

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SABRINA LORENTI

PADRONIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO
PARA *SCAFFOLDS* BIOLÓGICOS

UBERLÂNDIA

2019

SABRINA LORENTI

PADRONIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO
PARA *SCAFFOLDS* BIOLÓGICOS

Monografia de bacharelado apresentada como requisito parcial para a aprovação na disciplina TCC2 do Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientação: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Coorientação: Profa. Dra. Cláudia Mendonça Rodrigues

UBERLÂNDIA

2019

SABRINA LORENTI

PADRONIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO
PARA *SCAFFOLDS* BIOLÓGICOS

Monografia de bacharelado apresentada como requisito parcial para a aprovação na disciplina TCC2 do Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 25 de junho de 2020

BANCA EXAMINADORA:

Orientador (a): Luiz Ricardo Goulart

Bloco/Sala: 2E/sala 248 Ramal: 8440

Membro: Emilia Rezende Vaz

Bloco/Sala: 2E/ sala 248 Ramal: 8440

Membro: Lara Vecchi

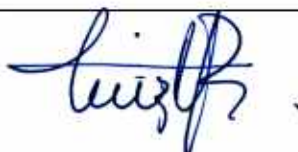
Bloco/sala: 2E/sala 248 Ramal: 8440

Coorientador (caso haja):

Claudia Mendonça Rodrigues

Bloco/sala: 2E/sala 248 Ramal: 8440

Assinatura do Orientador (a):



AGRADECIMENTOS

Venho por meio desta mensagem prestar meus agradecimentos,

A Deus, primeiramente, que sempre me deu forças para persistir em meus sonhos, nos momentos mais difíceis, e por iluminar meu caminho quando já sucumbia aos problemas onde não havia mais forças para seguir em frente.

Aos meus pais Sebastião e Elizabete e minha irmã, Natalia. Que são minha base, referência, os quais sempre me apoiaram, incentivaram e deram forças mesmo com a distância.

Aos meus amigos, os quais aturaram meus surtos, reclamações, desesperos, mal humor, choros e mil emoções juntas, sempre me dando forças para prosseguir. Obrigada por serem minha família de coração (Tais, Patrícia, Bruna, Diego, Helena, Rafaella, Débora, Allan, Maicon, Raianne, Clara).

Ao José Antônio, que me acolheu nos momentos de dificuldades, teve paciência, empatia e respeito em cada etapa. Que soube me animar, motivar e dar forças para continuar, quando desistir parecia a única opção.

A Queila, que se tornou uma mãe de consideração, dando conselhos, apoio sempre com muito amor e carinho.

Ao meu orientador Luiz Ricardo, que me recebeu e abriu as portas, me proporcionando a oportunidade de aprender e crescer, seja de maneira intelectual, ou como ser humano.

A pessoa maravilhosa, que me ensinou e teve paciência para me ajudar, entender minhas dificuldades e limitações. A quem “puxou minha orelha” quando necessário. Houve sim desentendimentos de nossa parte, brigamos, e, no fim das contas, “lavamos a roupa suja”. Reconhecemos nossas imperfeições, e realizamos um bom trabalho em equipe, com muito respeito e aprendizado, os quais irão perdurar por toda minha vida. Ela nunca me deixou desamparada. Fez elogios quando houve progressos, me apoiou nos momentos difíceis e, sem ajuda de Cláudia, eu jamais teria conseguido. Muito obrigada, Cláudia, por toda sua sensibilidade e compreensão.

A todos da equipe do Projeto Membranas, que sempre me ajudaram e deram apoio, vocês foram essenciais (Natassia, Matheus, Ludmilla, Roberta, Rafaella e Leticia).

A toda equipe do laboratório, juntamente com todos os técnicos. Enfim, a toda família Nanos.

RESUMO

Atualmente, no âmbito da medicina regenerativa diversos estudos têm sido desenvolvidos buscando mecanismos que possam tratar lesões, assim como substituir ou regenerar tecidos que não apresentam bom funcionamento. A engenharia de tecidos baseia-se no uso de matriz ou *scaffold* que serve como molde de sustentação para as células de interesse, de forma que sejam preservados fatores de crescimento, bem como moléculas de sinalização. A utilização de *scaffolds* biológicos tem sido bastante promissora por se tratar de matrizes naturais, no entanto, há a possibilidade de reação imunogênica e rejeição, sendo necessária a aplicação de técnicas para eliminação de células. Deste modo, o objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de descclularização que viabilize a aplicação de *scaffold* biológico proveniente de esclera suína no âmbito da medicina regenerativa. Para isso, foram testados cinco diferentes protocolos com as devidas modificações baseados em um protocolo modelo, visando padronizar um ensaio que respeitasse as exigências determinadas por Crapo, Gilbert e Badylak (2011). Após a verificação da eficiência da descclularização, observou-se que os Protocolos A, B e C (Benzonase 1 U/mL, 5 U/mL e 10 U/mL, respectivamente) não foram eficientes, apresentando conteúdo de DNA genômico acima do preconizado. Avaliando os Protocolos D (DNase/RNase 80 U/mL) e E (DNase/RNase 8 U/mL, lavagem com água pós tampão detergente e rotações de 100 rpm), a quantificação de DNA extraído apresentou-se de acordo com o limite estabelecido para uma descclularização eficiente, com ausência de DNA genômico residual e histologia compatível com material descclularizado. No entanto, o Protocolo E foi considerado ideal devido a possível eliminação de resíduos de SDS, tornando o biomaterial menos citotóxico e biocompatível. Este protocolo foi reprodutível para o uso com maiores quantidades de amostras, demonstrando ser eficaz na aplicação em escala industrial e ainda pode ser considerado um protocolo rápido e com importante custo-benefício.

Palavras-chave: *Scaffold*. Esclera. Descclularização. Medicina regenerativa.

ABSTRACT

Currently, in the field of regenerative medicine several studies have been developed seeking mechanisms that can treat injuries, as well as replace or regenerate tissues that do not show good functioning. Tissue engineering is based on the use of matrix or scaffold that serves as a support template for cells of interest so that growth factors as well as signaling molecules are preserved. The use of biological scaffolds has been very promising because they are natural matrices, however, there is the possibility of immunogenic reaction and rejection, being necessary the application of techniques for elimination of cells. Thus, the objective of this study was to develop a decellularization protocol that allows the application of biological scaffold from porcine sclera in regenerative medicine. For this, five different protocols were tested with the appropriate modifications based on a model protocol, aiming to standardize an assay that respects the requirements determined by Crapo, Gilbert and Badylak (2011). After verification of the efficiency of the decellularization, it was observed that the Protocols A, B and C (benzonase 1 U/mL, 5 U/mL and 10 U/mL, respectively) were not efficient, presenting genomic DNA content higher than recommended. The Protocols D (DNase/RNase 80 U/mL) and E (DNase/RNase 8 U/mL, washing with water after detergent buffer and rotations of 100 rpm) presented the quantification of extracted DNA in accordance with the limit for efficient decellularization, with absence of residual genomic DNA and histology compatible with decellularized material. However, the E protocol was considered ideal due to the possible elimination of SDS residues, making the biomaterial less cytotoxic and biocompatible. This protocol was reproducible for application with larger amounts of samples, proving to be effective in the application on an industrial scale and can still be considered a fast and cost-effective protocol.

Keywords: Scaffold. Sclera. Decellularization. Regenerative medicine.

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1: Descrição do protocolo de descclularização modelo e protocolos testes com as devidas modificações realizadas (em negrito)	15
Figura 1: Globo ocular suíno.....	17
Figura 2: Esclera limpa, antes do processo de descclularização	17
Figura 3: Concentração de DNA genômico total por miligrama de escleras controles (<i>in natura</i>) e descclularizadas pelos Protocolos A, B, C, D e E.....	19
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose do DNA total extraído das amostras controle (<i>in natura</i>) e após os Protocolos de descclularização A, B, C, D e E. Utilizou-se o marcador de peso molecular de 1 kb (M- 1 kb plus DNA Ladder, <i>Invitrogen</i>)	19
Figura 5: Análise histológica de esclera suína controle (<i>in natura</i>) e após aplicação dos Protocolos de descclularização A, B, C, D e E. Setas sinalizam resíduos nucleares .	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Celsius
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
GAG	Glicosaminoglicanos
h	horas
HE	Hematoxilina-Eosina
MEC	Matriz Extracelular
mg/L	Miligramas por Litro
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	minutos
mM	Concentração Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
ng/mg	Nanogramas por Miligramas
NK	<i>Natural Killer</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino
PLGA/Poli	Polímero Ácido Lático-co-ácido Glicólico
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotação Por Minutos
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBS	Tampão Fosfato Salino
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
U/ml	Microlitros por Mililitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	METODOLOGIA.....	14
3.1	Obtenção dos <i>scaffolds</i> biológicos.....	14
3.2	Padronização do protocolo de descelularização.....	14
3.3	Verificação da eficiência da descelularização.....	16
3.3.1	<i>Extração, quantificação e análise da integridade do DNA</i>	16
3.3.2	<i>Análise histológica</i>	16
4	RESULTADOS.....	17
5	DISCUSSÃO.....	21
6	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o cenário dos transplantes de órgãos apresenta obstáculos, como a disponibilidade de doadores cada vez menor. Na perspectiva de aprimorar este cenário, a busca por aplicações no campo da medicina regenerativa é cada vez mais frequente. Esta ciência busca oferecer mecanismos para a substituição ou regeneração de tecidos e órgãos que já não são mais eficazes na sua funcionalidade, assim como no tratamento de lesões teciduais (GILPIN; YANG, 2017). Estudos demonstram sucesso na renovação de tecidos e órgãos, como pele, fígado, coração, rim e tecido ósseo, além da correção de falhas congênitas (DZOBO et al., 2018).

O desenvolvimento da medicina regenerativa é baseado no uso de matriz ou *scaffold* que funcionará como um arcabouço de sustentação para células de interesse, fatores de crescimento, moléculas de sinalização, dentre outros (BARBANTI et al., 2005). Os *scaffolds* oferecem propriedades estruturais, bioquímicas e biomecânicas capazes de direcionar e regular o comportamento celular e o desenvolvimento tecidual (GILPIN; YANG, 2017). As células utilizadas na engenharia de tecidos podem ser autólogas (advindas do próprio indivíduo), alogênicas (advindas de outro indivíduo de mesma espécie) ou xenogênicas (advindas de indivíduos de espécie diferente) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Os *scaffolds* podem ser de origem sintética ou biológica. O uso de *scaffolds* sintéticos apresentam vantagens devido suas propriedades químicas e físicas, que podem ser manipuladas de acordo com o objetivo proposto e tipo celular a ser conjugado. O polímero ácido lático-co-ácido glicólico (PLGA ou Poli) é intensamente aplicado na engenharia de cartilagem e de tecido ósseo devido a sua rigidez e topografia, que proporcionam boas condições de crescimento e diferenciação celular. Já os polímeros hidrofílicos, por sua vez, são utilizados em tecidos mais maleáveis devido à capacidade de ajustar-se ao local (FRANÇA et al., 2005; GILPIN; YANG, 2017). Outro exemplo de biomateriais sintéticos são os metálicos, que têm sido aplicados, por exemplo, na reconstituição óssea de artroplastia total de joelho, procedimento cirúrgico realizado quando não há mais a recuperação funcional da articulação (FERREIRA, 2012).

Os *scaffolds* biológicos, diferentemente dos sintéticos, são compostos de Matriz Extracelular (MEC) natural derivados de tecidos, como tendões, ligamentos, submucosa do intestino delgado, bexiga e fígado (BADYLAK; GILBERT, 2008; MENG; MODO; BADYLAK, 2014). Metcalf, Savoie e Kellum (2002) descreveram, com sucesso, xenoenxerto utilizando tecido de submucosa de intestino delgado para reparo de lesões de manguito rotador (grupo de músculos e tendões que tem como função dar estabilidade ao ombro) humano. Meng,

Modo e Badylak (2017) também relataram as vantagens do uso de *scaffolds* biológicos no reparo de lesões de sistema nervoso central e dura-máter.

Embora o uso de *scaffolds* sintéticos seja vantajoso por ser de fácil manipulação, a manutenção da sustentação necessária para as diversas aplicações da medicina regenerativa ainda é um desafio no uso deste tipo de material. Existem relatos de que estes *scaffolds* não são suficientes para suportar a fixação, proliferação e diferenciação dos vários tipos celulares que compõem alguns tecidos, como fígado, rim, pulmão, coração e outros órgãos complexos (BADYLAK, 2002; MENG; MODO; BADYLAK, 2014). Os *scaffolds* biológicos, por sua vez, ao apresentarem matriz extracelular natural, podem manter fatores de crescimento e elementos estruturais, como elastina, fibronectina e colágeno, fornecendo ambiente propício para adesão, diferenciação e proliferação celular (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

Com relação aos transplantes dos *scaffolds* existem três tipos, que variam de acordo com a espécie do doador e a espécie do receptor. Entre indivíduos da mesma espécie e geneticamente idênticos ocorre o autoenxerto. No caso de indivíduos da mesma espécie, no entanto, geneticamente distinto é feito o transplante do tipo aloenxerto. Já em indivíduos de diferentes espécies é aplicada a técnica de xenoenxertos (ABBAS, 2012).

O transplante entre espécies diferentes (xenoenxerto) pode apresentar resposta mediada por células, principalmente macrófagos e células NK (*natural killer*) que ao se aderirem no tecido transplantado, podem promover a formação de infiltrado celular, caracterizando quadros inflamatórios, além da capacidade de ocasionar morte celular (BADYLAK; GILBERT, 2008; WATIER et al., 1996).

Para reduzir ou anular as chances de reação imunogênica, a descclularização é uma técnica muito utilizada, pois elimina a presença de possíveis partículas antigênicas (BADYLAK, 2002). Essa estratégia busca fazer a remoção das células do tecido em questão, bem como eliminar o material genético ali presente e manter os elementos da matriz extracelular, preservando as propriedades mecânicas necessárias à manutenção da funcionalidade do *scaffold* (GILPIN; YANG, 2017). A descclularização envolve certo rompimento da MEC, no entanto, a seleção de agentes descclularizantes que resultem no menor dano possível a matriz extracelular é necessária. Esses agentes são escolhidos de acordo com a natureza do tecido ou órgão, e pode ser realizada a partir de procedimentos químicos, enzimáticos, físicos ou combinativos (GURUSWAMY DAMODARAN; VERMETTE, 2018).

Os procedimentos químicos envolvem principalmente o uso de agentes alcalinos, ácidos, detergentes ou soluções hipertônica e hipotônicas. No processo de descclularização os reagentes alcalinos e ácidos assumem o papel de dissolverem, lavarem os componentes

celulares e ácidos nucleicos, respectivamente. No entanto, vale ressaltar que é necessário cautela durante o uso destes compostos, de modo a manter um equilíbrio entre a descclularização eficaz e a ausência de danos à MEC (GURUSWAMY DAMODARAN; VERMETTE, 2018; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015). Já os detergentes podem ser iônicos, não iônicos e zwitteriônicos, sendo que estes últimos são determinados por cargas elétricas. Os detergentes atuam efetivamente na solubilização da membrana celular, dissociando o ácido desoxirribonucleico (DNA) das proteínas, porém podendo ter como consequência a remoção e destruição de componentes importantes da matriz extracelular (CHOY et al., 2010; GURUSWAMY DAMODARAN; VERMETTE, 2018; WILSON et al., 2013). O uso alternado de soluções hipotônicas e hipertônicas em imersão realizam a lise celular por efeito osmótico. A solução hipotônica leva ao aumento da hidratação celular, sobrecarregando-a, fazendo com que se rompa, enquanto a solução hipertônica vai favorecer a separação entre material genético e proteínas (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; KHEIR et al., 2011; WILSON et al., 2013).

Além disso, estudos demonstram que o uso de procedimentos detergente-enzimáticos permite a remoção completa de resíduos celulares, assim como a degradação de ácidos nucleicos de forma mais efetiva e simples (TOTONELLI et al., 2012; ZAMBAITI et al., 2019). Segundo o trabalho de Zambaiti e colaboradores (2019), para fazer a descclularização de estômagos de ratos foram necessárias apenas dois ciclos enzimáticos para fazer toda a remoção e manter os componentes da matriz extracelular como o colágeno, fibronectina, laminina e elastina preservados, porém com redução de glicosaminoglicanos. Como agentes enzimáticos podemos citar: nucleases, tripsina, collagenase lipase etc. (GILPIN; YANG, 2017).

Por fim as técnicas físicas agem de forma simultânea aos procedimentos químicos e enzimáticos, podendo ser realizadas utilizando o congelamento, pressão, sonicação, assim como por meio da perfusão no caso de tecidos vascularizados ou da combinação de imersão e agitação em tecidos que possuem pouca ou nenhuma vascularização. Estas técnicas atuam principalmente na lise e remoção de celular (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GEERTS et al., 2016; GILPIN; YANG, 2017; TOTONELLI et al., 2012; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

Associado aos procedimentos citados, alguns estudos demonstram a importância da realização de lavagens dos tecidos de forma prolongada para diminuir a citotoxicidade devido à presença de resíduo dos reagentes utilizados na descclularização (GURUSWAMY DAMODARAN; VERMETTE, 2018; HONG et al., 2018; KHEIR et al., 2011).

Tendo em vista a importância do processo de descclularização na obtenção de scaffolds biológicos aplicáveis com segurança no âmbito da medicina regenerativa, por meio deste estudo torna-se essencial a padronização de um protocolo eficiente para o tecido escleral suíno, levando em conta as individualidades próprias do tecido e sua composição. Desta forma, busca-se incorporar à medicina regenerativa um novo tecido biológico eficazmente descclularizado e com grande potencial para a aplicação na regeneração de tecidos em geral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo de descclularização que viabilize a aplicação de *scaffold* biológico proveniente de esclera suína no âmbito da medicina regenerativa.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Padronizar um protocolo de descclularização de *scaffold* biológico.
- ✓ Avaliar a eficácia do processo de descclularização por meio da quantificação e análise da integridade do DNA extraído e análise histológica (coloração de hematoxilina eosina - HE) das escleras descclularizadas.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção dos *scaffolds* biológicos

Amostras de globo ocular de suínos foram coletadas em frigorífico que processa exclusivamente suínos, no estado de Minas Gerais. Imediatamente após a coleta, as amostras foram imersas em solução salina de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) e refrigeradas em recipiente térmico durante o deslocamento ao laboratório. O tempo de transporte até laboratório e início do processamento foi o mais breve possível, sempre inferior a 10h. O processamento das amostras visou retirar componentes oculares adjacentes à esclera, com auxílio de instrumentos cirúrgicos (pinças, bisturis etc.). As escleras extraídas foram higienizadas em água corrente para posterior submissão ao protocolo de descclularização.

3.2 Padronização do protocolo de descclularização

Após o processamento para a extração do tecido escleral e higienização inicial em água corrente, as amostras foram submetidas aos protocolos testes descritos no Quadro 1, com as devidas modificações baseadas no protocolo modelo de Kasbekar e colaboradores (2018).

Este protocolo de descclularização fundamentou-se na combinação de reagentes químicos e enzimáticos. De modo resumido, para induzir a lise celular utilizou-se tampão hipotônico (TRIS 10 mM, EDTA 0,1%). Em seguida, para eliminação dos remanescentes citoplasmáticos e nucleares utilizou-se tampão detergente (TRIS 10 mM, EDTA 0,1%, SDS 0,1%) e, por fim, para degradação de DNA e ácido ribonucleico (RNA) residuais, utilizou-se tampão contendo nuclease (Benzonase 1 U/ml). O tampão isotônico (TRIS/NaCl) foi utilizado durante as lavagens. As incubações foram realizadas sob agitação (150 – 200 rpm) e temperaturas específicas para ação de cada reagente (Quadro 1).

A partir do protocolo modelo testado, realizou-se principalmente modificações nas concentrações do tampão contendo nuclease, sendo que no último protocolo (E) foram realizadas alterações mais específicas quanto a rotação da incubação, além de um passo adicional de lavagem com água destilada pós tampão detergente (Quadro 1).

Para a aplicação dos Protocolos de A a D foram utilizados fragmentos de escleras e os procedimentos realizados em tubos cônicos de 50ml. Frente aos resultados obtidos nos Protocolos de A a D, aplicou-se as modificações descritas no Protocolo E, sendo este realizado utilizando 20 escleras inteiras em erlenmeyer de 3 litros (utilizando 1 litro de cada reagente

citado). Com isto, buscou-se avaliar a reprodutibilidade do processo para tecido íntegro e em maior quantidade, visando uma futura aplicação do protocolo em larga escala.

Quadro 1: Descrição do protocolo de descelularização modelo e protocolos testes com as devidas modificações realizadas (em negrito)

PROTOCOLO MODELO	PROTOCOLOS TESTES				
Kasbekar et al. (2018)	A	B	C	D	E
1º Lavagem Tampão Isotônico (TBS) TRIS/NaCl 20min, 200rpm, 25°C, por 3 vezes	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	Rotação a 100 rpm
2º Lise com Tampão Hipotônico TRIS 10mM, EDTA 0,1%, pH=8, 18h, 200 rpm, 4°C	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	Rotação a 100 rpm
3º Incubação com Tampão Detergente TRIS 10mM, EDTA 0,1%, SDS 0,1%, 24h, 200rpm, 25°C	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	Rotação a 100 rpm
—————	—————	—————	—————	—————	4º Lavagem com água destilada por 4h, 100rpm, 25°C, com troca da água na metade do tempo
4º Lavagem Tampão Isotônico (TBS) TRIS/NaCl 20min, 200rpm, 25°C, por 3 vezes	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	Rotação a 100 rpm
5º Incubação com Tampão de Nuclease TRIS 50mM, MgCl ₂ , Benzonase 1 U/mL, 3h, 150rpm, 37 C	IDEM Kasbekar et al. (2018)	Benzonase 5 U/mL (Sigma-Aldrich)	Benzonase 10 U/mL (Sigma-Aldrich)	DNase/RNase 80 U/mL (200 mg/L) (Sigma-Aldrich)	DNase/RNase 8 U/mL (20 mg/L) (Sigma-Aldrich)
6º Lavagem tampão PBS/EDTA 0,1% por 2 vezes	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)	IDEM Kasbekar et al. (2018)

C: Celsius; EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético; h: horas; mg/L: Miligramas por Litro; min: minutos; mM: Concentração Milimolar; MgCl₂: Cloreto de Magnésio; PBS: Tampão Fosfato Salino; rpm: rotações por minuto; SDS: Dodecil Sulfato de Sódio; TBS: Tampão Fosfato Salino; TRIS/NaCl: Tris(hidroximetil)aminometano/Cloreto de Sódio; U/ml: Unidades por Mililitros.

Fonte: Acervo próprio.

Para avaliação e comparação dos protocolos testados utilizou-se escleras *in natura*, não descelularizada como controle.

3.3 Verificação da eficiência da descelularização

De acordo com Crapo, Gilbert e Badylak (2011) ao final do processo de descelularização, as amostras devem apresentar quantidade inferior a 50 ng de DNA por miligrama de matriz extracelular (peso seco), além de não apresentar DNA íntegro e material nuclear visível quando coradas com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI), HE. Sendo assim, para confirmar o sucesso dos protocolos testados, as amostras foram submetidas a extração, quantificação e análise da integridade do DNA, assim como avaliação histológica para verificação de resíduos celulares.

3.3.1 Extração, quantificação e análise da integridade do DNA

Após o término dos protocolos de descelularização o DNA genômico total foi extraído e quantificado a partir de 25-30 mg de esclera *in natura* e descelularizadas. As amostras foram submetidas à extração de DNA com auxílio do kit *DNeasy® Blood & Tissue* (Qiagen). Resumidamente, os fragmentos foram submetidos à uma incubação overnight para digestão do material à temperatura de 56° C. Posteriormente, seguiu-se o passo a passo de extração do DNA, com auxílio de colunas de separação de biomoléculas e reagentes específicos. As amostras foram, em seguida, quantificadas pelo *NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000* a 260 nm e submetidas à visualização por eletroforese em gel de agarose 1%.

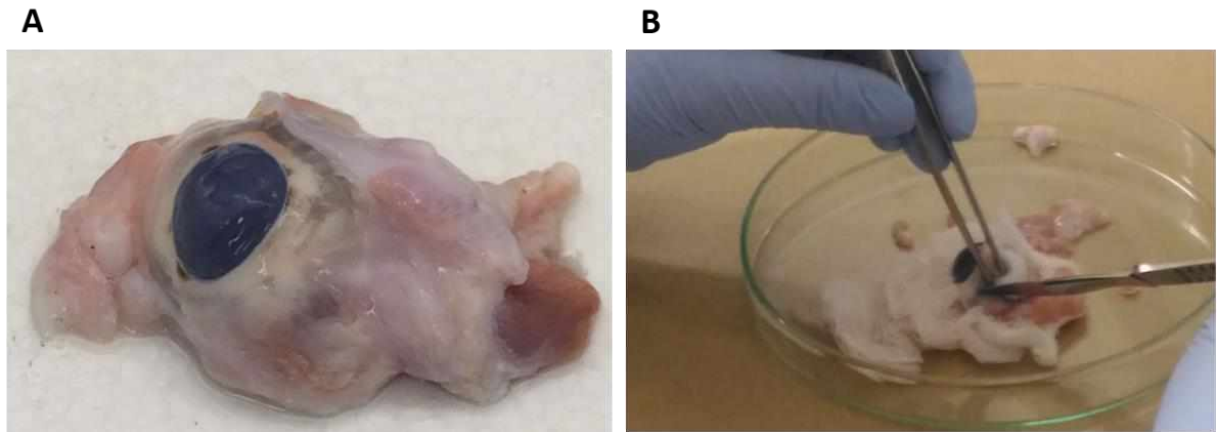
3.3.2 Análise histológica

Fragmentos aleatórios das mesmas escleras *in natura* e descelularizadas que foram submetidas à extração e quantificação de DNA foram fixados em formol 10% por no mínimo 48h, para posterior realização da análise histológica. Para isso, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%), diafanizados em xilol e embebidos em parafina. Microsecções foram transferidas para lâminas de vidro e coradas com hematoxilina-eosina para avaliação da presença de resíduos celulares e comprovação da descelularização. As lâminas foram visualizadas em microscópio de luz UV.

4 RESULTADOS

Após o recebimento das amostras e processamento do globo ocular (Figura 1), as escleras extraídas foram higienizadas em água corrente para posterior submissão aos protocolos de descclularização (Figura 2).

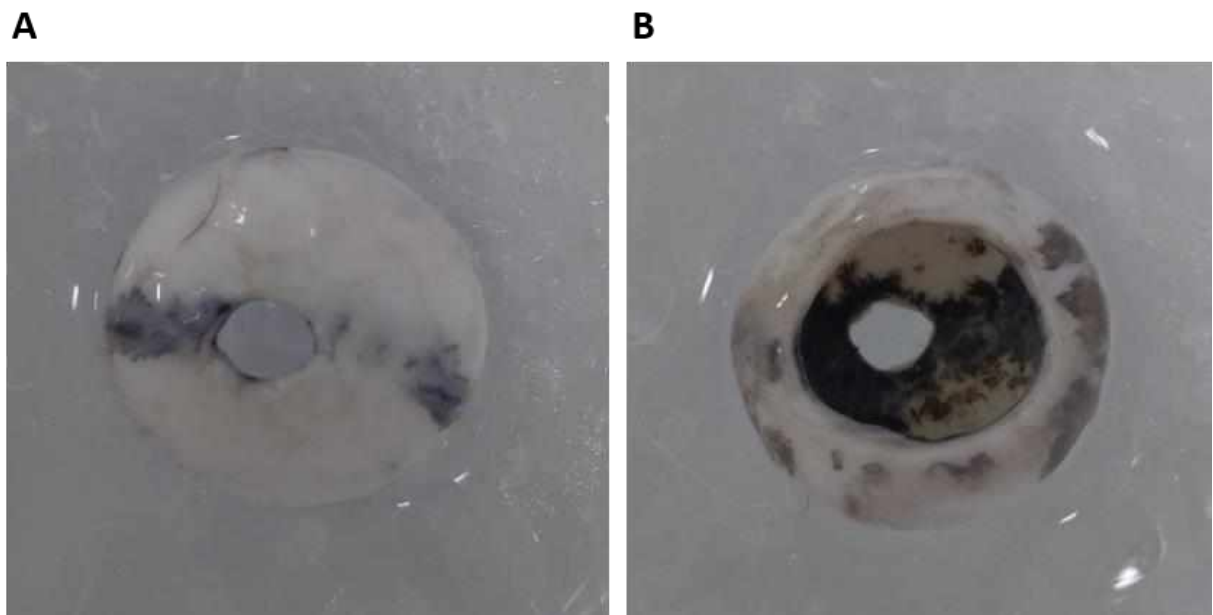
Figura 1: Imagens representativas do Globo ocular suíno.



A: Olho suíno *in natura*, conforme recebido no Laboratório, ainda com os tecidos naturalmente pertencentes ao olho suíno; **B:** Corte dos tecidos, com a finalidade de limpar o material deixando somente o tecido escleral.

Fonte: Acervo próprio.

Figura 2: Imagens representativas da esclera limpa, logo antes do processo de descclularização.



A: Superfície externa; **B:** Superfície interna.

Fonte: Acervo próprio.

A partir da aplicação do Protocolo A, que segue rigorosamente o protocolo modelo proposto, não obtivemos sucesso na eliminação do material celular, obtendo quantificação de DNA acima do ideal para uma amostra descelularizada. Seguimos então com o aumento da concentração de Benzonase (Protocolos B e C), porém ainda sem sucesso, com a concentração de DNA em torno de 151,6 e 147,1 ng/mg de esclera, considerado ainda acima do preconizado. Partindo então para uso de DNase/RNase em alta concentração (Protocolo D) conseguimos atender aos critérios de descelularização descritos por Crapo e colaboradores (2011), com uma concentração de DNA de 9,6 ng/mg de esclera. Por fim, ajustando a concentração de DNase/RNase, aplicando menores rotações e passo extra de lavagem com água após uso de tampão detergente para escleras íntegras (Protocolo E), também obtivemos tecidos eficientemente descelularizados (15,5 ng/mg de esclera) (Tabela 1 e Figura 3).

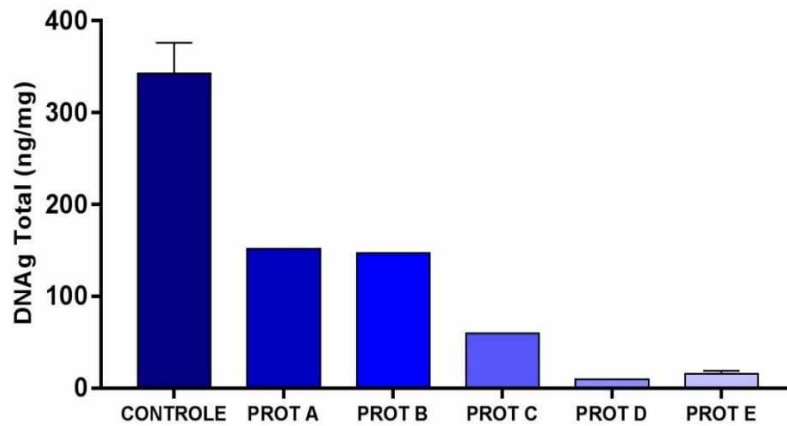
Tabela 1: Quantificação de DNA genômico (ng/uL), relações 260/280 e 260/230 de amostras controle (*in natura*) e descelularizadas pelos protocolos testes A-E

TESTES	AMOSTRAS	QUANTIFICAÇÃO NANODROP (Spectrophotometer ND -1000)			[] ng/mg DE ESCLERA
		[] ng/ul	A260/280	A260/230	
CONTROLE (<i>in natura</i>)	1	79,8	1,83	1,52	342,7
	2	100,0	1,87	1,74	
Protocolo A	1 (Benzo 1 U/mL)	45,5	1,86	1,78	151,6
Protocolo B	1 (Benzo 5 U/mL)	41,2	2,28	1,91	147,1
Protocolo C	1 (Benzo 10 U/mL)	18,5	1,84	1,53	59,7
Protocolo D	1 (DNase/RNase 80 U/mL)	2,4	1,87	0,96	9,6
	1 (DNase/RNase 8 U/mL - Água-Rotações)	4,2	1,74	0,46	
Protocolo E	2 (DNase/RNase 8 U/mL - Água-Rotações)	3,6	2,02	0,54	15,5
	3 (DNase/RNase 8 U/mL - Água-Rotações)	6,1	1,63	0,72	
	4 (DNase/RNase 8 U/mL - Água-Rotações)	3,8	1,65	0,72	
	5 (DNase/RNase 8 U/mL - Água-Rotações)	4,2	6,22	0,27	

ng/mg: Nanogramas por Miligramas; U/ml: Unidades por Mililitros.

Fonte: Equipe do projeto.

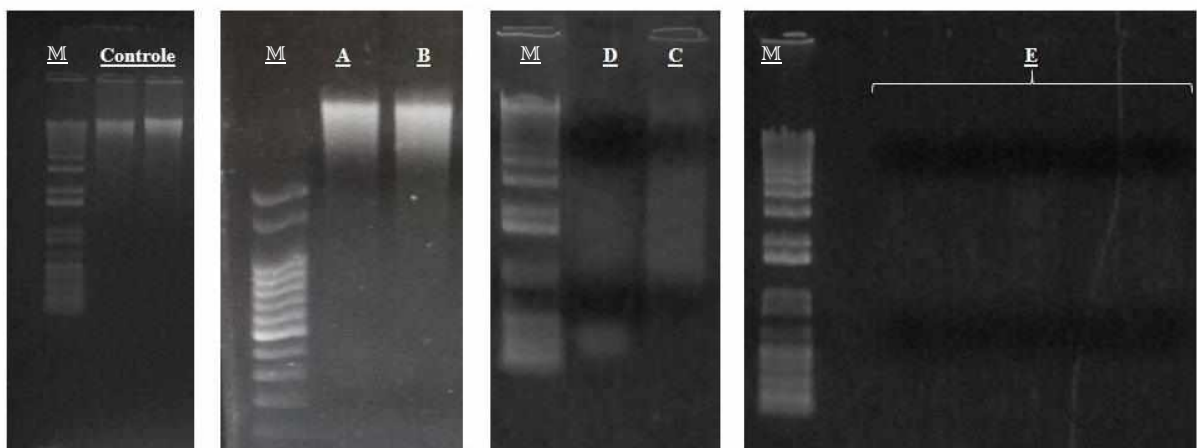
Figura 3: Concentração de DNA genômico total por miligrama de escleras controles (*in natura*) e descelularizadas pelos Protocolos A, B, C, D e E



Fonte: Acervo próprio.

As imagens obtidas após a realização da eletroforese em gel de agarose 1% corroboram os resultados obtidos na quantificação do DNA, demonstrando presença de DNA gnômico nas amostras controle (Figura 4). Após aplicação dos Protocolos A e B, observa-se ainda a presença de DNA genômico, porém com arraste indicando degradação. O Protocolo C não apresentou banda correspondente a DNA genômico, entretanto, ainda observa-se resíduos de DNA degradado (arraste). Já na utilização dos Protocolos D e E observou-se a ausência de DNA gnômico residual ou arraste correspondente a DNA degradado (Figura 4).

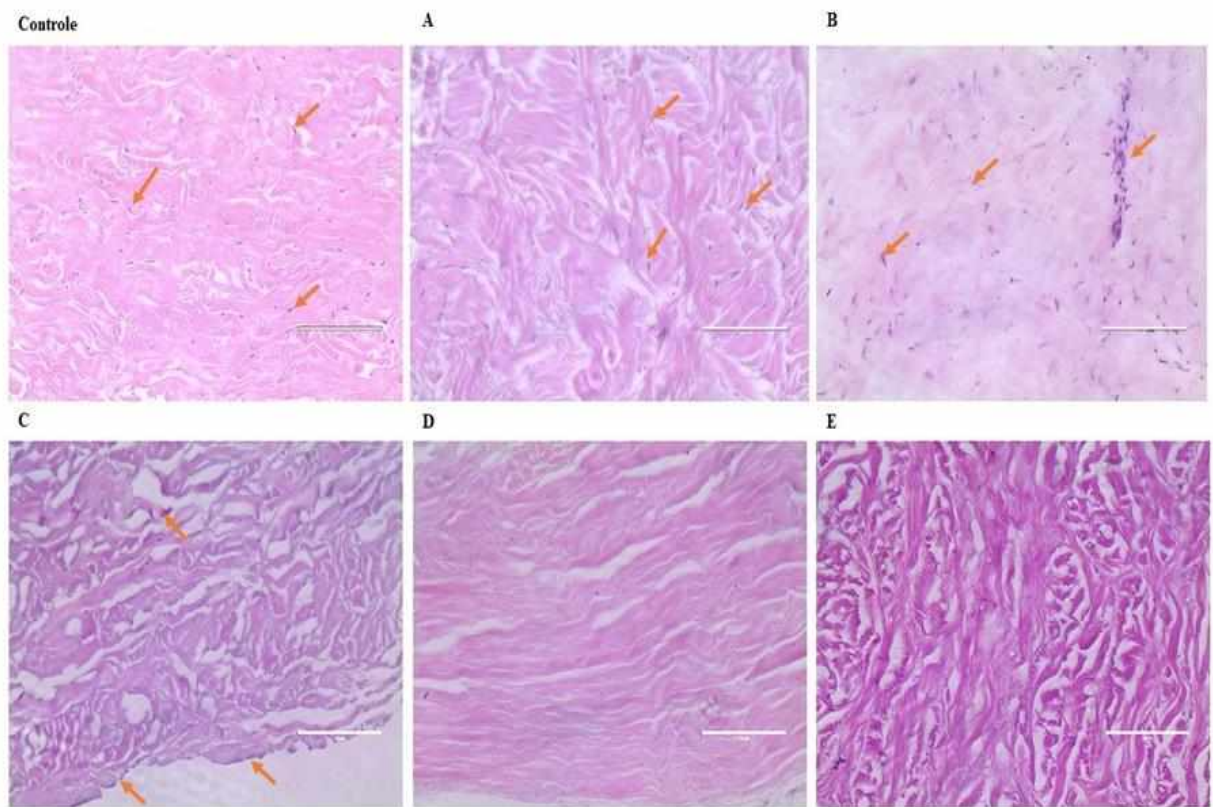
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose do DNA total extraído das amostras controle (*in natura*) e após os Protocolos de descelularização A, B, C, D e E. Utilizou-se o marcador de peso molecular de 1 kb (M- 1 kb plus DNA Ladder, *Invitrogen*)



Fonte: Acervo próprio.

Por meio da análise histológica (coloração de HE) evidenciou-se que as amostras controles (*in natura*) possuem núcleos intactos (pontos roxos) (Figura 5). Na avaliação das imagens referentes aos Protocolos A, B e C nota-se resquícios de núcleos em determinados pontos, demonstrando que estes protocolos não foram eficientes. Por outro lado, na aplicação dos Protocolos D e E não foi possível observar presença de núcleos, demonstrando sucesso na descelularização do material a partir destes ensaios (Figura 5).

Figura 5: Análise histológica de esclera suína controle (*in natura*) e após aplicação dos Protocolos de descelularização A, B, C, D e E. Setas sinalizam resíduos nucleares.



Fonte: Acervo próprio.

5 DISCUSSÃO

A padronização de um protocolo de descelularização eficiente é de suma importância para a obtenção de *scaffolds* biocompatíveis e aplicáveis na medicina regenerativa, uma vez que esta técnica é capaz de eliminar a presença de possíveis partículas antigênicas (BADYLAK, 2002). No entanto, um protocolo eficaz na eliminação de células e que seja capaz de manter os elementos da matriz extracelular, preservando as propriedades mecânicas necessárias à manutenção da funcionalidade do *scaffold* ainda é um desafio (GILPIN; YANG, 2017). Por meio deste estudo, foi proposto a descrição de um protocolo de descelularização que viabilizasse a aplicação do *scaffold* biológico de origem animal em questão, no âmbito da medicina regenerativa. Deste modo, foi utilizado o protocolo de Kasbekar et al. (2018) como modelo, além de algumas modificações. Assim, foi possível obter um protocolo ideal (Protocolo E) que atendeu de modo eficiente aos critérios de descelularização proposto por Crapo, Gilbert e Badylak (2011), para um *scaffold* proveniente de tecido escleral suíno.

O processo de descelularização fundamenta-se na aplicação de técnicas químicas, enzimáticas, físicas ou uma combinação destas. O protocolo modelo de Kasbekar et al. (2018) baseou-se no princípio de que o uso de tampões hipotônicos são eficazes na lise de células e na interrupção da adesão destas à MEC. No entanto, uma vez que este processo ainda deixa resquícios celulares, o uso de tampões detergentes torna-se crucial na solubilização de membranas celulares e nucleares, removendo de forma efetiva os restos nucleares e proteínas citoplasmáticas. Além disso, o uso de tampão contendo nucleases atua como passo final para a degradação de todas as formas de DNA e RNA remanescentes (de cadeia simples, dupla cadeia, linear e circular), tornando o tecido eficientemente descelularizado (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILPIN; YANG, 2017; KASBEKAR et al., 2018).

Neste estudo, aplicando o Protocolo A, que seguiu fielmente o protocolo de Kasbekar et al. (2018), não se atingiu uma descelularização eficiente. Segundo Gilbert, Sellaro e Badylak (2006), a eficácia dos protocolos de descelularização não dependem somente de métodos químicos, enzimáticos e físicos competentes, mas também da origem do tecido e sua composição. No protocolo modelo os autores realizaram a descelularização de tecido conjuntivo bulbar humano, enquanto o proposto neste estudo se trata de tecido escleral suíno, o que em parte pode justificar a descelularização ineficiente utilizando o Protocolo A (modelo). A partir disso, foram realizadas modificações no protocolo modelo aumentando a concentração

de benzonase (nuclease utilizada no processo) em busca de uma melhor descelularização (Protocolos B e C).

A Benzonase (nuclease de *Serratia marcescens*) é uma endonuclease promíscua que ataca e degrada todas as formas de DNA e RNA (cadeia simples, dupla cadeia, linear e circular) (NESTLE; ROBERTS, 1969). No entanto, nas concentrações utilizadas nos Protocolos de A a C não foi possível alcançar o limite de DNA/mg de tecido exigido para uma descelularização eficiente. Sendo assim, observando a ausência de bons resultados, foi proposto o uso de nucleases (DNase/RNase) em combinação e em alta concentração substituindo a Benzonase. Segundo o estudo de Philips e colaboradores (2018), o uso de DNase/RNase resultaram na remoção bem-sucedida do material nuclear, criando um scaffold promissor para aplicação na regeneração de nervo periférico. Sendo assim, o ensaio de descelularização contendo incubação concomitante de DNase e RNase, atingiu uma quantificação de DNA residual de apenas 9,6 ng/mg de tecido escleral, com ausência de DNA íntegro pela eletroforese e histologia compatível com tecido descelularizado (Protocolo D).

A partir do sucesso obtido com o Protocolo D e frente à necessidade da reprodutibilidade do ensaio em escala industrial (rapidez, simplicidade e baixo custo), foi testado um novo protocolo (E) utilizando escleras inteiras e em maior quantidade (20 escleras). Sendo assim, a concentração de DNase/Rnase foi reajustada para uma menor concentração e uma melhor economia no processo. Além disso, foi adicionado um passo de lavagem com água destilada, para eliminação de SDS residual. Para a solubilização de membranas celulares, detergentes iônicos como o SDS e não iônicos como Triton X-100 são bastante utilizados. No entanto, o SDS tem sido descrito como o mais eficaz na remoção de núcleos, preservando a mecânica dos tecidos (NAKAYAMA et al., 2010; PRIEDGEN et al., 2011). Por outro lado, estudos relatam que seus resíduos em altas concentrações podem ser citotóxicos, além de atuarem na redução glicosaminoglicanos (GAG), fatores de crescimento e danificação do colágeno presente em determinadas matrizes (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILPIN; YANG, 2017; HASSANPOUR et al., 2018; WOODS; GRATZER, 2005). No entanto, Kasebar et al. (2018) observaram que embora o SDS seja considerado tóxico, não houve aumento de hidroxiprolina (aminoácido não essencial presente no colágeno, sendo abundante na matriz óssea) detectável após a descelularização testada em seu estudo, demonstrando ausência de degradação tecidual. Além disso, existem indícios de que a ação danosa do SDS sobre os componentes da matriz extracelular seja tecido-dependente (CARTMELL; DUNN, 2000; COURTMAN et al., 1994; WILSON et al., 1995).

Sendo assim, após aplicado o Protocolo E, foi observado que a lavagem com água destilada após o uso do tampão detergente reduziu consideravelmente a presença de espumas que eram observadas ao final dos protocolos inicialmente testados. Acredita-se que essa lavagem extra para eliminação dos resíduos do detergente possibilitou ainda a melhor atuação do tampão nuclease, o que poderia explicar, em parte, a ineficiência da benzonase utilizada nos protocolos iniciais. A importância do processo de lavagem dos biomateriais após o uso de tampões detergentes tem sido bastante relatada (GILPIN; YANG, 2017), seja com água destilada, como usado no protocolo proposto, ou outros tampões (ABEDIN et al., 2018; CEBOTARI et al., 2010; TANG-QUAN et al., 2018).

Somado aos reagentes químicos e enzimáticos que são utilizados nos protocolos de descelularização, técnicas mecânicas muitas vezes são também aplicadas, sendo mais usado o processo de perfusão, pois facilita a exposição química e a remoção dos resíduos celulares (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). No entanto, a técnica de imersão e a agitação se encaixaram bem ao biomaterial neste estudo, principalmente na aplicação de rotações mais baixas que melhoram a interação dos reagentes como o biomaterial e diminuem o impacto entre as amostras e o frasco durante as agitações e incubações. A imersão combinada com a agitação é utilizada principalmente para pequenos fragmentos e nunca para órgãos inteiros, sendo eficaz para tecidos que não possuem rede vascular (GUPTA; MISHRA; DHASMANA, 2017).

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, obtivemos um protocolo de descelularização padronizado e altamente específico para escleras suínas, tendo em vista os critérios propostos por Crapo, Gilbert e Badylak (2011) para obtenção de um *scaffold* biológico aplicável na medicina regenerativa. Seguindo além dos objetivos propostos, este protocolo também atendeu aos requisitos de reprodutibilidade em larga escala, bem como eficiência em duração e custo, quando comparado a outros estudos descritos na literatura, demonstrando que poderá ser eficaz na aplicação em escala industrial e ainda pode ser considerado um protocolo rápido (realizado em poucos dias) e com importante custo benefício.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012.
- ABEDIN, E.; LARI, R.; SHAHRI, N. M.; FEREIDONI, M. Development of a demineralized and decellularized human epiphyseal bone scaffold for tissue engineering: A histological study. *Tissue and Cell*, Edinburgh, v. 55, p. 46-52, Dec. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.09.003>
- BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, London, v. 13, n. 5, p. 377-383, Oct. 2002. <https://doi.org/10.1016/S1084952102000940>
- BADYLAK, S. F.; GILBERT, T. W. Immune response to biologic scaffold materials. *Seminars in Immunology*, Philadelphia, v. 20, n. 2, p. 109-116, Apr. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.003>
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A.; DUEK, E. A. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*, São Carlos, v. 15, n. 1, p. 13-21, mar. 2005. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282005000100006>
- CARTMELL, J. S.; DUNN, M. G. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research*, Hoboken, v. 49, n. 1, p. 134-140, Jan. 2000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200001\)49:1<134::AID-JBM17>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200001)49:1<134::AID-JBM17>3.0.CO;2-D)
- CEBOTARI, S.; TUDORACHE, I.; JAEKEL, T.; HILFIKER, A.; DORFMAN, S.; TERNES, W.; HAVERICH, A.; LICHTENBERG, A. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artificial Organs*, Cambridge, v. 34, n. 3, p. 206-210, Mar. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2009.00796.x>
- CHOI, J. S.; WILLIAMS, J. K.; GREVEN, M.; WALTER, K. A.; LABER, P. W.; KHANG, G.; SOKER, S. Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma. *Biomaterials*, [Guilford], v. 31, n. 26, p. 6738-6745, Sept. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.020>
- COURTMAN, D. W.; PEREIRA, C. A.; KASHEF, V.; McCOMB, D.; LEE, J. M.; WILSON, G. J. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *Journal of Biomedical Materials Research*, Hoboken, v. 28, n. 6, p. 655-666, June 1994. <https://doi.org/10.1002/jbm.820280602>
- CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, [Guilford], v. 32, n. 12, p. 3233-3243, Apr. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>

DZOBO, K.; THOMFORD, N. E.; SENTHEBANE, D. A.; SHIPANGA, H.; ROWE, A.; DANDARA, C.; PILLAY, M.; MOTAUNG, K. S. C. M. Advances in regenerative medicine and tissue engineering: Innovation and transformation of medicine. *Stem Cells International*, London, ID 2495848, p. 1-24, July 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2495848>

FERREIRA, L. C. L. *Maquinagem de superfícies complexas na área biomédica*. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2012.

FRANÇA, V. P.; FIGUEIREDO, A. R. P. D.; VASCONCELOS, A. C.; ORÉFICE, R. L. Estudo comparativo experimental de compósito bioativo de matriz polimérica para aplicação em cirurgia plástica ocular na substituição tecidual. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, São Paulo, v. 68, n. 4, p. 425-431, Ago. 2005. <https://doi.org/10.1590/S0004-27492005000400003>

GEERTS, S.; OZER, S.; JARAMILLO, M.; YARMUSH, M. L.; UYGUN, B. E. Nondestructive Methods for Monitoring Cell Removal During Rat Liver Decellularization. *Tissue engineering. Part C, Methods*, New Rochelle, v. 22, n. 7, p. 671-678, July 2016. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0571>

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, [Guilford], v. 27, n. 19, p. 3675-3683, July 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014>

GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *BioMed Research International*, New York, ID 9831534, p. 1-13, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9831534>

GUPTA, S. K.; MISHRA, N. C.; DHASMANA, A. Decellularization methods for scaffold fabrication. *Methods in Molecular Biology*, Clifton, v. 1577, p. 1-10, May 2017. https://doi.org/10.1007/7651_2017_34

GURUSWAMY DAMODARAN, R.; VERMETTE, P. Tissue and organ decellularization in regenerative medicine. *Biotechnology Progress*, New York, v. 34, n. 6, p. 1494-1505, Nov. 2018. <https://doi.org/10.1002/btpr.2699>

HASSANPOUR, A.; TALAEI-KHOZANI, T.; KARGAR-ABARGHOUEI, E.; RAZBAN, V.; VOJDANI, Z. Decellularized human ovarian scaffold based on a sodium lauryl ester sulfate (SLES)-treated protocol, as a natural three-dimensional scaffold for construction of bioengineered ovaries. *Stem Cell Research & Therapy*, London, v. 9, n. 1, p. 252, Sept. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0971-5>

HONG, P.; BEZUHLY, M.; GRAHAM, M. E.; GRATZER, P. F. Efficient decellularization of rabbit trachea to generate a tissue engineering scaffold biomatrix. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, [Amsterdam], v. 112, p. 67-74, Sept. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2018.06.032>

KASBEKAR, S.; KAYE, S. B.; WILLIAMS, R. L.; STEWART, R. M.; LEOW-DYKE, S.; ROONEY, P. Development of decellularized conjunctiva as a substrate for the ex vivo

- expansion of conjunctival epithelium. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Chichester, v. 12, n. 2, p. e973-e982, Feb. 2018. <https://doi.org/10.1002/term.2419>
- KEANE, T. J.; SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*, San Diego, v. 84, p. 25-34, Aug. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.005>
- KHEIR, E.; STAPLETON, T.; SHAW, D.; JIN, Z.; FISHER, J.; INGHAM, E. Development and characterization of an acellular porcine cartilage bone matrix for use in tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, Hoboken, v. 99, n. 2, p. 283-294, Nov. 2011. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33171>
- MENG, F.; MODO, M.; BADYLAK, S. F. Biologic scaffold for CNS repair. *Regenerative Medicine*, London, v. 9, n. 3, p. 367-383, May 2014. <https://doi.org/10.2217/rme.14.9>
- METCALF, M. H.; SAVOIE, F. H.; KELLUM, B. Surgical technique for xenograft (SIS) augmentation of rotator-cuff repairs. *Operative Techniques in Orthopaedics*, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 204-208, 2002. <https://doi.org/10.1053/otor.2002.36298>.
- NAKAYAMA, K. H.; BATCHELDER, C. A.; LEE, C. I.; TARANTAL, A. F. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Engineering: Part A*, New Rochelle, v. 16, n. 7, p. 2207-2216, July 2010. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0602>
- NESTLE, M.; ROBERTS, W. An Extracellular Nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 244, n. 19, p. 5213-5218, Oct. 1969.
- PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*, Basel, v. 3, n. 3, p. 1863-1887, Mar. 2010. <https://doi.org/10.3390/ma3031863>
- PHILIPS, C.; CAMPOS, F.; ROOSENS, A.; SÁNCHEZ-QUEVEDO, M. C.; DECLERCQ, H.; CARRIEL, V. Qualitative and quantitative evaluation of a novel detergent-based method for decellularization of peripheral nerves. *Annals of Biomedical Engineering*, New York, v. 46, n. 11, p. 1921-1937, Nov. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10439-018-2082-y>
- PRIDGEN, B. C.; WOON, C. Y.; KIM, M.; THORFINN, J.; LINDSEY, D.; PHAM, H.; CHANG, J. Flexor tendon tissue engineering: acellularization of human flexor tendons with preservation of biomechanical properties and biocompatibility. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, New Rochelle, v. 17, n. 8, p. 819-828, Aug. 2011. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0457>
- TANG-QUAN, K. R.; MEHTA, N. A.; SAMPAIO, L. C.; TAYLOR, D. A. Whole Cardiac Tissue Bioscaffolds. In: SCHMUCK, E. G.; HEMATTI, P.; RAVAL, A. N. (ed.). *Cardiac Extracellular Matrix*. New York: Springer, 2018. p. 85-114. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97421-7_5

TOTONELLI, G.; MAGHSOUDLOU, P.; GARRIBOLI, M.; RIEGLER, J.; ORLANDO, G.; BURNS, A. J.; SEBIRE, N. J.; SMITH, V. V.; FISHMAN, J. M.; GHIONZOLI, M.; TURMAINE, M.; BIRCHALL, M. A.; ATALA, A.; SOKER, S.; LYTHGOE, M. F.; SEIFALIAN, A.; PIERRO, A.; EATON, S.; DE COPPI, P. A rat decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration. *Biomaterials*, [Guilford], v. 33, n. 12, p. 3401-3410, Apr. 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.012>

WATIER, H.; GUILLAUMIN, J.-M.; VALLÉE, I.; THIBAUT, G.; GRUEL, Y.; LEBRANCHU, Y.; BARDOS, P. Human NK cell-mediated direct and IgG-dependent cytotoxicity against xenogeneic porcine endothelial cells. *Transplant Immunology*, Dunton Green, v. 4, n. 4, p. 293-299, Dec. 1996. [https://doi.org/10.1016/S0966-3274\(96\)80050-5](https://doi.org/10.1016/S0966-3274(96)80050-5)

WILSON, G. J.; COURTMAN, D. W.; KLEMENT, P.; LEE, J. M.; YEGER, H. A cellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement. *The Annals of Thoracic Surgery*, Amsterdam, v. 60, suppl. 2, p. S353-S358, Aug. 1995.
[https://doi.org/10.1016/0003-4975\(95\)98967-Y](https://doi.org/10.1016/0003-4975(95)98967-Y)

WILSON, S. L.; SIDNEY, L. E.; DUNPHY, S. E.; ROSE, J. B.; HOPKINSON, A. Keeping an eye on decellularized corneas: a review of methods, characterization and applications. *Journal of Functional Biomaterials*, Basel, v. 4, n. 3, p. 114-161, Sept. 2013.
<https://doi.org/10.3390/jfb4030114>

WOODS, T.; GRATZER, P. F. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone–anterior cruciate ligament–bone graft. *Biomaterials*, [Guilford], v. 26, n. 35, p. 7339-7349, Dec. 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.066>

ZAMBAITI, E.; SCOTTONI, F.; RIZZI, E.; RUSSO, S.; DEGUCHI, K.; EATON, S.; PELLEGATA, A. F.; DE COPPI, P. Whole rat stomach decellularisation using a detergent-enzymatic protocol. *Pediatric Surgery International*, Berlin, v. 35, n. 1, p. 21-27, 2019.
<https://doi.org/10.1007/s00383-018-4372-8>