que liguem tecidos nativos e materiais artificiais com tecidos descelularizados, sem problemas de compatibilidade. Materiais artificiais possuem propriedades mecânicas diferentes daquelas encontradas em tecidos nativos.

Materiais poliméricos, como por exemplo o silicone ou polietileno tereftalato, são utilizados em aplicações clínicas como dispositivos transdérmicos para ligar cateteres; revestimentos de hidroxiapatita e malhas de titânio, atuam melhorando a adesão de tecidos nativos a materiais sintéticos. Porém, tais materiais não solucionam as diferenças relativas às propriedades mecânicas, e sua baixa compatibilidade com tecidos nativos induz o crescimento epidérmico. Essas diferenças resultam em uma concentração de estresse na interface de tecidos nativos e artificiais e, eventualmente, resultam em danos dérmicos.

Um dispositivo de ligação para tecidos nativos e materiais artificiais a partir de tecido descelularizado, como um material intermediário, garante a compatibilidade entre o tecido nativo e os materiais artificiais em nível molecular. Particularmente, a literatura cita a submersão de derme descelularizada em monômeros de metilmetacrilato, MMA, seguida de polimerização em polimetilmetacrilato, PMMA.

Um teste de compressão mostrou que esse compósito obteve um valor intermediário entre os verificados para a derme descelularizada e o PMMA, enquanto a elasticidade do compósito foi semelhante à da derme. Esses resultados indicam que as propriedades mecânicas da derme foram mantidas após a combinação com o PMMA. Deduz-se, portanto, que ocorreu variação na composição do PMMA com a derme descelularizada.

Em seguida, preparou-se um complexo gradiente injetando-se o MMA no centro do compósito cilíndrico (apresentando um orifício central) da derme descelularizada com o PMMA. O MMA então expandiu-se do centro para o exterior. Quando todo o complexo gradiente, mais o não gradiente, foi implantado subcutaneamente em camundongos, observou-se um crescimento epidérmico decrescente.

No caso do complexo gradiente, foi observada a sua integração com tecidos circundantes pela infiltração das células hospedeiras na derme descelularizada. Este modelo demonstra portanto que a MECD não é apenas um suporte celular, ela também configura um centro de controle para funções celulares complexas (NAKAMURA *et al.*, 2017).

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda. 2015. 536 p.

AHLQVIST, E. *et al.* Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. **The Lancet: Diabetes & Endocrinology**. V. 6, n.5, p. 361–369, 2018.

AHMED, A. M. History of diabetes mellitus. **Saudi Med J**. Riyadh, v. 23, n. 4, p. 373–8, Abr 2002.

AL-GOBLAN, A. *et al.* Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. **Diabetes Metab Syndr Obes**. Londres, v. 7, p. 587–591, Maio 2014. Disponível em <<https://doi.org/10.2147/DMSO.S67400>> Acesso em 25/05/2019.

ALTMAN, L. K. Keith Reemtsma, 74, Pioneer in Medical Transplants, Dies. **The New York Times**. 2000. Disponível em <<https://www.nytimes.com/2000/06/28/nyregion/keith-reemtsma-74-pioneer-in-medical-transplants-dies.html>> Acesso em 11/06/18.

BADYLAK, S. *et al.* Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. **Acta Biomaterialia**. V. 5, p. 1–13, Out 2009. Disponível em <<http://www.doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.013>> Acesso em 04/04/2018.

BALESTRINI, J. *et al.* E. Production of decellularized porcine lung scaffolds for use in tissue engineering. **Integrative Biology**, v. 7, n 12, p 1598–1610, Outubro 2015. Disponível em <https://doi.org/10.1039/c5ib00063g>. Acesso em 29/05/2019.

BARAKAT, O. *et al.* Use of Decellularized Porcine Liver for Engineering Humanized Liver Organ. **J Surg Res**. V. 173, e11-e25, 2012.

BAUM, J. *et al.* Letter: Weight gain in infancy and subsequent development of diabetes mellitus in childhood. **Lancet**. Londres, v. 2 n. 7940, p. 866, Nov 1975.

BRASILEIRO F., G. **Bogliolo Patologia**. 6. ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2000. 1328 p.

BROWN, B. N.; BADYLAK, S. F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. **Transl Res**. Amsterdam, v. 163, n. 4, p. 268–285, Abr 2014. Disponível em <<https://www.doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.003>> Acesso em 29/05/2019.

BRUKER. microCT Microtomography. 2019. Disponível em <<https://www.bruker.com/products/microtomography/micro-ct-for-sample-scanning/x-ray-micro-ct-microtomography.html>> Acesso em 18/06/2019.

BRUNI, A. *et al.* Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges. **Diabetes Metab Syndr Obes**. London, v. 7, p. 211–

223, Jun 2014. Disponível em <<http://www.doi.org/10.2147/DMSO.S50789>> Acesso em 12/2018.

CABROL, L. *et al.* Inhibitory effects of sodium azide on microbial growth in experimental resuspension of marine sediment. **J Microbiol Methods**. V. 133, p. 62-65, 2016

CARVALHO, J. L. *et al.* Characterization of Decellularized Heart Matrices as Biomaterials for Regular and Whole Organ Tissue Engineering and Initial In-Vitro Recellularization with Ips Cells. **J Tissue Sci Eng**. Suppl 11, 002, 2015. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4509516/pdf/nihms-453297.pdf>. Acesso em 10/06/18.

CASALI, D. *et al.* A novel supercritical CO₂-based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties. **J. Supercrit Fluid**. V. 131, p 72-81, janeiro 2018.

CHAPLIN, M. Explanation of the Density Anomalies of Water (D1-D22). **Water structure and science**. 2018. Disponível em http://www1.lsbu.ac.uk/water/density_anomalies.html. Acesso em 18/7/2018.

COLUMBIA University. Pancreas and Its Functions. **The Pancreas Center. Department of Surgery**, 2018. Disponível em <<http://columbiasurgery.org/pancreas/pancreas-and-its-functions>> Acesso em 14/03/18.

COOPER, D. K. C. A brief history of cross-species organ transplantation. **Baylor University Medical Center Proceedings**. V. 25, n. 1. p 49–57, 2012. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3246856/pdf/bumc0025-0049.pdf>. Acesso em 12/06/18.

COOPER, D. K. C. *et al.* Xenotransplantation - the current status and prospects. **Br Med Bull**. V. 125, p. 5-14, 2018.

CRAPO P. M. *et al.* An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**. V.12, p. 3233–3243, 2011.

DAHL, S. L. *et al.* Readily available tissue-engineered vascular grafts. **Science Translational Medicine** V. 3, 2011.

DAMODARAN, R. G.; VERMETTE, P. Tissue and Organ Decellularization in Regenerative Medicine. **Biotechnol Prog**. Hoboken, v. 34, n. 6, Out 2018. Disponível em <<https://www.doi.org/10.1002/btpr.2699>> Acesso em 29/05/2019.

DEAN, C.; Murray, J. E. Transplant Doctor and Nobel Prize Winner, Dies at 93. **The New York Times**. 2012. Disponível em <https://www.nytimes.com/2012/11/28/health/dr-joseph-e-murray-transplant-doctor-and-nobel-winner-dies-at-93.html>. Acesso em 14/06/18.

DELGADO, L. M. The influence of collagen isolation, cross-linking and sterilisation on macrophage. P. 368. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica e Medicina

Regenerativa) – Universidade Nacional da Irlanda Galway, 2018. Disponível em <<http://hdl.handle.net/10379/7189>> Acesso em 18/06/2019.

DHOLAKIA, S. *et al.* The rise and potential fall of pancreas transplantation. **British Medical Bulletin**. Oxford, v. 124, n. 1, p. 171-179, Dez. 2017. Disponível em <<https://doi.org/10.1093/bmb/ldx039>> Acesso em 25/05/2019.

DIABETES.CO.UK. Digestive system. Disponível em < <https://www.diabetes.co.uk/body/digestive-system.html>> Acesso em 21/05/18.

DIAPÉDIA. Thomas Willis. Disponível em <https://www.diapedia.org/introduction-to-diabetes-mellitus/1104693411/thomas-willis>. Acesso em 21/05/18.

DRIFKA, C. R. *et al.* Highly aligned stromal collagen is a negative prognostic factor following pancreatic ductal adenocarcinoma resection. **Oncotarget**. V. 7, p. 76197-76213, Out. 2016. Disponível em <<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12772>> Acesso em 25/05/2019.

DSMS - Department of Surgery, Medical School, University of Minnesota. Conference: Celebrating 50 Years of Pancreas Transplantation: Discovery, Innovation, and Advancement. <https://www.surgery.umn.edu/events/celebrating-50-years-pancreas-transplantation-discovery-innovation-and-advancement>. Acesso em 15/06/18.

DUROWOJU, I. B. *et al.* Differential Scanning Calorimetry — A Method for Assessing the Thermal Stability and Conformation of Protein Antigen. **J Vis Exp**. V. 121, P. 552-62, 2017.

ELEBRING, E. *et al.* Cold-Perfusion decellularization of whole-organ porcine pancreas supports human fetal pancreatic cell attachment and expression of endocrine and exocrine markers. **J Tissue Eng**. V. 8, p. 1-10, 2017.

ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. Aretaeus of Cappadocia. Disponível em <https://www.britannica.com/biography/Aretaeus-of-Cappadocia>. Acesso em 18/05/18.

ERICZON, B. *et al.* In Memoriam—Carl-Gustav Groth 1933–2014. **Transplantation**. 2014. V. 98 N. 2 p.122–123.

FDA – U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Lyophilization of Parenteral (7/93). Disponível em < <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-guides/lyophilization-parenteral-793>> Acesso em 03/07/2019.

FERRER, J. *et al.* Pig Pancreas Anatomy: Implications for Pancreas Procurement, Preservation, and Islet Isolation. **Transplantation**. V. 15, n. 86, p. 11, 2008.

FLAHERTY, D. K. **Immunology for Pharmacy**. St. Louis: Elsevier. 2002. 267 p.

FRANTZ, C. *et al.* The extracellular matrix at a glance. **J Cell Sci**. V. 123, p. 4195-4200. 2010.

GELSE, K. *et al.* Collagens - structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. V.55, p. 1531 – 1546, Ago 2003. Disponível em <<http://www.doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>> Acesso em 04/04/18.

GILBERT, T. *et al.* Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**. V. 27, n. 19, p. 3675-83, 2006.

GILPIN A, YANG Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Res Int**. V. 9831534, 2017.

GOH, S-K. *et al.* Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. **Biomaterials**. V. 34, n. 28, p. 6760–6772, 2013.

GOH, S. K. Bio-engineered pâncreas with human embryonic stem cells and whole organ derived extracelular matrix scaffolds. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) - Universidade de Pittsburgh, 2015.

GOODHEW, P. J. *et al.* *Electron Microscopy and Analysis*. 3a ed. **CRC Press**. 2000. 264p.

GOOR, O. J. G. M. *et al.* From supramolecular polymers to multi-component biomaterials. **Chem. Soc. Rev.** Cambridge, v. 46, p. 6621-6637, Ago 2017.

GHOSH, P. *et al.* Microspheres containing decellularized cartilage induce chondrogenesis in vitro and remain functional after incorporation within a poly(caprolactone) filament useful for fabricating a 3D scaffold. **Biofabrication**. V. 10, n. 2, Fev 2018. Disponível em <<https://doi.org/10.1088/1758-5090/aaa637>> Acesso em 18/06/19.

GOVERNO DO BRASIL. Saiba quais são os critérios da lista de espera por transplantes. Disponível em < <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/09/saiba-quais-sao-os-criterios-da-lista-de-espera-por-transplantes>> Acesso em 15/03/18.

GRANGER, A.; KUSHNER, J. A. Cellular Origins of Beta Cell Regeneration: a Legacy view of Historical Controversies. **J Intern Med**. Hoboken, v. 266, n. 4, p. 325–338, Out 2009. Disponível em <<http://www.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02156.x>> Acesso em 22/03/19.

GROSS, E. Curso Teórico Prático de Técnicas em Microscopia Eletrônica. Universidade Estadual de Santa Cruz. Mar 2014, Ilhéus, Bahia.

GRUESSNER, A. C.; GRUESSNER, R. W. G. Pancreas Transplantation of US and Non-US Cases from 2005 to 2014 as Reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). **Rev Diabet Stud**. Bethesda, v. 13, n. 1, p. 35-58, Maio 2016. Disponível em <<https://doi.org/10.1900/RDS.2016.13.35>> Acesso em 25/05/19.

GUI, L. *et al.* Development of Decellularized Human Umbilical Arteries as Small-Diameter Vascular Grafts. **Tissue Engineering Part A**. 2009.

GUYETTE, J. P. *et al.* Perfusion decellularization of whole organs. **Nat Protoc.** V. 9, n. 6, p. 1451-1468, 2014.

HANIEL, J. Desenvolvimento e validação de equipamento de decelularização de órgão inteiro pelo método de perfusão. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - UFMG, Belo Horizonte, 2016.

HEALTH RESOURCES AND SERVICES ADMINISTRATION, HRSA. Organ Donation Statistics. Rockville, 2019. Disponível em <<https://www.organdonor.gov/statistics-stories/statistics.html>> Acesso em 25/05/19.

IDF. Diabetes Atlas 8th Edition. 2018. Disponível em <https://www.idf.org/e-library/welcome.html>. Acessado em 18/05/18.

JOHNS HOPKINS: Medicine, Pathology. The Pancreas. **The Sol Goldman Pancreatic Cancer Research Center**. Disponível em <http://pathology.jhu.edu/pancreas/basicoverview3.php?area=ba>. Acesso 26/05/18.

JOHN HOPKINS. Comprehensive Transplant Center. Maryland, 2019. Disponível em <<https://www.hopkinsmedicine.org/transplant/programs/kidney/pancreas.html>> Acesso em 25/03/19

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 12a ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda. 2013. 538p.

KABIRIAN, F.; MOZAFARI, M. Decellularized ECM-derived Bioinks: Prospects for the future. **Methods**. Abr 2019. Disponível em <<https://www.doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.04.019>> Acesso 18/06/19.

KAJBAFZADEH A. M. *et al.* A novel technique for simultaneous whole-body and multi-organ decellularization: umbilical artery catheterization as a perfusion-based method in a sheep foetus model. **Int J Exp Pathol**: v. 96, n. 2, p. 116–132, 2015.

KANG, D. W. *et al.* Decellularization of Human Nasal Septal Cartilage for the Novel Filler Material of Vocal Fold Augmentation. **J. Voice**. Amsterdam, v. 31, n. 127, p. 1–127, Jan 2017. Disponível em <<http://www.doi.org/10.1016/j.jvoice.2015.12.013>> Acesso em 29/05/19.

KATSUKI, Y. *et al.* Endocrine pancreas engineered using porcine islets and partial pancreatic scaffolds. **Pancreatology**. V. 16, n. 5. p. 922-930, 2016.

KEANE, T. J. *et al.* Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**. V. 33, n. 6, p. 1771-81, 2012.

KEANE, T. J. *et al.* Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods**. V. 84, p. 25-34, 2015.

KRAMSCHUSTER, A. *et al.* Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds. In: EBNESAJJAD, Sina. **Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications**. William Andrew 2012. p. 427-446.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**. New Series. Washington, v. 260, n. 5110, p. 920-926, Maio 1993. Disponível em <<https://www.jstor.org/stable/2885618>> Acesso em 22/03/18.

LEICA-MICROSYSTEMS. Brief Introduction to Coating Technology for Electron Microscopy. 28/8/2013. Disponível em <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/brief-introduction-to-coating-technology-for-electron-microscopy/>. Acesso em 27/10/19.

LI, F.; LI, W. *et al.* Low-molecular-weight peptides derived from extracellular matrix as chemoattractants for primary endothelial cells. **Endothelium**. Bethesda, v. 11, n. 3-4, p. 199-206, Maio-Ago. 2004. Disponível em <<https://doi.org/10.1080/10623320490512390>> Acesso em 17/05/19.

LU, H. *et al.* Comparison of decellularization techniques for preparation of extracellular matrix scaffolds derived from three-dimensional cell culture. **J Biomed Mater Res Part A**. Hoboken, v. 00A, Fev. 2012. Disponível em <<http://www.DOI.org/10.1002/jbm.a.34150>> Acesso 22/03/19.

MACCHIARINI, P. *et al.* Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. **Lancet**. London, v. 372, p. 2023–30, Dec. 2008. Disponível em <www.thelancet.com> Acesso em 25/03/19.

MACHER, B. A., GALILI, U. The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (α -Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. **Biochim Biophys Acta**. V. 80 n. 2, p. 75 – 88, fevereiro, 2008.

MAGHSOUDLOU, P. *et al.* Optimization of Liver Decellularization Maintains Extracellular Matrix Micro-Architecture and Composition Predisposing to Effective Cell Seeding. **PLoS ONE**. V. 11, n. 5, e0155324, 2016.

MARANGONI. Conheça as 11 principais raças de suínos e suas características. 2019. Disponível em <<https://confortoanimal.marangoni.com.br/conheca-as-11-principais-racas-de-suinos-e-suas-caracteristicas/>> Acesso em 25/05/19.

MARTINO, M. M. *et al.* Extracellular matrix and growth factor engineering for controlled angiogenesis in regenerative medicine. **FrontiersIn.org**. V. 3, n. 45, 8 p. Abr 2015.

MAYO CLINIC. Pancreas Transplant. Scottsdale, 2019. Disponível em <<https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/pancreas-transplant/about/pac-20384783>> Acesso em 25/03/19.

MILLER, Mark. 14th Century Painting Depicts Limb Transplant That Occurred 1,500 Years Ago. **Ancient Origins**. 2016. Disponível em <http://www.ancient-origins.net/human-origins-religions/14th-century-painting-depicts-limb-transplant-occurred-1500-years-ago-006154>. Acesso 15/06/18.

MIRMALEK-SANI, S. H. *et al.* Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. **Biomaterials**. V. 34, p. 5488-5495, 2013.

MORONI, F.; MIRABELLA, T. Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering. **Am J Stem Cells**. V. 3, n. 1, p. 1–20, 2014.

NAKAMURA, N. *et al.* Overview of the Development, Applications, and Future Perspectives of Decellularized Tissues and Organs. **ACS Biomater. Sci. Eng.** V. 3, p. 1236–1244, Nov 2017. Disponível em < <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsbiomaterials.6b00506?rand=3r41c2ec>> Acesso em 18/06/19.

NAPIERALA, H. *et al.* Engineering an endocrine Neo- Pancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. **Sci. Rep.** V. 7, n. 41777, 2017. Disponível em <<http://www.doi: 10.1038/srep41777>> Acesso em 17/04/18.

NHS. Type 2 Diabetes. 2018. Disponível em <<https://www.nhs.uk/conditions/type-2-diabetes/complications/>> Acesso em 14/03/18.

Nobelprize.org. The Discovery of Insulin. Disponível em <https://www.nobelprize.org/educational/medicine/insulin/discovery-insulin.html>. Acesso em 21/05/18.

OSWALDO CRUZ. Tratamento do Diabetes. Disponível em < <http://centrodeobesidadeediabetes.org.br/tudo-sobre-diabetes/tratamento-do-diabetes/>> Acesso em 15/03/18.

PANCREATIC CANCER UK. What is the pancreas. Disponível em <<https://www.pancreaticcancer.org.uk/information-and-support/facts-about-pancreatic-cancer/what-is-the-pancreas/>> Acesso em 14/03/18.

PAULSEN, F., *et al.* SOBOTTA- Atlas of Human Anatomy: Internal Organs. 15^a ed. Munique: Urban &Fischer. V 2, 2011 272 p.

PEARCE, J. Dr. Thomas E. Starzl, Pioneering Liver Surgeon, Dies at 90. **The New York Times**. 2017. Disponível em <https://www.nytimes.com/2017/03/05/science/dr-thomas-e-starzl-pioneering-liver-surgeon-dies-at-90.html>. Acesso em 11/06/18.

POORNEJAD, N. *et al.* The impact of decellularization agents on renal tissue extracellular matrix. **J. Biomater Appl.** Vol. 31, n.4, p 521–533, 2016.

PORTER, Eloise. History of Diabetes. **Healthline** 2017. Disponível em <<https://www.healthline.com/health/history-type-1-diabetes#1>> Acesso em 21/05/18.

REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES, RBT. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado. São Paulo, ano XXIV, n. 4. 2018. Disponível em <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2018/Lv_RBT-2018.pdf> Acesso em 25/05/19.

RETTNER, R. The 5 'New' Types of Diabetes, Explained. **Live Science** 2018. Disponível em <https://www.livescience.com/61917-diabetes-five-types.html>. Acesso 21/05/18.

RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. **Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR** Lyon, 2011. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3003457/>. Acesso em 04/04/18.

ROSA, P.S. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, **EMBRAPA**. Árvore do Conhecimento: Frigorífico/abatedouro. 2019. Disponível em http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/arvore/CONT000fc6b6h6d02wx5eo0a2ndxykorm9re.html Acesso em 03/07/18.

ROTHER, R. P.; SQUINTO, S. P. The α -Galactosyl Epitope: A Sugar Coating That Makes Viruses and Cells Unpalatable. **Cell**. V. 86, n. 185–188, 1996.

ROUCHI, A. H.; MAHDAVI-MAZDEH, M. Regenerative Medicine in Organ and Tissue Transplantation: Shortly and Practically Achievable? **Int J Organ Transplant Med**. Shiraz, v. 6, n. 3, p. 93–98, Ago 2015.

SASAKI, N.; ODAJIMA, S. Stress-Strain curve and Young's modulus of a collagen molecule as determined by the x-Ray diffraction technique. **Biomechanics**. Londres, v. 29, n. 5, p. 655-658. 1996.

SALVATORI, M. *et al.* Extracellular Matrix Scaffold Technology for Bioartificial Pancreas Engineering, State of the Art and Future Challenges. **J Diabetes Sci Technol**. V 8. N 1, 2014.

SAMOUILLAN, V. *et al.* The Use of Thermal Techniques for the Characterization and Selection of Natural Biomaterials. **Funct Biomater**. V.2, p. 230-248, 2011.

SENSINI, A.; CRISTOFOLINI, L. Biofabrication of Electrospun Scaffolds for the Regeneration of Tendons and Ligaments. **Materials**. Basel, v. 11, n. 10, p. ii, E1963, Oct. 2018. Disponível em <https://www.doi.org/10.3390/ma11101963> Acesso 26/02/19.

SHERIDAN, W. S. Mechanical characterization of a customized decellularized scaffold for vascular tissue engineering. **J Mech Behav Biomed**. V. 8, p. 58-70, 2012.

SKRZYŃSKI, S. *et al.* DSC Study of Collagen in Disc Disease. **J. Biophysics**. ID 819635. 4 p. Dez 2009. Disponível em <https://www.doi.org/10.1155/2009/819635> Acesso em 05/06/19.

STRUECKER, B. *et al.* Improved rat liver decellularization by arterial perfusion under oscillating pressure conditions. **J Tissue Eng Regen Med**. Hoboken, v. 11, n. 2, p. 531–541, Jun 2014. Disponível em <https://www.doi.org/10.1002/term.1948> Acesso em 29/05/19.

THEOCHARIS, A. D. *et al.* Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews** 97, 2016 p.4-27. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001> Acesso 25/05/18.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. FTIR Sample Techniques: Attenuated Total Reflection (ATR). 2019. Disponível em <https://www.thermofisher.com/br/en/home/>

industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html > Acesso em 13/06/19.

THOMPSON, D. M. *et al.* Reduced Progression of Diabetic Microvascular Complications With Islet Cell Transplantation Compared With Intensive Medical Therapy. **Transplantation**. V. 91, n. 3, p. 373-378, Fev 2011.

TÖPEL, I.; ZORGER, N.; STEINBAUER, M. Inflammatory diseases of the aorta. **Gefasschirurgie**. V. 21, Suppl 2, p. 80-86, 2016.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 9 ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA 2002. 1047 p.

TSUCHIYA, T. *et al.* Influence of pH on Extracellular Matrix Preservation During Lung Decellularization. **Tissue Eng Part C Methods**. New Rochelle, v. 20, n. 12, p. 1028-1036, Maio 2014.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ. Curso Teórico Prático de Técnicas em Microscopia Eletrônica. Ilhéus. 2014. Disponível em < http://www.uesc.br/centros/cme/arquivos/apostila_curso_cme.pdf> Acesso em 25/06/19.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO USP. Solução de PBS (*Phosphate-buffered saline*). Disponível em <<http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/pbs.pdf>> Acesso em 15/02/19.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES (HRSA). About Transplantation. Disponível em <https://optn.transplant.hrsa.gov/learn/about-transplantation/history/>. Acesso em 15/06/18.

VASUDEVAN, D. M. *et al.* Proteins: Structure and Function. In **Textbook of Biochemistry for Medical Students**. 7^a ed. Nova Deli: Jaypee. 2013. P 33-46.

VIDAL, B. C.; VOLPE, P. L. O. Differential scanning calorimetry and optical properties of collagen-dichroic azo ponceau ss complexes. **Rev Bras Ciênc Morfol**. BCCL, v. 22, n. 3, p. 149-153, Jul 2005.

WANG, H. L. *et al.* Practical Immunohistochemistry in Neoplastic Pathology of the Gastrointestinal Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas. **Arch Pathol Lab Med**. V. 9, p. 1155-1180, 2017.

DE WEVER, O. *et al.* Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. **Int J Cancer**. V.123, n. 10, p. 2229-38, Nov 2008.

WHO. Diabetes. Disponível em < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>> Acesso em 15/03/18.

WILKIN, T. J. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type I and type II diabetes. **Diabetologia**. Bristol, v. 44, n. 7, p. 914–922, Jul 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. Diabetes. Genebra, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>> Acesso em 25/03/19.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. ONT-WHO Global Observatory on Donation and Transplantation. Genebra, 2019. Disponível em <<http://www.Transplant-observatory.org/>> Acesso em 25/03/16.

YOUNG, F. G. Claude Bernard and the Discovery of Glycogen. **Br Med J**. London, v. 1, n. 5033, p. 1431–1437, Jun 1957. Disponível em <<http://www.doi.org/10.1136/bmj.1.5033.1431>> Acesso em 21/05/18.

ZHANG, Y. *et al*. Human skeletal muscle xenograft as a new preclinical model for muscle disorders. **Hum Mol Genet**. V. 23, n. 12, p. 3180-8, 2014.