

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LUCIANA CRISTINA FERRETTI DE NAZARENO WOLLMANN**

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE AS  
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E  
BIOMECÂNICAS DE VALVAS CARDÍACAS HUMANAS  
DESCELULARIZADAS**

**Curitiba**

**2018**

**LUCIANA CRISTINA FERRETTI DE NAZARENO WOLLMANN**

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE AS  
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E  
BIOMECÂNICAS DE VALVAS CARDÍACAS HUMANAS  
DESCELULARIZADAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito para obtenção do título de Doutora.

**Orientador:** Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

**Co-orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Paula Hansen Suss

**Curitiba**

**2018**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Giovanna Carolina Massaneiro dos Santos – CRB 9/1911

W864e  
2018 Wollmann, Luciana Cristina Ferretti de Nazareno  
Efeito do tempo de armazenamento sobre as características histológicas,  
microbiológicas e biomecânicas de valvas cardíacas humanas  
descelularizadas / Luciana Cristina Ferretti de Nazareno Wollmann; orientador:  
Felipe Francisco Bondan Tuon ; co-orientadora: Paula Hansen Suss. – 2018.  
89 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,  
2018

Inclui bibliografias.

1. Ciências da saúde. 2. Banco de tecidos. 3. Aloenxertos. 4. Valva aórtica.  
5. Valva pulmonar. 6. Engenharia tecidual. I. Tuon, Felipe Francisco Bondan.  
I. Suss, Paula Hansen. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 22. ed. – 610



**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos 30 dias do mês de novembro de 2018 às 09hs e 30min., realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese “EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E BIOMECÂNICAS DE VALVAS CARDÍACAS HUMANAS DESCELULARIZADAS” apresentado por **Luciana Cristina Ferretti de Nazareno Wollmann** para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Felipe Francisco Bonacin Tuon– Presidente (PUCPR)	
Prof. Dr. José Rocha Fraia Neto– (PUCPR)	
Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza (PUCPR)	
Prof. Dr. Marco Augusto Stimamiglio (FioCruz)	
Prof. Dr. George Ronald Soncini da Rosa (HCPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Felipe Francisco Bonacin Tuon      Conceito Aprovado  
Prof. Dr. José Rocha Faria Neto              Conceito Aprovado  
Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza      Conceito APROVADA  
Prof. Dr. Marco Augusto Stimamiglio      Conceito APROVADO  
Prof. Dr. George Ronald Soncini da Rosa    Conceito Aprovado  
Parecer Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
  
Prof. Dr. Felipe Francisco B. Tuon  
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena  
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

“No one can whistle a symphony. It takes a whole orchestra to play it.”

Halford Edward Luccock

## AGRADECIMENTOS

Os maiores aprendizados que tive durante esta etapa foram muito além das valvas cardíacas humanas descelularizadas, que já me acompanham há muitos anos.

Aprendi, principalmente, que ninguém é tão bom quanto todos nós juntos.

Aprendi que existem muitas pessoas que ajudam pelo simples prazer de ajudar e que nunca saberei como agradecer por isso.

De forma singela, deixo aqui registrado os meus agradecimentos.

A Deus, onipotente, onipresente e onisciente.

A minha família, Myrian, Nelson, Ana Maria, Alexandre, Ana Carolina e Manuella, pelo apoio, pela paciência, pelo amor incondicional, pela vida, por absolutamente tudo.

Ao meu orientador, Dr. Felipe Tuon, por embarcar no carro em movimento e assumir a direção com maestria.

A minha co-orientadora, Dra. Paula Hansen Suss, por ser a maior incentivadora e amiga que já conheci.

Aos meus amigos do Banco de Tecidos Humanos, Adriane Silva, Danielle Pegoraro, Eunice Santos, Gisele Sonda, Laudir Rodrigues, Mônica Pereira, Renata Ferreira e Roseli Nareski, pelos cafés, pelos conselhos, pela companhia, pela ajuda física e emocional diária e contínua.

Ao Dr. Francisco Costa pela confiança ao me conceder a bolsa.

À Marise Costa por me tornar a profissional que sou.

Aos colegas Alex Fabiano Paulin e César Oleinik, por seus trabalhos químicos e biomecânicos brilhantes, respectivamente, e pela enorme paciência ao sanarem minhas dúvidas.

À Dra Lucia de Noronha pelas inúmeras tardes entre lâminas de histologia, onde aprendi muito.

Às amigas Letícia Kraft e Victoria Stadler, companheiras de pesquisa que me ajudaram muito com os experimentos.

À banca examinadora por aceitar o convite e me conceder a honra de sua avaliação.

“Teamwork is the secret that make common people achieve uncommon result.”

Ifeanyi Enoch Onuoha

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O melhor método de armazenamento para a manutenção da qualidade e segurança de valvas cardíacas humanas descelularizadas ainda está para ser estabelecido, sendo de indiscutível importância ao posterior uso clínico. Atualmente, as valvas cardíacas descelularizadas são mantidas em solução salina estéril a 2-8°C por até 6 meses. **OBJETIVO:** Avaliar a estabilidade da matriz extracelular (MEC) e as características histológicas, microbiológicas e biomecânicas de valvas cardíacas humanas descelularizadas e armazenadas por 6, 12 e 18 meses. **MÉTODOS:** Um total de 70 valvas cardíacas aórticas e pulmonares descelularizadas pelo protocolo de descelularização utilizando dodecil sulfato de sódio e ácido etilenodiamino tetra-acético (SDS-EDTA) foram analisadas através de diferentes tempos de armazenamento (0, 6, 12 e 18 meses) por medições do pH da solução de estocagem, achados histológicos, análises microbiológicas, citotoxicidade, testes biomecânicos, análises morfométricas e quantificação de resíduos químicos. Os dados contínuos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e os dados categóricos como frequência. Os dados contínuos foram analisados através de análise univariada comparando os tempos. **RESULTADOS:** O pH da solução de estocagem não se alterou durante os diferentes tempos analisados e não houve crescimento microbiológico até os 18 meses de armazenamento. As análises histológicas não revelaram resultados deletérios ou sinais de degeneração estrutural na matriz extracelular até 12 meses de armazenamento. As propriedades biomecânicas revelaram mudanças através dos diversos tempos em diferentes aspectos. As valvas cardíacas humanas descelularizadas armazenadas por 18 meses apresentaram menor resistência à tração e alongamento que aquelas armazenadas por 12 meses ( $p < 0,05$ ). Os testes de bacteriostase e fungistase sugerem não haver atividade antimicrobiana no tecido e na solução de estocagem. A quantificação dos resíduos de antibióticos, utilizados na descontaminação dos tecidos, e de SDS, utilizado no processo de descelularização, mostra que mesmo presentes, a quantidade é ínfima, não causando efeito bacteriostático, fungistático ou citotóxico. Os ensaios de citotoxicidade revelaram crescimento normal de fibroblastos cultivados com o tecido descelularizado, semelhante ao controle negativo para citotoxicidade. **CONCLUSÃO:** As mudanças na estrutura e na biomecânica das valvas cardíacas humanas descelularizadas ocorrem depois de 12 meses de armazenamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** Banco de tecidos cardiovasculares. Tempo de armazenamento. Homoenxertos valvares. Valva aórtica. Valva pulmonar. Descelularização. Engenharia de tecidos.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The ideal storage method for maintaining the quality and safety of decellularized human heart valves is still to be established, an important issue to subsequent clinical use. Currently, decellularized human heart valves are maintained in sterile saline solution at 2-8°C for up to 6 months. **PURPOSE:** To evaluate the stability of the extracellular matrix (ECM) and the microbiological, histological and biomechanical characteristics of decellularized human heart valves stored for 6, 12 and 18 months. **METHODS:** A total of 70 aortic and pulmonary decellularized heart valves using sodium dodecyl sulfate and ethylenediamine tetra acetic acid (SDS-EDTA) were analyzed through different storage times (0, 6, 12 and 18 months) by pH measurements of the stock solution, histological findings, microbiological analyzes, cytotoxicity, biomechanical tests, morphometric analysis and quantification of chemical residues. Continuous data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation and categorical data as frequency. Continuous data were analyzed by univariate analysis comparing the times. **RESULTS:** The pH of the stock solution did not change during the different times analyzed and there was no microbiological growth up to 18 months of storage. Histological analyzes revealed no deleterious results or signs of structural degeneration in the extracellular matrix until 12 months of storage. The biomechanical properties revealed changes through different times in different aspects. The decellularized human heart valves stored for 18 months had lower tensile strength and elongation than those stored for 12 months ( $p < 0.05$ ). Bacteriostasis and fungistasis tests suggested no antimicrobial activity in the tissue and storage solution. The quantification of chemical residues showed that even when present, the amount is negligible, causing no bacteriostatic, fungistatic or cytotoxic effect. Cytotoxicity assays revealed normal growth of cultured fibroblasts with the decellularized tissue, similar to the negative control for cytotoxicity. **CONCLUSION:** Changes in the structure and biomechanics of decellularized human heart valves occur after 12 months of storage.

**KEYWORDS:** Heart valve bank. Shelf life. Heart valve allografts. Aortic valve. Pulmonary valve. Decellularization. Tissue engineering.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação esquemática dos principais componentes celulares e da matriz extracelular da cúspide da valva cardíaca.

**Figura 2.** Diferentes tipos de próteses valvares.

**Figura 3.** Valvas cardíacas humanas provenientes de doadores cadáveres.

**Figura 4.** Principais etapas da produção de valvas cardíacas descelularizadas.

**Figura 5.** Análise macroscópica.

**Figura 6.** Análise comparativa de valores de pH da solução de estocagem.

**Figura 7.** Análise histológica de condutos aórticos descelularizados.

**Figura 8.** Análise histológica de condutos pulmonares descelularizados.

**Figura 9.** Teste de bacteriostase e fungistase.

**Figura 10.** Cromatogramas de massa para o composto cefoxitina obtidos por LC-MS/MS em valva aórtica e pulmonar descelularizadas.

**Figura 11.** Cromatogramas de massa para o composto lincomicina obtidos por LC-MS/MS em valva aórtica e pulmonar descelularizadas.

**Figura 12.** Cromatogramas de massa para o composto polimixina B obtidos por LC-MS/MS em valva aórtica e pulmonar descelularizadas.

**Figura 13.** Cromatogramas de massa para o composto vancomicina obtidos por LC-MS/MS em valva aórtica e pulmonar descelularizadas.

**Figura 14.** Cromatogramas de massa para o composto SDS obtidos por LC-MS/MS em valva aórtica e pulmonar descelularizadas.

**Figura 15.** Ensaio de citotoxicidade por contato direto.

**Figura 16.** Representação gráfica dos parâmetros mecânicos obtidos para valvas aórticas descelularizadas – conduto.

**Figura 17.** Representação gráfica dos parâmetros mecânicos obtidos para valvas aórticas descelularizadas – cúspide.

**Figura 18.** Representação gráfica dos parâmetros mecânicos obtidos para valvas pulmonares descelularizadas – conduto.

**Figura 19.** Representação gráfica dos parâmetros mecânicos obtidos para valvas pulmonares descelularizadas – cúspide.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Medianas dos halos de inibição para classificação semiquantitativa

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g mL}^{-1}$	Micrograma por miligrama
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{m}^2$	Micrômetro quadrado
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção de microrganismos Norte americana (do inglês: <i>American Type Culture Collection</i> )
cm	Centímetro
$\text{cm}^2$	Centímetro quadrado
DCV	Doenças cardiovasculares
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: <i>Dulbeccos's Modified Eagle Medium</i> )
DNAse	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESI	Ionização por eletrospray
g	Grama
GAGs	Glicosaminoglicanos
GM	Gabinete do Ministro
H&E	Hematoxilina-eosina
H <sup>+</sup>	Íons hidrogênio
HLA	Antígenos leucocitários humanos (do inglês: <i>Human Leukocyte Antigens</i> )
ISO	Organização Internacional de Padronização (do inglês: <i>International Organization of Standardization</i> )
LC-MS/MS	Cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
MEC	Matriz extracelular
$\text{mg kg}^{-1}$	Miligrama por quilograma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mM	Milimolar

mm/min	Milímetro por minuto
mm/mm	milímetro por milímetro
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
N	Newton
ND	Não detectado
ng/ $\mu$ L	Nanograma por microlitro
N <sup>o</sup>	Número
p	Significância
pH	Potencial hidrogeniônico
PRM	Pentacrômico de Russel-Movat's
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute (do inglês: <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
U/mL	Unidades por mililitro
$\mu$ m	Micrômetro

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
°C	Grau Celsius
<	Menor
=	Igual
>	Maior
x	Aumento
+	Soma
®	Marca registrada
±	Mais ou menos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	ESTRUTURA DAS VALVAS CARDÍACAS	14
1.2	DOENÇAS CARDIOVASCULARES	15
1.3	VALVOPATIAS	16
1.4	SUBSTITUTOS VALVARES	17
1.5	DESCELULARIZAÇÃO	21
1.6	ARMAZENAMENTO DE VALVAS CARDÍACAS HUMANAS	23
1.7	USO CLÍNICO DAS VALVAS CARDÍACAS HUMANAS DESCELULARIZADAS	24
1.8	ESTUDOS DE ESTABILIDADE	25
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>29</b>
4.1	DISSECÇÃO DOS CORAÇÕES PARA OBTENÇÃO DAS VALVAS AÓRTICA E PULMONAR	29
4.2	DESCELULARIZAÇÃO	29
4.3	ARMAZENAMENTO	30
4.4	ANÁLISE MACROSCÓPICA E TÁTIL	30
4.5	pH	30
4.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA	31
4.7	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	31
4.7.1	Teste de bacteriostase e fungistase	31
4.8	CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL (LC-MS/MS)	32
4.9	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR CONTATO DIRETO	33
4.10	TESTE BIOMECÂNICO DE TRAÇÃO E ALONGAMENTO	33
4.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
5.1	ANÁLISE VISUAL, pH E TÁTIL	35
5.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA	36
5.3	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	38
5.4	CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL (LC-MS/MS)	40

<b>5.5</b>	<b>ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR CONTATO DIRETO</b> .....	44
<b>5.6</b>	<b>TESTE BIOMECÂNICO DE TRAÇÃO E ALONGAMENTO</b> .....	44
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b> .....	68

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ESTRUTURA DAS VALVAS CARDÍACAS

Em condições fisiológicas normais, as quatro valvas cardíacas (mitral, tricúspide, aórtica e pulmonar) funcionam como estruturas mecânicas que asseguram que o sangue circule unidirecionalmente (SILVERTHORN, 2010). O desempenho adequado das valvas requer que todos os seus componentes estejam estruturalmente intactos e trabalhando em sincronia, estabelecendo a resistência mecânica necessária para suportar a pressão exercida pelo fluxo sanguíneo na valva (SHOEN, 2005).

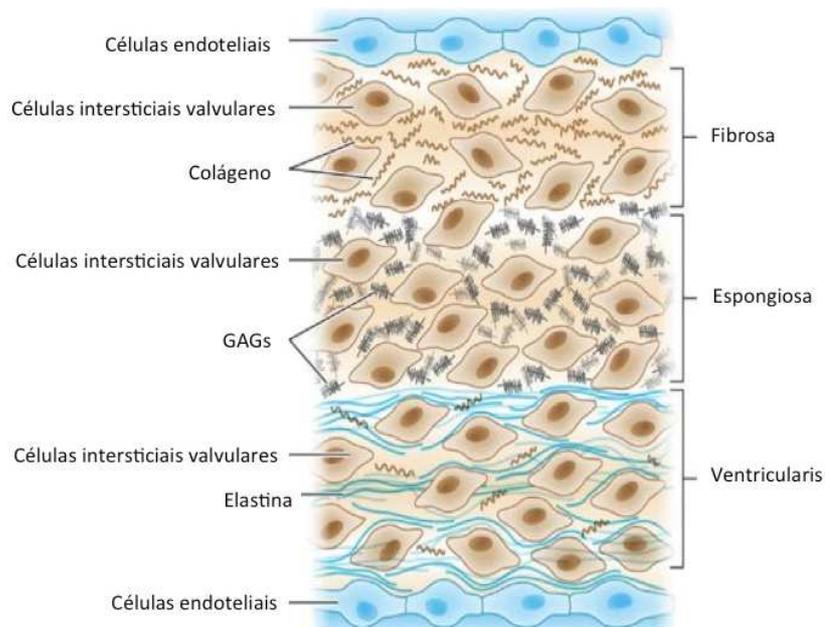
Microscopicamente, as valvas cardíacas apresentam células intersticiais e uma camada de células endoteliais (SCHOEN, 2008). Sabe-se que as células intersticiais são responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular (MEC), sendo imprescindível para prolongar a função e a durabilidade das valvas cardíacas. Grande parte do volume da MEC é composto pelo espaço extracelular, sendo preenchido por uma rede complexa de macromoléculas. Esta é composta por uma grande variedade de proteínas e de polissacarídeos secretados localmente e que formam uma rede organizada, em estreita associação com a superfície celular que os produz. A MEC do tecido valvar é mais abundante do que as células ao seu redor, e isso determina as propriedades físicas do tecido (ALBERTS *et al.*, 2004).

A MEC das valvas semilunares (aórtica e pulmonar) é composta por três camadas diferentes que são responsáveis pelas propriedades biomecânicas: fibrosa, espongiosa e ventricularis. A fibrosa é formada majoritariamente por colágeno (tipo I e III) o que proporciona rigidez à tração. A espongiosa é formada predominantemente por proteoglicanos que proporciona resistência à compressão, já a ventricularis é constituída basicamente por elastina que auxilia no movimento tecidual (SCHOEN, 2012; HINTON, 2011).

A MEC medeia a interação entre a célula e o microambiente circundante em um modelo de reciprocidade dinâmica, em que as células secretam os componentes da MEC e as proteínas da MEC regulam a proliferação e a diferenciação das células para finalmente determinar a morfogênese tecidual e a homeostase no desenvolvimento e na doença (NELSON, 2006). A MEC não é apenas um componente estrutural de qualquer tecido, ela representa um enorme reservatório de estímulos biofísicos e moléculas de sinalização. A quantidade, a qualidade e a

arquitetura da MEC, particularmente do colágeno, da elastina e dos glicosaminoglicanos (GAGs), determinam a durabilidade da valva (SCHOEN, 2012).

As células intersticiais são o tipo celular mais abundante em valvas cardíacas normais e estão distribuídas ao longo de todas as camadas; elas são cruciais para a função valvar. Através da sua capacidade em sintetizar MEC e expressar enzimas que degradam a matriz (incluindo as metaloproteinases de matriz e seus inibidores) que remodelam o colágeno e outros componentes da matriz (DREGER *et al.*, 2006) elas continuamente reparam os danos funcionais do colágeno e de outros componentes da MEC e medeiam o remodelamento da matriz na adaptação e doença. Já as células endoteliais alinham as superfícies de contato do sangue com as valvas e são cruciais para o desenvolvimento valvar. Os principais componentes e estruturas valvares estão representados na figura 1 (SCHOEN, 2012).



**Figura 1.** Representação esquemática dos principais componentes celulares e da matriz extracelular da cúspide da valva cardíaca. (Adaptado de Schoen, 2012).

## 1.2 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares (DCV) englobam as doenças cardíacas, vasculares cerebrais e vasculares periféricas, afetam pessoas de todas as idades e grupos populacionais e são a principal causa de morte em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, mais de três quartos das mortes por DCV ocorrem em países de baixa e média renda (WHO, 2015).

No Brasil, as DCV tem sido a principal causa de morte desde o final da década de 1960. Duas tendências importantes contribuíram para manter esse ranking nas últimas duas décadas (SCHMIDT *et al.*, 2011). A primeira é a ocorrência de mudanças no estilo de vida relacionadas à urbanização e à globalização, como maior ingestão calórica e menor gasto energético (SCHMIDT *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2011). A segunda é o rápido envelhecimento populacional causado pela maior expectativa de vida e menor fertilidade (RIBEIRO *et al.*, 2016), associados à crescente prevalência de fatores de risco como hipertensão, dislipidemias, tabagismo e diabetes *mellitus* (O'DONNELL, 2014; LOTUFO, 2015).

### 1.3 VALVOPATIAS

Diversas patologias, incluindo defeitos congênitos, febre reumática, degeneração mixomatosa, calcificação valvar, processos infecciosos, entre outras, podem danificar a estrutura de uma ou mais valvas, causando a estenose ou a insuficiência valvar. Nos casos de estenose, as valvas não se abrem adequadamente, com conseqüente obstrução do fluxo sanguíneo. Já nas insuficiências, as valvas não se fecham de forma apropriada, permitindo o refluxo sanguíneo (SCHOEN, 2012).

Enquanto no Brasil e demais países em desenvolvimento a principal causa da estenose mitral (EM) é a febre reumática, nos países desenvolvidos observa-se aumento da incidência de EM degenerativa, associada à calcificação do anel mitral e que se desenvolve em pacientes idosos (TARASOUTCHI *et al.*, 2017).

As alterações do mecanismo valvar diminuem o rendimento e a eficiência do miocárdio e resultam em importante sobrecarga deste. Dessa forma, pacientes com lesões valvares tornam-se progressivamente limitados, com sinais e sintomas de insuficiência cardíaca e arritmia, e finalmente morrem se não tratados adequadamente (SCHOEN, 2012; BRINKLEY *et al.*, 2013).

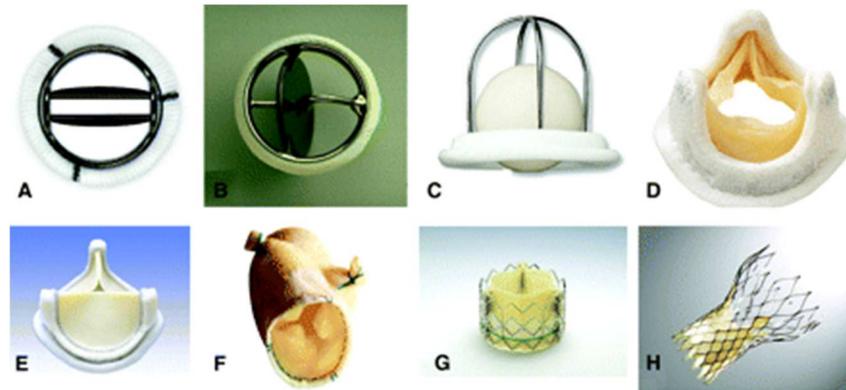
Aproximadamente 2,5% da população dos Estados Unidos é afetada pelas valvopatias (BRINKLEY *et al.*, 2013), e a prevalência aumenta com a idade, atingindo mais de 13% da população a partir dos 75 anos de idade (NKOMO *et al.*, 2006). Cerca de 300 mil cirurgias para substituição valvar são realizadas no mundo anualmente devido às valvopatias cardíacas (CIUBOTARU *et al.*, 2013). No Brasil, a doença valvar representa uma significativa parcela das internações por DCV e, diferentemente de países mais desenvolvidos, a febre reumática é a principal etiologia sendo responsável por até 70% dos casos. De acordo com os dados do Ministério da Saúde, em 2011, foram realizadas 27.284 cirurgias cardíacas de troca valvar (MS, 2012). Já

em 2013, foram registradas 5.169 internações no SUS por causa da febre reumática aguda e 8.841 por causa de cardiopatia reumática crônica, a um custo total de R\$ 103 milhões, principalmente para realização de cirurgias valvares cardíacas (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Embora os pacientes com valvopatias possam ser manejados clinicamente, procedimentos invasivos são os tratamentos definitivos (TARASOUTCHI *et al.*, 2011). Apesar da prevalência de tais doenças ser baixa, se comparada às doenças coronárias, a necessidade de um longo período de acompanhamento e o próprio custo do tratamento faz com que o seu impacto econômico nos sistemas de saúde seja bastante elevado (COFFEY *et al.*, 2016). Além disso, a significativa associação entre valvopatias e idade, combinada ao rápido envelhecimento da população ao redor do mundo, faz com que as valvopatias sejam descritas como a “próxima epidemia cardíaca” (D’ARCY *et al.*, 2011). Devido ao envelhecimento da população, espera-se que o número de pacientes com valvopatias que necessitam de substituição valvar aumente, atingindo mais de 800.000 procedimentos anuais em todo o mundo até 2050 (YACOUB & TAKKENBERG, 2005).

#### **1.4 SUBSTITUTOS VALVARES**

Nos pacientes que apresentam indicação de tratamento cirúrgico das valvopatias, o cirurgião precisa decidir qual será o substituto valvar (SOUZA, 2012; SODIAN *et al.*, 2000). As principais opções de substitutos valvares incluem: válvulas mecânicas, biopróteses (Figura 2) e valvas cardíacas humanas (Figura 3). Independentemente do tipo escolhido, o substituto ideal deve ser semelhante à valva nativa, permitindo o fluxo contínuo de sangue quando aberta, mas evitando o fluxo contrário (regurgitação) quando fechada. A valva de substituição também não deve causar fluxo sanguíneo turbulento, promover hemólise ou ativar a cascata de coagulação. Além disso, necessita ser biocompatível, com superfícies não trombogênicas, de fácil implantação e boa durabilidade para o tempo de vida do paciente, uma vez que é fundamental evitar repetidas operações devido à falha do dispositivo. Finalmente, a valva ideal não afetaria o dia-a-dia do paciente, evitando o uso de terapias de anticoagulantes (SCHOEN & LEVY, 1999).



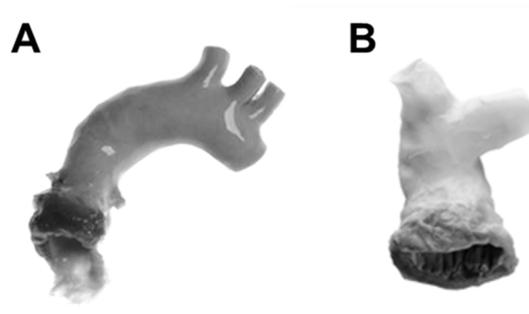
**Figura 2.** Diferentes tipos de próteses valvares. A: válvula mecânica de duplo folheto (St Jude); B: válvula de disco basculante (Medtronic Hall); C: válvula de esfera enjaulada (Starr-Edwards); D: biopróteses porcinas com sustentação (Medtronic Mosaic); E: biopróteses de pericárdio com sustentação (Carpentier-Edwards Magna); F: biopróteses porcinas sem sustentação (Medtronic Freestyle); G: bioprótese balão-expansível (Edwards Sapien); H: prótese biológica percutânea auto-expansível (CoreValve). Fonte: Pibarot e Dumesnil, 2009.

As válvulas mecânicas e as biopróteses são duráveis e funcionais, mas ainda não são o substituto valvar ideal, pois possuem limitações significativas como riscos de complicações tromboembólicas, degenerativas e infecciosas (SODIAN *et al.*, 2000). A prótese mecânica tem a vantagem de sua longa durabilidade, mas exige o uso contínuo de anticoagulantes. Portanto, devem ser considerados: perfil social do paciente, presença de comorbidades, história prévia de sangramentos e possibilidade de gestação. Os maiores riscos com as próteses mecânicas compreendem, sobretudo, os eventos tromboembólicos - trombose da prótese e complicações hemorrágicas - pelo uso obrigatório e contínuo dos anticoagulantes (BROWN *et al.*, 2009; CANNEGIETER *et al.*, 1995).

As biopróteses são montadas em anéis flexíveis com tecidos de origem porcina e bovina, dispensam o uso de anticoagulantes e são caracterizadas pela baixa trombogenicidade, bom desempenho hemodinâmico e ausência de ruído. As biopróteses de última geração recebem tratamento antimineralização para reduzir o risco de calcificação (CHIKWE *et al.*, 2010; HUMAN & ZILLA, 2001). No entanto, suas limitações estão relacionadas à durabilidade, especialmente ligada à ruptura e à calcificação, o que condiciona os pacientes à reoperação, com seus custos e riscos associados (SMEDIRA *et al.*, 2006). Quando implantadas em valvopatas com idade igual ou superior a 65 anos, as próteses biológicas têm baixo risco de falha estrutural e, portanto, reduzem drasticamente a necessidade de nova operação. Nos pacientes com idade inferior a 60 anos, os efeitos da degeneração estrutural, como fibrose e calcificação, induzem a obstrução e ruptura, comprometendo sua função entre sete e

15 anos, implicando sua substituição. Os fatores que aumentam a probabilidade de reoperação são a baixa idade no momento do implante e a duração do implante da prótese (TARASOUTCHI *et al.*, 2011).

Apesar de todas as vantagens inerentes às próteses mecânicas e biológicas, a incapacidade de crescimento e remodelamento depois do implante e, ainda, o fato de iniciarem a degradação imediatamente após o implante justifica a busca por substitutos valvares mais fisiológicos e de melhor qualidade (SEWELL-LOFTIN *et al.*, 2011). A engenharia de tecidos representa, desta forma, um caminho em evolução com capacidade para ultrapassar as limitações existentes, através da criação de uma valva que previna a resposta imunológica e promova o crescimento, remodelação e reparo *in vivo* (MOL *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Valvas cardíacas humanas provenientes de doadores cadáveres. Valva aórtica fresca (A); Valva pulmonar fresca (B). Fonte: adaptado de [www.cryolife.com](http://www.cryolife.com)

Valvas cardíacas humanas (Figura 3) são utilizadas como substitutos valvares desde 1962 (ROSS, 1962) e apresentam algumas vantagens em relação às próteses convencionais, como o desempenho hemodinâmico fisiológico com fluxo sanguíneo central e laminar, incidência quase nula de tromboembolismo, dispensando o uso de anticoagulantes, e maior resistência a infecções. Essas características resultam em melhor qualidade de vida no pós-operatório, e, em alguns casos, maior sobrevida tardia (O'BRIEN *et al.*, 2001).

Além da melhor qualidade de vida, o desempenho hemodinâmico fisiológico das valvas cardíacas humanas propicia melhor regressão da hipertrofia ventricular esquerda, o que resulta em maior sobrevida tardia nos pacientes operados. Esse aspecto é de extrema importância na seleção do substituto valvar mais apropriado, especialmente em pacientes jovens (O'BRIEN *et al.*, 2001; O'BRIEN *et al.*, 1995).

Por não apresentarem anéis rígidos de suporte, as valvas cardíacas humanas apresentam adequado desempenho hemodinâmico e constituem uma boa opção

técnica para pacientes com anel aórtico pequeno. Além disso, pacientes atletas ou com atividade física intensa podem se beneficiar do uso destas valvas com melhores características hemodinâmicas. Outra indicação para o emprego de valvas cardíacas humanas é a endocardite infecciosa. Já foi bem demonstrado que estas são bastante resistentes a infecção, e seu emprego nessa condição é vantajoso, especialmente naqueles pacientes com abscessos e destruição importante da raiz aórtica. A incidência de complicações tromboembólicas com valvas cardíacas humanas é menor que a das biopróteses, o que torna seu uso mais apropriado em pacientes com contraindicação ao uso de anticoagulantes. A valva cardíaca humana apresenta algumas vantagens sobre os outros substitutos por ser um tecido homólogo sadio e possuir anatomia e estrutura capazes de desempenhar a função valvar o mais próximo do ideal (DA COSTA *et al.*, 2009; SAID *et al.*, 2014).

O emprego das valvas cardíacas humanas, contudo, também tem limitações e desvantagens. Sua disponibilidade é limitada e a logística de transporte é mais complicada. Além disso, mesmo com o controle de qualidade aprimorado dos bancos de tecidos, os riscos de doenças transmissíveis não são nulos (SCHMID *et al.*, 1996; WARWICK *et al.*, 2008). Os maiores impedimentos para o uso mais abrangente destas valvas devem-se à complexidade técnica tanto da cirurgia inicial como da reoperação em caso de falência estrutural da mesma (TARASOUTCHI *et al.*, 2011).

A durabilidade do tecido viável celularizado depende de uma variedade de fatores, incluindo a idade do receptor e do doador, o tamanho e o tipo da valva, o processo de criopreservação e o desenvolvimento de respostas imunológicas (MEYNS *et al.*, 2005). Normalmente, a valva cardíaca aórtica homóloga apresenta deterioração estrutural significativa que começa após 10 anos do implante e poucas delas duram mais de 20 anos. Além disso, em pacientes jovens, há uma degeneração antecipada associada a uma resposta imune mais agressiva (MEYNS *et al.*, 2005; TROOST *et al.*, 2007). Elementos celulares antigênicos presentes nas valvas cardíacas humanas e uma resposta imune com intensa reação inflamatória podem ser os responsáveis pelo processo de calcificação e estenose (TROOST *et al.*, 2007; MENDELSON *et al.*, 2006).

Existem diferentes opções eficazes, mas cada tipo de substituto valvar tem suas limitações (VAHANIAN *et al.*, 2012). No futuro, essas limitações podem ser reduzidas com as tecnologias emergentes no campo das intervenções valvulares

cardíacas, como valvas cardíacas de engenharia de tecidos e métodos menos invasivos de implantação (HUYGENS *et al.*, 2018).

### 1.5 DESCELULARIZAÇÃO

A descelularização é uma técnica da engenharia de tecidos que consiste na remoção do material celular, porém preservando a composição, atividade biológica e integridade mecânica da MEC remanescente (GILBERT *et al.*, 2006; CRAPO *et al.*, 2011). Na prática, isso significa maximizar a remoção do material celular e minimizar a perda da MEC.

É bem estabelecido que a maior fonte de antigenicidade dos tecidos valvares se concentra nos seus elementos celulares, resultando em uma resposta imune degenerativa com comprometimento estrutural da valva (BADYLAK *et al.*, 2008). No caso das valvas cardíacas humanas a presença de antígenos HLA (Human Leukocyte Antigens) nas células pode intensificar uma resposta imune aguda (ELKINS *et al.*, 2001; HAWKINS *et al.*, 2003).

Desta forma a completa remoção das células foi uma das soluções tecnológicas promissoras na confecção de um substituto valvar, que pode ser integrado ao receptor (SCHMIDT *et al.*, 2000). A partir dos dados de O'Brien *et al.* (1999) têm sido propostos diversos tratamentos químicos com capacidade de descelularizar as cúspides e as paredes arteriais dos condutos valvares, incluindo o uso de tripsina, dodecil sulfato de sódio (SDS), octilphenoxietoxietanol (Triton X-100), ácido deoxicólico, soluções hipo e hipertônicas, enzimas como a RNase e DNase, etanol e o glicerol. Independente da metodologia empregada, o objetivo final é o de se obter um tecido acelular, sem danificar os componentes da MEC, criando a condição de ser repovoada por células do hospedeiro (GILBERT *et al.*, 2006).

Estudos experimentais *in vitro* demonstraram a capacidade de repovoamento de matrizes valvares descelularizadas. Já as análises *in vivo* sugerem que a MEC acelular é passível de remodelamento através de repovoamento e produção de novas fibras de MEC (ZELTINGER *et al.*, 2001; BADYLAK *et al.*, 2002).

Um dos fatores que afeta diretamente a funcionalidade da valva cardíaca descelularizada é a capacidade em ser remodelada integrando-se aos tecidos do receptor, sugerindo uma revitalização, a qual pode ser mediada pela adesão das células do receptor formando estruturas como microvasos e reorganização da camada muscular. A biocompatibilidade e imunogenicidade são parâmetros que podem

interferir no remodelamento das valvas cardíacas descelularizadas (MCGROGAN *et al.*, 2014; KNEIB *et al.*, 2012).

As características essenciais de um substituto valvar relacionam-se diretamente com a estrutura e organização da MEC (FAULK *et al.*, 2014). A avaliação funcional dos substitutos valvares é a mais relevante, porém outras avaliações podem ser preditivas do funcionamento valvar e do comportamento biológico, em especial a integridade da MEC (MORONI *et al.* 2014; HAYKAL *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2013; PARTIGTON *et al.*, 2013; MOO *et al.*, 2014).

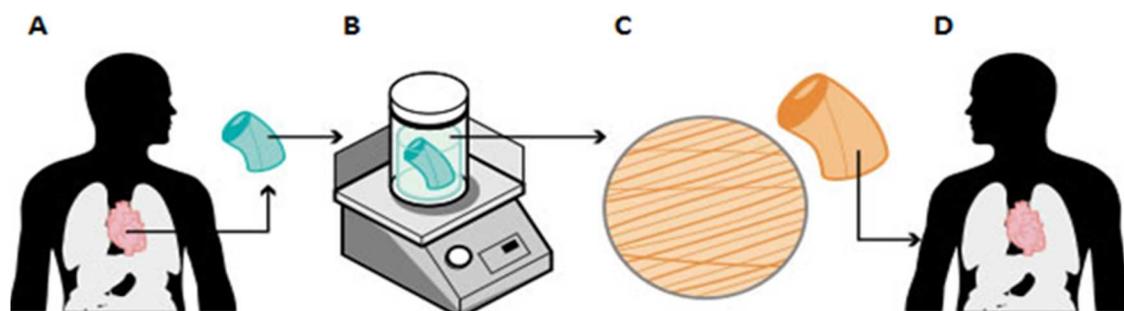
O objetivo de qualquer protocolo de descelularização é remover o material celular e nuclear, preservando a composição, a atividade biológica e a integridade mecânica da MEC restante. Além disso, as substâncias utilizadas neste processo precisam ter mínimo efeito residual, para não promover a citotoxicidade nas valvas cardíacas humanas, dificultando o crescimento celular após o implante no organismo (GILBERT *et al.*, 2006).

A eficácia de um protocolo de descelularização não pode ser verificada apenas pelo seu potencial de remoção celular. É de suma importância que, nesse processo, a composição biomecânica e a organização estrutural da MEC sejam mantidas ao máximo (GILBERT *et al.*, 2006; LIAO *et al.*, 2008; CRAPO *et al.* 2011). Partindo do pressuposto de que todo e qualquer método de remoção celular depreende, na MEC, algum nível de dano estrutural, deve-se optar pela utilização de processos menos agressivos que reduzam os efeitos indesejáveis na estrutura e integridade da MEC (GILBERT *et al.*, 2006; CRAPO *et al.* 2011; HUDSON *et al.*, 2004).

A MEC de valvas descelularizadas, de origem alogênica, representa um molde tridimensional apropriado para a engenharia de tecidos de valvas cardíacas, uma vez que demonstra a capacidade de crescimento, remodelamento e reparação dentro do receptor (DAINESE *et al.*, 2012).

A remoção dos componentes e detritos celulares podem reduzir as reações imunológicas responsáveis pela deterioração da valva (SCHOEN *et al.*, 2008; CEBOTARI *et al.*, 2006). Vários métodos têm sido utilizados para a descelularização de valvas cardíacas, a maioria dos quais foram aplicados em xenoenxertos, no entanto os resultados não têm sido uniformes no que diz respeito à descelularização e à manutenção da estrutura da MEC (GILBERT *et al.*, 2006; GRAUSS *et al.*, 2003). Esta situação se deve, em parte, ao fato que o processo de descelularização pode também conduzir a uma remoção de componentes da MEC, tais como os GAGs, os

quais desempenham um papel importante tanto na hidratação e maleabilidade tecidual como na prevenção da calcificação. Além disso, um processo eficiente de descélularização não deve alterar a histoarquitetura da valva cardíaca, nem afetar negativamente qualquer interação entre as células com os componentes da MEC (Figura 4) (SCHOEN, 2008).



**Figura 4.** Principais etapas da produção de valvas cardíacas humanas descélularizadas. O coração é obtido do doador cadáver e é realizada a dissecação para obtenção das valvas (A); as valvas são descélularizadas com a solução PUC-I (B); Obtenção da valva cardíaca humana descélularizada (C); Implante da valva no receptor (D). Fonte: adaptado de [www1.folha.uol.com.br](http://www1.folha.uol.com.br)

## 1.6 ARMAZENAMENTO DE VALVAS CARDÍACAS HUMANAS

Os diferentes métodos utilizados para a preservação de tecidos variam de acordo com os tecidos e com o propósito de seu uso. O objetivo principal da preservação de tecidos biológicos é que o mesmo conserve as propriedades biológicas e mecânicas.

O melhor método de conservação para estocagem, priorizando a qualidade e a segurança do tecido ainda não está bem definido. Diferentes protocolos de preservação para tecidos têm sido descritos, utilizando o glutaraldeído (SALLES *et al.*, 1998), o glicerol (PARKER *et al.*, 1978), o etanol+glicerol+polietilenoglicol (CHEUNG *et al.*, 2001), a fresco em temperatura de 4°C (ANDERSON e HANCOCK, 1976; THOMSON, 1980) e a criopreservação (O'BRIEN *et al.*, 1987a; O'BRIEN *et al.*, 1987b).

A criopreservação tem a vantagem da estocagem por longos períodos, entretanto, pode ocorrer deterioração e calcificação devido à formação de gelo intersticial (BROCKBANK *et al.*, 2000; SCHENKE-LAYLAND *et al.*, 2006; VILLALBA *et al.*, 2001). Esta condição pode impactar na durabilidade do tecido pós-implante.

No caso específico das valvas cardíacas humanas descélularizadas, o método de conservação consiste no armazenamento em solução salina estéril a temperaturas entre 2-8°C, denominado armazenamento hipotérmico, por até 6 meses, seguindo a

Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, RDC Nº 55, de 11/12/2015 (BRASIL, 2015).

### **1.7 USO CLÍNICO DAS VALVAS CARDÍACAS HUMANAS DESCCELULARIZADAS**

A engenharia de tecidos de valvas cardíacas representa uma alternativa para o uso de válvulas mecânicas e biológicas, oferecendo valvas cardíacas humanas viáveis, não imunogênicas e biologicamente ativas (CEBOTARI *et al.*, 2006).

Pesquisas recentes têm proposto que a descclularização possa ser um método alternativo de processamento das valvas cardíacas humanas tanto em estudos pré-clínicos (CHEN *et al.*, 2008; BARAKI *et al.*, 2012; HONGE *et al.*, 2011; TUDORACHE *et al.*, 2007; BARBERA *et al.*, 2013) quanto em estudos clínicos (DA COSTA *et al.*, 2014; ZEHR *et al.*, 2005; DA COSTA *et al.*, 2010; DOHMEN, 2011; CEBOTARI *et al.*, 2011; TUDORACHE *et al.*, 2013). Há fortes evidências de que a eliminação das células da MEC valvar diminui significativamente as respostas imunológicas em receptores valvares (HAWKINS *et al.*, 2003; KNEIB *et al.*, 2012; DA COSTA *et al.*, 2005). Ao retirar todas as células das cúspides valvares e da parede arterial do conduto, obtém-se uma matriz acelular, inerte do ponto de vista imunológico. Assim, estes tecidos apresentam, pelo menos em teoria, maior potencial de durabilidade e regeneração, o que evitaria a necessidade de reoperações (BARAKI *et al.*, 2012; DA COSTA *et al.*, 2010; CEBOTARI *et al.*, 2011).

As valvas cardíacas humanas descclularizadas já estão em uso clínico, em especial para substituição da via de saída do ventrículo direito e para a cirurgia de Ross, com bom resultado funcional em médio prazo. Estes estudos vêm demonstrando que os tecidos descclularizados tem resultados superiores quando comparados aos tecidos criopreservados (DA COSTA *et al.*, 2014).

Os resultados imediatos e de médio prazo do uso de valvas cardíacas humanas descclularizadas são pelo menos tão bons quanto os de valvas cardíacas humanas criopreservadas com taxas de explante e degeneração mais baixos do que as criopreservadas convencionalmente (DA COSTA *et al.*, 2009; CEBOTARI *et al.*, 2011; RUZMETOV *et al.*, 2012). A taxa de reoperações de valvas cardíacas humanas convencionais atinge de 20% a 30% dos pacientes após 5 anos, enquanto as taxas de reoperação utilizando as descclularizadas é de 0% a 10% após 5 anos (CEBOTARI *et al.*, 2011; RUZMETOV *et al.*, 2012).

## 1.8 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Entre o processamento de descellularização da valva cardíaca humana e seu uso clínico, transcorrerá um inevitável período de tempo até que todas as análises (documentação do doador, sorologia e microbiologia) estejam prontas. Além disso, esta valva pode permanecer em estoque caso não seja utilizada imediatamente. Este período é conhecido como prazo de validade ou *shelf life*, e pode afetar a integridade da valva bem como seu desempenho a longo prazo (JULIEN *et al.*, 1997). O prazo de validade é definido como o tempo, desde a sua fabricação, em que um produto mantém suas características de qualidade dentro de padrões estabelecidos por lei e/ou aceitáveis por parte do consumidor.

Conforme a Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, RDC N° 50, de 20/09/2011, para estabelecer o prazo de validade de produtos biológicos somente serão aceitos estudos de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2010).

Estudos de estabilidade de longa duração são experimentos conduzidos em condições pré-estabelecidas de temperatura e umidade, que devem representar um modelo das condições climáticas no ambiente em que os produtos serão transportados e armazenados durante seu prazo de validade. Têm como objetivo comprovar os prazos de validade estimados. Alguns aspectos devem ser considerados como a conservação das propriedades físicas (aspecto, cor, odor, uniformidade), a integridade da estrutura química sem alterações do pH e as características microbiológicas, garantindo o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (ORIQUI *et al.*, 2013). As amostras, em número necessário para a realização dos diversos ensaios no período definido, neste caso, deverão ser mantidas em condições normais de armazenagem, e a frequência das avaliações deve ser feita caso a caso, conforme o tipo de produto e prazo de validade estimado. Se for desejada a ampliação do prazo de validade, deve-se acompanhar o produto por mais tempo. Os estudos de estabilidade acelerada, projetados para acelerar as degradações químicas, biológicas e/ou mudanças físicas de um produto biológico em condições forçadas de armazenamento, só servem para estimar o tempo (BRASIL, 2010).

Os produtos biológicos são, na sua maioria, constituídos por moléculas proteicas altamente complexas. A estrutura das proteínas é altamente sensível a diversos fatores ambientais e físico-químicos.

Com a finalidade de garantir a integridade química, física, microbiológica e funcional das valvas cardíacas humanas descelularizadas, sob influência dos fatores ambientais em função do tempo, este projeto propõe o estudo da estabilidade biológica de longa duração e dos limites aceitáveis de resíduos químicos com o intuito de complementar as determinações existentes nos dispositivos legais.

## 2 JUSTIFICATIVA

Novas tecnologias de processamento tecidual indicam a descelularização como a opção adequada para remover os componentes e detritos celulares responsáveis pela deterioração *in vivo* dos tecidos. Porém não se sabe se os tecidos cardiovasculares descelularizados conservam as características anatômicas e histomorfológicas da MEC, mantendo uma estrutura susceptível ao repovoamento, durante o armazenamento a longo prazo.

Dentre as diversas questões, a estocagem de tecidos cardiovasculares descelularizados sem perda da estrutura e função biológica é de suma importância para os Bancos de Tecidos que têm como atribuições garantir a qualidade e a segurança dos tecidos humanos disponibilizados para uso terapêutico.

As valvas cardíacas humanas descelularizadas são mantidas em solução salina estéril a 2-8°C por até 6 meses. Invariavelmente há perda de tecidos por expiração deste prazo, pois além das características anatômicas das valvas cardíacas não se enquadrarem em todos os pacientes, ainda é necessário tempo para análise documental, sorológica e microbiológica do doador e seus tecidos. Considerando o alto custo empregado no processamento de tecidos cardiovasculares, seja de materiais ou de mão de obra especializada, são necessários estudos que possibilitem o aumento do tempo de expiração destas valvas. Um estudo demonstrando a possibilidade de aumento deste tempo de expiração reduzirá os desperdícios das valvas cardíacas humanas doadas e, por conseguinte, dos materiais utilizados no processo, incluindo descontaminação, descelularização, exames sorológicos e microbiológicos, principalmente num país em desenvolvimento como o Brasil.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a estabilidade e integridade da MEC de valvas cardíacas humanas submetidas ao processo de descelularização e armazenadas por 6, 12 e 18 meses.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar macroscopicamente a valva cardíaca humana descelularizada imediatamente após a descelularização (tempo 0) e comparar após estocagem por 6 meses, 12 meses e 18 meses;
- Avaliar alterações de pH da solução de estocagem imediatamente após a descelularização (tempo 0) e após estocagem por 6 meses, 12 meses e 18 meses;
- Avaliar a integridade da matriz extracelular de valvas cardíacas humanas descelularizadas por análise histológica imediatamente após a descelularização (tempo 0) e após estocagem por 6 meses, 12 meses e 18 meses;
- Analisar a presença/ausência de bactérias e fungos nas amostras de meio de cultura microbiológica convencional imediatamente após a descelularização (tempo 0) e após estocagem por 6 meses, 12 meses e 18 meses;
- Identificar e quantificar a presença de resíduos químicos do processo de descontaminação com antibióticos e do processo de descelularização;
- Analisar a citotoxicidade de valvas cardíacas humanas descelularizadas imediatamente após a descelularização (tempo 0) e após estocagem por 6 meses, 12 meses e 18 meses;
- Realizar testes biomecânicos de tração e alongamento em valvas cardíacas humanas descelularizadas imediatamente após a descelularização (tempo 0) e após estocagem por 6 meses, 12 meses e 18 meses.

## **4 METODOLOGIA**

Foram utilizadas 70 valvas aórticas e pulmonares humanas descelularizadas provenientes de doadores cadáveres que não foram liberadas para uso clínico (tempo 0) ou tiveram seu prazo de validade expirado (tempo 6, 12 e 18 meses), respeitando-se os critérios estabelecidos na Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, RDC Nº 55, de 11/12/2015, publicada no Diário Oficial da União em 14/12/2015, que dispõe sobre as Boas Práticas em Tecidos Humanos para uso terapêutico (Brasil, 2015), bem como a portaria nº 2.600/GM de 21 de outubro de 2009 que estabelece o regulamento técnico do Sistema Nacional de Transplantes (Brasil, 2009). As valvas foram analisadas imediatamente após a descelularização (tempo 0) e após estocagem por 6, 12 e 18 meses. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica (aprovação nº 1.455.773).

### **4.1 DISSECÇÃO DOS CORAÇÕES PARA OBTENÇÃO DAS VALVAS AÓRTICA E PULMONAR**

Os corações foram submetidos a lavagens sucessivas com solução salina estéril a 4°C até sua completa limpeza. Com o auxílio de bisturi e tesoura, a musculatura da via de saída proximal do ventrículo direito foi dissecada, deixando uma borda muscular de 2 a 3 cm fazendo a transecção distal do tronco da artéria pulmonar 2 a 3 cm acima das comissuras das valvas aórtica e pulmonar. A camada adventícia e o tecido gorduroso periadventicial foram cuidadosamente dissecados em toda a extensão do conduto arterial. As valvas cardíacas foram acondicionadas em frasco com tampa contendo solução composta de 500mL de meio RPMI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos) acrescido de 240µg/mL de cefoxitina (Blau, Cotia, Brasil), 120µg/mL de lincomicina (NeoQuímica, Anápolis, Brasil), 50µg/mL de vancomicina (Teuto, Anápolis, Brasil) e 100µg/mL de polimixina B (Eurofarma, São Paulo, Brasil), seguindo protocolo de descontaminação estabelecido pelo Alabama Tissue Center (Birmingham – Alabama – USA) e utilizado no Banco de Tecidos Humanos da PUCPR.

### **4.2 DESCELULARIZAÇÃO**

Para a descelularização, foram utilizados 200 mL da solução 0,1% de SDS (Sigma-Aldrich) e 0,02% de EDTA (Sigma-Aldrich) sob agitação constante a 80 rpm, em temperatura controlada a 22°C, por um período de 24 horas, com troca da solução a cada 3 horas nas primeiras 6 horas. Decorrido este tempo, as valvas cardíacas foram lavadas com solução salina à temperatura ambiente por 30 minutos e então

imersas em álcool de cereais 70% (Formédica, Curitiba, Brasil) sob agitação constante a 80 rpm, em temperatura controlada a 22°C, por um período de 24 horas. Após este período, as valvas cardíacas foram lavadas com solução salina estéril, uma vez ao dia, por um período de 10 dias, visando a remoção do detergente e *debris* celulares.

Todas as valvas cardíacas humanas descelularizadas que entraram neste estudo foram analisadas previamente e apresentaram ausência de microrganismos viáveis confirmada pelos testes de esterilidade preconizados pela Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010).

### **4.3 ARMAZENAMENTO**

As valvas cardíacas humanas descelularizadas foram estocadas em frascos inertes, impermeáveis e autoclaváveis de policarbonato (Corning, Nova Iorque, Estados Unidos) submersas em 200mL de solução salina estéril. Os frascos contendo as valvas foram mantidas em refrigerador com temperatura controlada (2-8°C) conforme o tempo de análise para o estudo (tempo 0, 6, 12 e 18 meses).

### **4.4 ANÁLISE MACROSCÓPICA E TÁTIL**

Durante os diferentes tempos de armazenamento, todas as 70 valvas com suas soluções de armazenamento e embalagens foram avaliadas em relação ao aspecto visual e tátil. Em relação ao aspecto visual das valvas foram analisados a forma e a cor. Em relação ao aspecto tátil foram analisados a consistência e a superfície. A solução de estocagem foi avaliada em relação ao volume, à cor e à opacidade. A embalagem e a etiqueta foram analisadas em relação à integridade. Estes testes foram realizados por um único avaliador sem conhecimento prévio do tempo de armazenamento das valvas analisadas.

### **4.5 pH**

O valor de pH da solução de estocagem foi obtido pelo método da potenciometria direta, utilizando um pHmetro digital (Gehaka, São Paulo, Brasil), circuito potenciômetro acoplado a um eletrodo combinado de vidro. Inicialmente o aparelho foi calibrado com soluções tampão (pH4,0 e pH7,0). Neste parâmetro leva-se em consideração a concentração de íons hidrogênio ( $H^+$ ) que determina o índice de concentração numa faixa que vai de 0 a 14, sendo considerada ácida (quando  $pH < 7$ ); neutra (quando  $pH = 7$ ) e básica (quando  $pH > 7$ ). Foram realizadas 3 leituras consecutivas de sete soluções de armazenamento no tempo imediato e de 19 soluções nos demais tempos analisados. Os valores obtidos no visor do equipamento foram registrados em planilha.

#### 4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a análise histológica foram utilizadas 6 valvas cardíacas humanas descelularizadas, sendo 3 aórticas e 3 pulmonares, de onde foram coletadas amostras longitudinais com 0,5cm de largura compostas de conduto e cúspide. Estas amostras foram fixadas com formalina 10%, embebidas em parafina e seccionadas em cortes de 4 µm. Para esta análise foram realizadas as colorações de hematoxilina-eosina (HE) e pentacrômico de Russel-Movat's (PRM).

Os cortes corados pelo HE foram usados para verificar a organização geral do tecido. Os núcleos foram corados em azul e o citoplasma, as fibras colágenas e elásticas em rosa. Os cortes corados pelo PRM foram usados para verificar a composição da MEC. As fibras elásticas e núcleo celular foram corados em preto, as fibras colágenas em amarelo, os GAGs livres em azul, os GAGs ligados ao colágeno em verde, o citoplasma em rosa e a fibrina, as proteínas solúveis coaguladas e o músculo em vermelho. As lâminas foram observadas em microscópio óptico (Olympus™ BX51, Toquio, Japão) e digitalizadas no scanner Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss - Oberkochen, Alemanha).

#### 4.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Amostras para culturas bacteriológicas e micológicas da solução de estocagem foram coletadas de todos os 70 frascos contendo as valvas cardíacas do estudo em quatro diferentes períodos: 1) imediatamente após o processo de descelularização; 2) após 6 meses de armazenamento; 3) após 12 meses de armazenamento; 4) após 18 meses de armazenamento. A solução de estocagem foi filtrada em membrana 0,45 µm, em cabine de segurança biológica classe II-A, conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010) e retornou ao frasco de origem juntamente com a valva para, após 6 meses, ser analisada novamente até que se completem os 4 períodos. A membrana de filtração foi dividida em 3 partes e cada uma foi semeada em frascos de 90mL: Caldo Tioglicolato (Laborclin, Pinhais, Brasil), Caldo Trípico-soja (Laborclin) e Caldo Sabouraud (Laborclin). Os frascos de cultura microbiológica foram incubados por 14 dias, a 35°C, 22°C e 22°C respectivamente e examinados diariamente para verificar a presença de turbidez e mudança de cor. Caso ocorresse crescimento, os microrganismos seriam identificados por gênero e espécie.

##### 4.7.1 Teste de bacteriostase e fungistase

De acordo com SAEGEMAN *et al.* (2008) foram inoculados, em placas de ágar Mueller-Hinton (BD®, Heidelberg, Alemanha), os microrganismos *Staphylococcus*

*aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 diluídos para um padrão de turbidez equivalente a 0,5 McFarland. Amostras de valvas cardíacas aórtica e pulmonar descelularizadas nos quatro períodos de teste: imediato, 6 meses, 12 meses e 18 meses foram cortadas com o auxílio de punch dermatológico de 6mm de diâmetro. As amostras da solução de estocagem foram impregnadas em discos de celulose de 6mm. As amostras teciduais e da solução foram transferidas para as placas por 24h a 36°C para averiguação de presença de halo de inibição. Os testes foram realizados em triplicata técnica e biológica.

Os halos de inibição ao redor das amostras foram avaliados semiquantitativamente como: halo pequeno (<0,7 cm); halo intermediário (0,7 e 0,8 cm); e halo grande (> 0,8 cm).

#### **4.8 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL (LC-MS/MS)**

Considerando que durante o processo de descelularização ocorre o efeito de diluição, o método de análise escolhido para analisar resíduos de SDS, cefoxitina, lincomicina, vancomicina e polimixina B deve ser capaz de detectar estas substâncias em baixas concentrações. Para tal mister, foi realizada a análise de 24 valvas cardíacas humanas descelularizadas, 6 valvas para cada tempo analisado (imediato, 6, 12 e 18 meses de armazenamento), pelo sistema de cromatografia em fase líquida de alta eficiência com espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) com ionização por eletrospray (ESI) modelo API 4000 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemanha).

As amostras teciduais foram cortadas com o auxílio de tesoura e bisturi, homogeneizadas e 0,5g foi pesado em tubo de centrífuga de 50mL. Foram adicionados 20mL de metanol como solvente de extração para a análise de SDS; 2,0mL de acetonitrila para a análise de cefoxitina, lincomicina e vancomicina e 20mL de ácido fórmico 0,3% e ácido trifluoracético 0,01% em mistura de acetonitrila em água (5:95) para a análise de polimixina B. Os solventes de extração foram definidos baseados na solubilidade do analito e na remoção de interferentes. Foram escolhidos aqueles que tiveram maior recuperação dos compostos em testes feitos com amostras fortificadas (tecidos frescos adicionados de quantidade conhecida do analito para validar o método utilizado).

As amostras foram agitadas vigorosamente no agitador de tubos por 4 minutos, os tubos foram colocados em banho ultrassônico por 15 minutos e centrifugados a 6000 rpm por 10 minutos. O extrato foi filtrado com auxílio de unidade filtrante em celulose regenerada, com porosidade de 0,45 $\mu$ m e 1,0mL do extrato filtrado foi transferido para um frasco amostrador automático.

O limite de quantificação foi de 0,20 mg kg<sup>-1</sup> por composto. O controle positivo foi realizado com soluções padrão estoque 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> dos compostos de interesse diluídas em metanol. O controle negativo foi realizado com amostras de tecido fresco (sem passar por nenhum processo).

Desta forma foram comparadas respostas qualitativas para confirmar a presença ou ausência dos compostos através dos respectivos espectros de massas e quantitativas para o cálculo das concentrações dos mesmos. O algoritmo automático de integração, modificação dos parâmetros instrumentais do sistema LC-MS/MS, bem como a aquisição de dados foram verificados com o auxílio do software Analyst<sup>®</sup> 1.6.2. (Sciex, Warrington, Reino Unido).

#### **4.9 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR CONTATO DIRETO**

A citotoxicidade das valvas descelularizadas foi analisada utilizando o ensaio de contato direto, conforme ISO 10993/5. Foram utilizadas 24 valvas cardíacas humanas descelularizadas, sendo 6 valvas para cada tempo testado. De acordo com a normativa, células BALB/c 3T3 (clone A31 – Banco de células do Rio de Janeiro – RJ, Brasil; passagem #10<sup>2</sup>) em meio Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina foram cultivadas por 72 horas a 37°C (2,2 x10<sup>5</sup> células por poço) sobre fragmentos de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> de valvas descelularizadas aderidas em placas de 6 poços. Células BALB/c 3T3 na condição normal de cultivo e com adição de SDS (100 ng/ $\mu$ l) foram usadas como controles negativo e positivo respectivamente. Após a incubação, as células ao redor do tecido foram analisadas em microscópio de contraste de fase para avaliar seu crescimento em contato com o tecido, tendo como referência a classificação morfológica qualitativa proposta pela ISO 10993/5. Este experimento foi realizado em triplicata técnica e triplicata biológica.

#### **4.10 TESTE BIOMECÂNICO DE TRAÇÃO E ALONGAMENTO**

Para avaliar as modificações estruturais no tecido decorrentes do armazenamento por até 18 meses foi realizado o ensaio de tração. Foram avaliadas

a resistência à tração e alongamento. As análises foram realizadas no equipamento de ensaios universal EMIC DL 500. Foram obtidos corpos de prova dos condutos e das cúspides de 40 valvas cardíacas humanas descelularizadas, sendo 10 valvas para cada tempo analisado, seguindo a norma ASTM D1708-13 (ASTM D1708-13 - *Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics by Use of Microtensile Specimens*), que trata do ensaio de tração de materiais plásticos em micro corpos de prova. Após o corte dos condutos, feito com faca própria no formato de duplo T, foram medidas a espessura, a largura e o comprimento de cada corpo de prova. As cúspides foram testadas inteiras e medidos os mesmos parâmetros do conduto em duplo T. Os corpos de prova foram posicionados no equipamento EMIC e as informações de entrada: espessura, largura e comprimento base foram fornecidas ao programa. Uma força inicial de aproximadamente 0,01N foi aplicada e o ensaio foi realizado com velocidade de deslocamento constante de 10mm/min até o rompimento da amostra. Foram registradas curvas de tensão x deslocamento. Para o cálculo da tensão de tração, foi considerada a área inicial (largura x espessura) das amostras e o alongamento foi determinado pelo deslocamento das pinças do aparelho. O alongamento foi medido até o ponto equivalente à tensão máxima suportada pelo tecido e a resistência mecânica definida como sendo o valor de tensão máxima suportada. Foram obtidas as curvas médias de tensão-deformação para cada amostra e gráficos do tipo *scatter plot* para as propriedades de resistência à tração e alongamento.

#### **4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados contínuos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados através de análise univariada comparando os tempos, usando GraphPad Prisma (GraphPad Software Inc., Estados Unidos). O valor  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE VISUAL, pH E TÁTIL

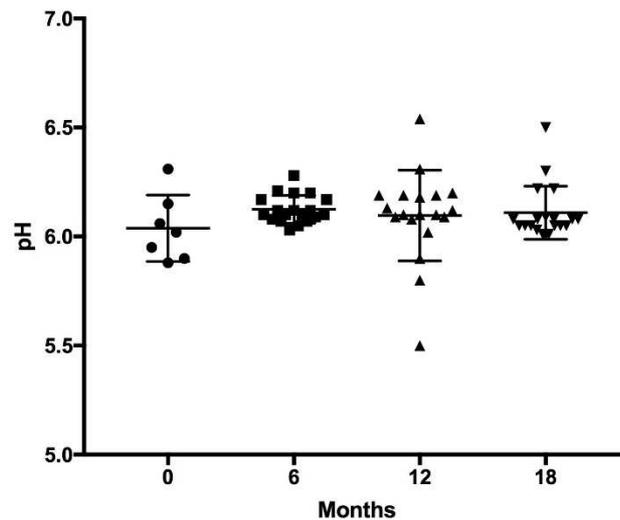
Não foram observadas alterações significativas na estrutura macroscópica das valvas que pudessem estar relacionadas aos tempos de estocagem analisados. As embalagens e as etiquetas mantiveram-se íntegras. Não houve mudança no volume, cor e turbidez da solução de estocagem durante o armazenamento por até 18 meses em temperatura entre 2-8°C (Figura 5).



**Figura 5.** Análise macroscópica: embalagem e etiqueta íntegra; solução de estocagem transparente, límpida e com o mesmo volume inicial. Fonte: o autor, 2018.

O pH inicial da solução salina foi de 5,8. Nas primeiras 24 horas de armazenamento, o pH da solução foi de  $6,06 \pm 0,20$  nas valvas aórticas descelularizadas e  $6,01 \pm 0,05$  nas pulmonares descelularizadas. Após 6 meses, as valvas aórticas apresentaram pH de  $6,12 \pm 0,06$  e as pulmonares,  $6,14 \pm 0,05$ . Após 12 meses, o pH foi de  $6,07 \pm 0,22$  para as aórticas descelularizadas e de  $6,21 \pm 0,09$  para as pulmonares. Após 18 meses, as aórticas apresentaram pH de  $6,10 \pm 0,12$  e as pulmonares,  $6,15 \pm 0,012$ . A diferença entre os grupos nos diversos tempos de armazenamento não foi significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 6).

As valvas aórticas e pulmonares descelularizadas apresentaram características similares em termos de percepção tátil nos diversos tempos de armazenamento.



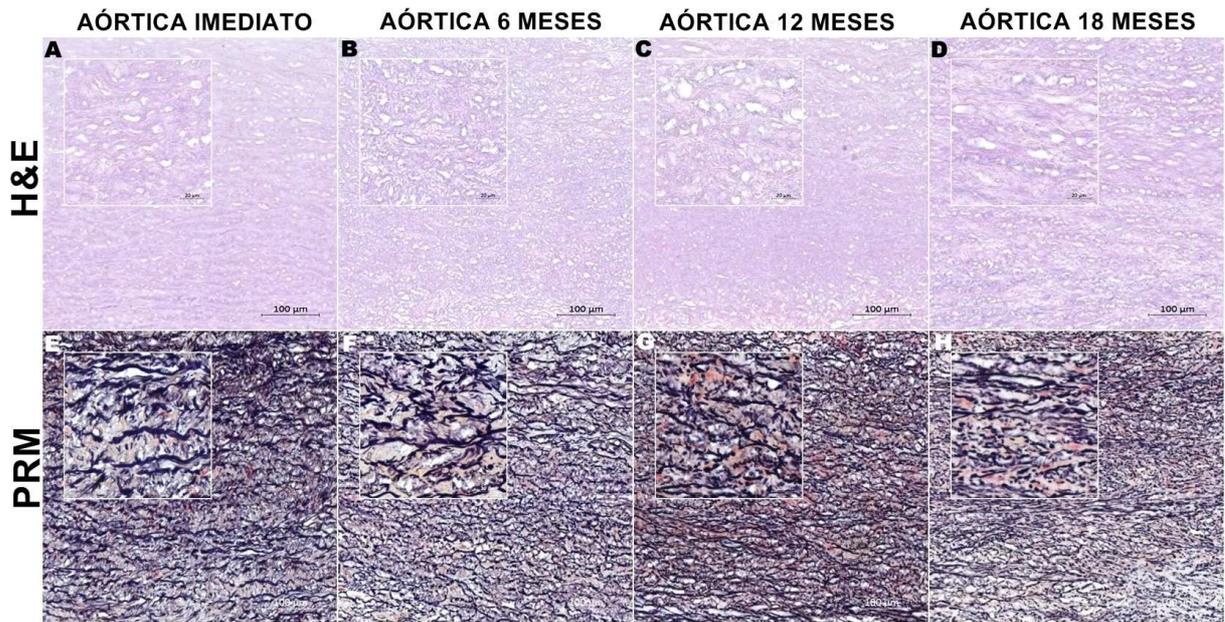
**Figura 6.** Análise comparativa de valores de pH da solução de estocagem nos tempos 0, 6, 12 e 18 meses de armazenamento. Fonte: o autor, 2018.

## 5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

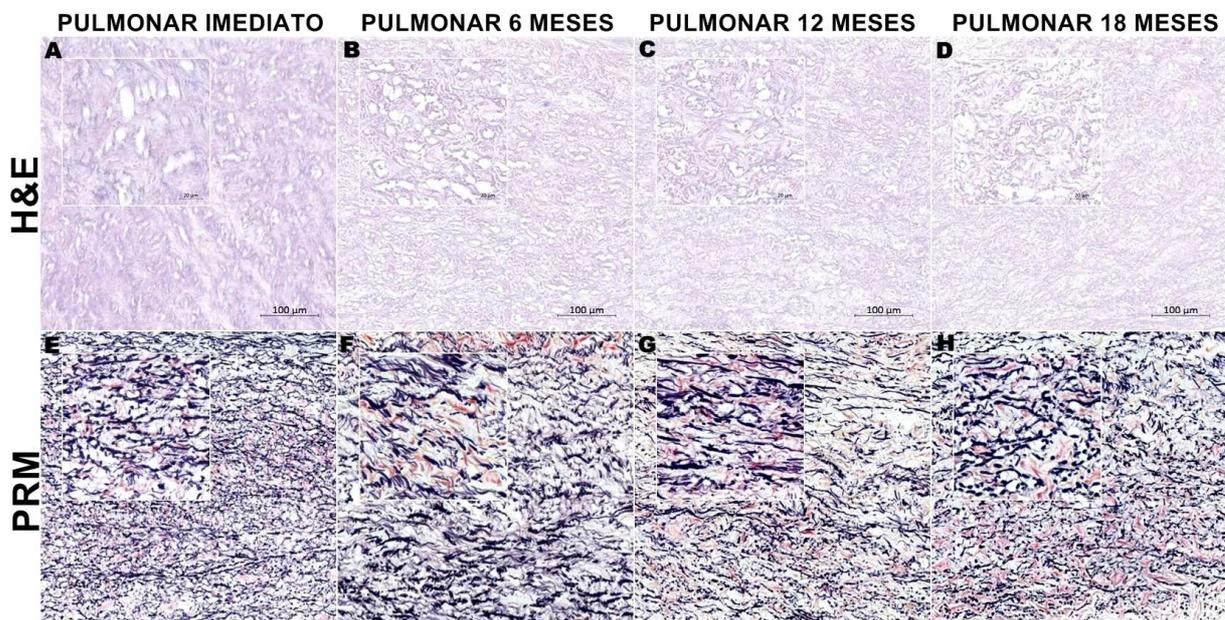
Amostras coradas por HE não apresentaram efeitos deletérios nem sinais de autólise na estrutura da MEC durante os tempos de armazenamento 0, 6, 12 e 18 meses das valvas aórticas e pulmonares descélularizadas (Figuras 7 A-D e 8 A-D).

Os principais componentes da MEC foram analisados utilizando a coloração PRM onde o colágeno aparece amarelo, a elastina aparece preta e os GAGs, azuis (Figuras 7 E-H e 8 E-H). A MEC descélularizada apresentou fragmentação nas fibras elásticas causada pelo processo de descélularização, entretanto, a orientação em camadas foi mantida. Foi observado um rearranjo das fibras tanto na aórtica quanto na pulmonar descélularizada sem degeneração da estrutura relacionada ao tempo de armazenamento. Após os diversos tempos de armazenamento testados, a morfologia das valvas aórtica e pulmonar permaneceu como as recém descélularizadas.

As leituras foram realizadas com auxílio de um patologista em testes duplo-cegos em relação ao tipo de valva e ao tempo analisado.



**Figura 7.** Análise histológica de condutos aórticos descelularizados. Seções representativas coradas com hematoxilina-eosina e pentacrômico de Russel Movat's não apresentaram efeitos deletérios nem sinais de autólise na estrutura da MEC devido ao método de preservação nos diversos tempos de armazenamento: 6 meses (B, F), 12 meses (C, G) e 18 meses (D, H) comparados aos analisados imediatamente após o processo de descelularização, 0 meses (A, E). Fonte: o autor, 2018.

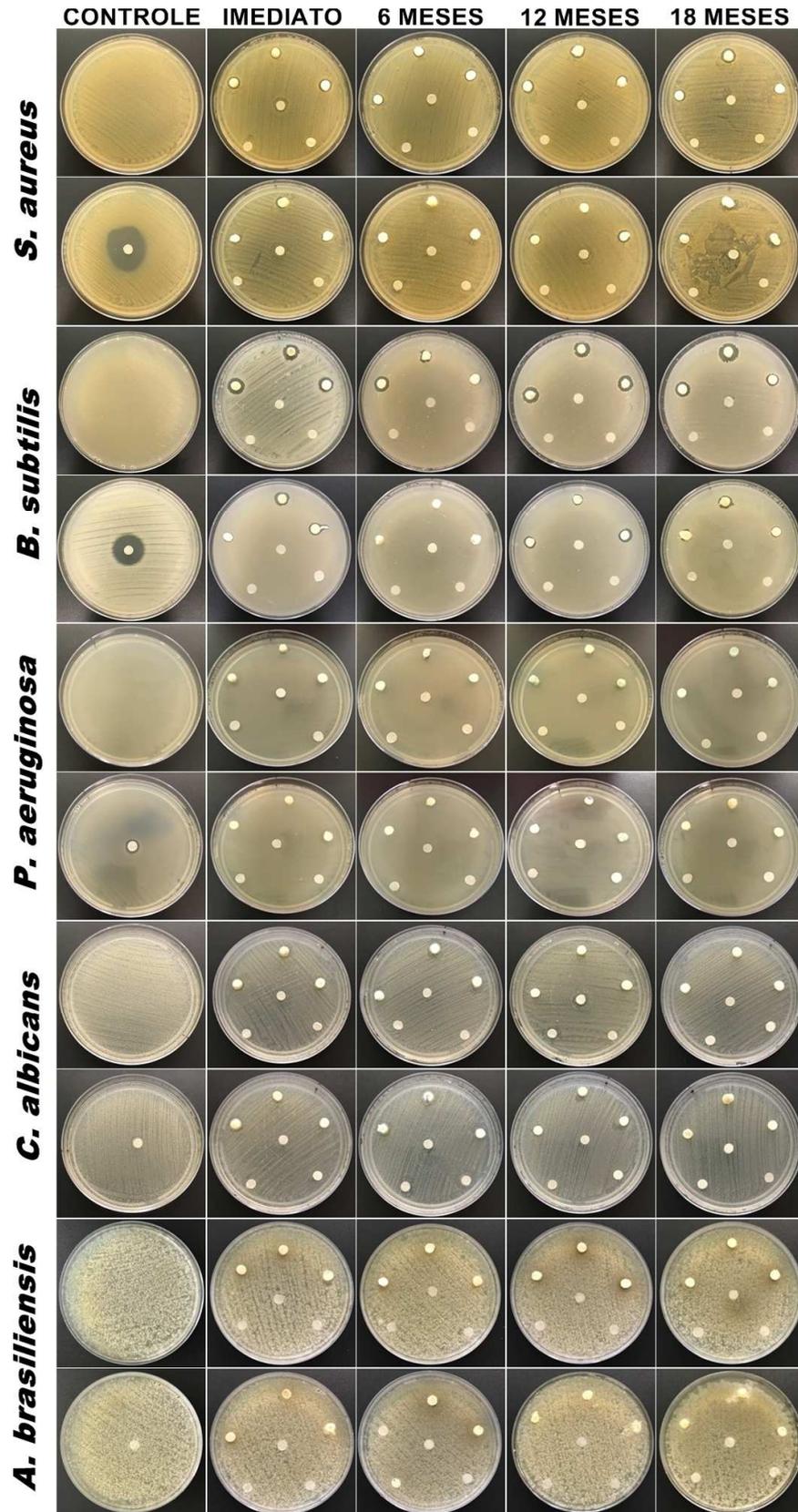


**Figura 8.** Análise histológica de condutos pulmonares descelularizados. Seções representativas coradas com hematoxilina-eosina e pentacrômico de Russel Movat's não apresentaram efeitos deletérios nem sinais de autólise na estrutura da MEC devido ao método de preservação nos diversos tempos de armazenamento: 6 meses (B, F), 12 meses (C, G) e 18 meses (D, H) comparados aos analisados imediatamente após o processo de descelularização, 0 meses (A, E). Fonte: o autor, 2018.

### 5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Não houve crescimento bacteriano e/ou fúngico em nenhum dos períodos testados (0, 6, 12 e 18 meses). Para os testes de bacteriostase e fungistase, as amostras teciduais de valvas aórticas e pulmonares descelularizadas apresentaram formação de halo de inibição para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* em todos os tempos (Figura 9). Nas amostras testadas com *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis* não ocorreu formação de halo de inibição. Ao classificar as amostras testadas com *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* pelo tamanho de formação dos halos todas as amostras apresentaram halo de tamanho pequeno, com exceção da amostra de valva aórtica 18 meses que apresentou halo de inibição classificado como intermediário para *Bacillus subtilis* (Anexo – tabela 1).

Estes resultados indicam que as amostras testadas não apresentam atividade antimicrobiana, evitando resultados falso negativos nos testes de esterilidade realizados neste estudo.



**Figura 9.** Teste de bacteriostase e fungistase. Amostras teciduais (3) e da solução de estocagem (3) inoculadas em placas de ágar Mueller-Hinton com os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus brasiliensis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Para cada microrganismo, a linha de cima corresponde a amostras aórticas e a de baixo, amostras pulmonares. Fonte: o autor, 2018.

#### **5.4 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL (LC-MS/MS)**

Inicialmente foram otimizadas as condições analíticas, parâmetros da fonte de ionização do espectrômetro de massas, composição e vazão da fase móvel utilizada na cromatografia, assim como o tipo de coluna cromatográfica, temperatura do forno de coluna e gradiente, visando um pequeno tempo de análise, com uma boa resolução e separação entre os picos dos analitos de interesse. Como a fragmentação é característica para cada analito, os componentes foram identificados pelo perfil de fragmentação e pela comparação do tempo de retenção dos compostos de interesse com os dos padrões dessas substâncias, analisadas nas mesmas condições cromatográficas

O método foi validado com a adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse pré-estabelecido na análise de linearidade seguida pela determinação da concentração do analito adicionado (amostra fortificada). Todas as amostras fortificadas foram validadas na mesma concentração de 0,20 mg/kg na amostra e a recuperação aceita foi de 70 a 120%.

Na figura 10 estão representados os cromatogramas de massa da fragmentação da cefoxitina obtidos por espectrometria de massa sequencial com a identificação dos principais fragmentos. Verificou-se que as amostras consideradas brancas (Figura 10A) estavam isentas de sinais cromatográficos idênticos ao padrão (Figura 10B). Ao analisar as amostras de valva aórtica sem lavagem (Figura 10C) e valva pulmonar sem lavagem (Figura 10D) foi possível detectar sinais cromatográficos idênticos ao padrão. A cefoxitina não foi detectada e quantificada nas amostras de valvas aórticas descelularizadas no tempo imediato (Figura 10E); tempo 6 meses (Figura 10G); tempo 12 meses (Figura 10I); tempo 18 meses (Figura 10K) e pulmonares descelularizadas no tempo imediato (Figura 10F); tempo 6 meses (Figura 10H); tempo 12 meses (Figura 10J); tempo 18 meses (Figura 10L).

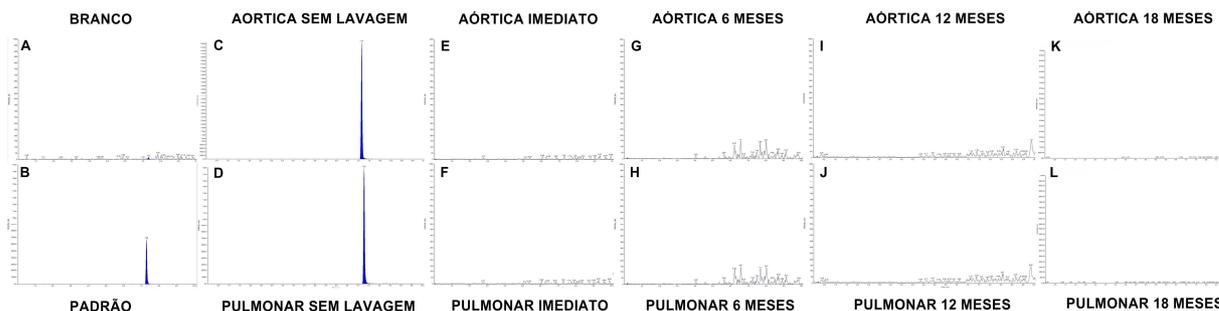


Figura 10. Cromatogramas de massa para o composto cefoxitina obtidos por LC-MS/MS em valva aórtica e pulmonar descelularizadas. Controles: branco (A), padrão de 20 ng/mL de cefoxitina (B), valva aórtica sem lavagem da solução de descontaminação (C), valva pulmonar sem lavagem da solução de descontaminação (D), valva aórtica tempo imediato (E), valva pulmonar tempo imediato (F), valva aórtica 6 meses (G), valva pulmonar 6 meses (H), valva aórtica 12 meses (I), valva pulmonar 12 meses (J), valva aórtica 18 meses (K), valva pulmonar 18 meses (L). Fonte: o autor, 2018.

Na figura 11 estão representados os cromatogramas de massa da fragmentação da lincomicina obtidos por espectrometria de massa sequencial com a identificação dos principais fragmentos. Verificou-se que as amostras consideradas brancas (Figura 11A) estavam isentas de sinais cromatográficos idênticos ao padrão (Figura 11B). Ao analisar as amostras de valva aórtica sem lavagem (Figura 11C) e valva pulmonar sem lavagem (Figura 11D) foi possível detectar sinais cromatográficos idênticos ao padrão. A lincomicina não foi detectada e quantificada nas amostras de valvas aórticas descelularizadas no tempo imediato (Figura 11E); tempo 6 meses (Figura 11G); tempo 12 meses (Figura 11I); tempo 18 meses (Figura 11K) e pulmonares descelularizadas no tempo imediato (Figura 11F); tempo 6 meses (Figura 11H); tempo 12 meses (Figura 11J); tempo 18 meses (Figura 11L).

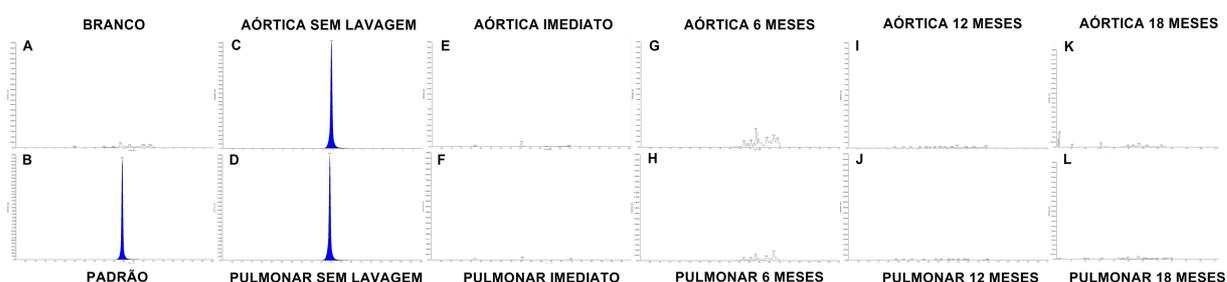


Figura 11. Cromatogramas de massa para o composto lincomicina obtidos por LC-MS/MS em valva aórtica e pulmonar descelularizadas. Controles: branco (A), padrão de 20 ng/mL de lincomicina (B), valva aórtica sem lavagem da solução de descontaminação (C), valva pulmonar sem lavagem da solução de descontaminação (D), valva aórtica tempo imediato (E), valva pulmonar tempo imediato (F), valva aórtica 6 meses (G), valva pulmonar 6 meses (H), valva aórtica 12 meses (I), valva pulmonar 12 meses (J), valva aórtica 18 meses (K), valva pulmonar 18 meses (L). Fonte: o autor, 2018.

Na figura 12 estão representados os cromatogramas de massa da fragmentação da polimixina B obtidos por espectrometria de massa sequencial com a identificação dos principais fragmentos. Verificou-se que as amostras consideradas brancas (Figura 12A) estavam isentas de sinais cromatográficos idênticos ao padrão

(Figura 12B). Ao analisar as amostras de valva aórtica sem lavagem (Figura 12C) e valva pulmonar sem lavagem (Figura 12D) foi possível detectar sinais cromatográficos idênticos ao padrão. A polimixina B foi detectada e quantificada nas amostras de valvas aórticas descelularizadas no tempo imediato  $31,57 \pm 23,65$  (Figura 12E); tempo 6 meses  $12,85 \pm 7,55$  (Figura 12G); tempo 12 meses  $2,87 \pm 2,20$  (Figura 12I); tempo 18 meses  $25,18 \pm 27,68$  (Figura 12K) e pulmonares descelularizadas no tempo imediato  $4,58 \pm 2,74$  (Figura 12F); tempo 6 meses  $5,59 \pm 3,26$  (Figura 12H); tempo 12 meses  $0,3 \pm 0,08$  (Figura 12J); tempo 18 meses  $1,73 \pm 1,04$  (Figura 12L).

O resíduo de polimixina B nas valvas pulmonares no tempo 0 comparado aos demais tempos foi significativo ( $p = 0.017$ ), no entanto a diferença para as valvas aórticas não foi significativa ( $p = 0.083$ ) a um nível de significância de 5%.

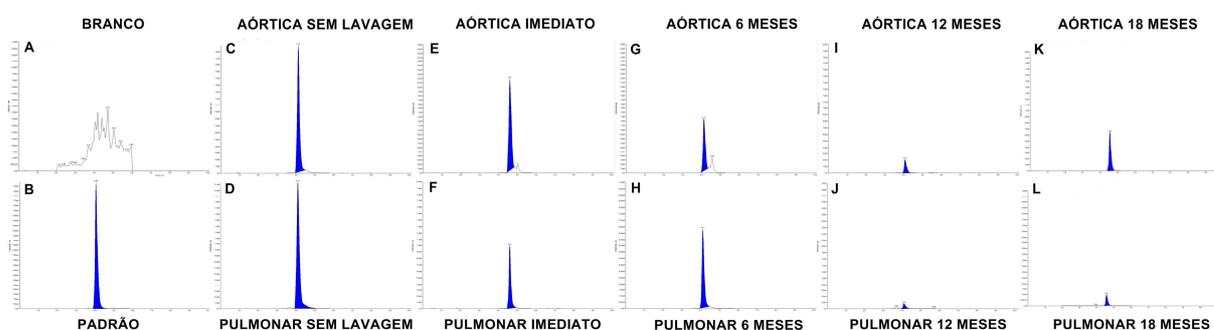


Figura 12. Cromatogramas de massa para o composto polimixina B obtidos por LC-MS/MS em valva aórtica e pulmonar descelularizadas. Controles: branco (A), padrão de 100 ng/mL de polimixina (B), valva aórtica sem lavagem da solução de descontaminação (C), valva pulmonar sem lavagem da solução de descontaminação (D), valva aórtica tempo imediato (E), valva pulmonar tempo imediato (F), valva aórtica 6 meses (G), valva pulmonar 6 meses (H), valva aórtica 12 meses (I), valva pulmonar 12 meses (J), valva aórtica 18 meses (K), valva pulmonar 18 meses (L). Fonte: o autor, 2018.

Na figura 13 estão representados os cromatogramas de massa da fragmentação da vancomicina obtidos por espectrometria de massa sequencial com a identificação dos principais fragmentos. Verificou-se que as amostras consideradas brancas (Figura 13A) estavam isentas de sinais cromatográficos idênticos ao padrão (Figura 13B). Ao analisar as amostras de valva aórtica sem lavagem (Figura 13C) e valva pulmonar sem lavagem (Figura 13D) foi possível detectar sinais cromatográficos idênticos ao padrão. A vancomicina foi detectada e quantificada nas amostras de valvas aórticas descelularizadas no tempo imediato  $70,87 \pm 26,22$  (Figura 13E); tempo 6 meses  $27,92 \pm 5,40$  (Figura 13G); tempo 12 meses  $26,75 \pm 10,83$  (Figura 13I); tempo 18 meses  $80,38 \pm 50,02$  (Figura 13K) e pulmonares descelularizadas no tempo imediato  $24,69 \pm 17,67$  (Figura 13F); tempo 6 meses  $27,55 \pm 9,82$  (Figura 13H); tempo 12 meses  $13,55 \pm 7,05$  (Figura 13J); tempo 18 meses  $44,28 \pm 27,25$  (Figura 13L).

O resíduo de vancomicina nas valvas pulmonares no tempo 0 aos demais tempos não foi significativo ( $p = 0.147$ ), e também não foi significativo nas valvas aórticas ( $p = 0.121$ ) a um nível de significância de 5%.

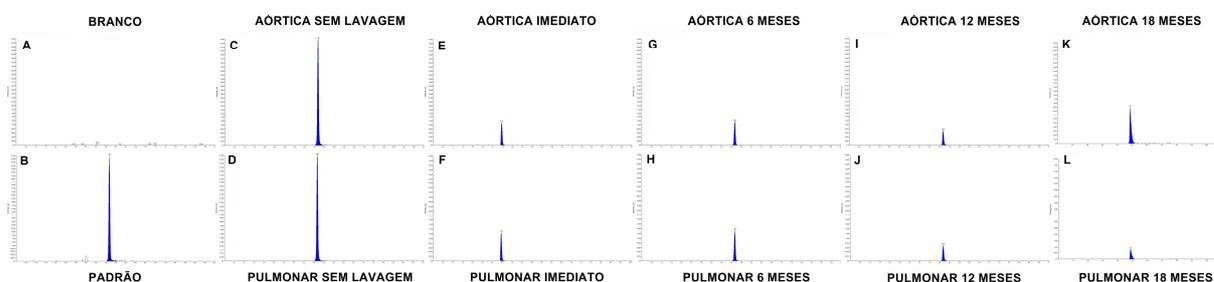


Figura 13. Cromatogramas de massa para o composto vancomicina obtidos por LC-MS/MS em valva aórtica e pulmonar descélularizadas. Controles: branco (A), padrão de 80 ng/mL de vancomicina (B), valva aórtica sem lavagem da solução de descontaminação (C), valva pulmonar sem lavagem da solução de descontaminação (D), valva aórtica tempo imediato (E), valva pulmonar tempo imediato (F), valva aórtica 6 meses (G), valva pulmonar 6 meses (H), valva aórtica 12 meses (I), valva pulmonar 12 meses (J), valva aórtica 18 meses (K), valva pulmonar 18 meses (L). Fonte: o autor, 2018.

Na figura 14 estão representados os cromatogramas de massa da fragmentação do SDS obtidos por espectrometria de massa sequencial com a identificação dos principais fragmentos. Verificou-se que as amostras consideradas brancas (Figura 14A) estavam isentas de sinais cromatográficos idênticos ao padrão (Figura 14B). Ao analisar as amostras de valva aórtica sem lavagem (Figura 14C) e valva pulmonar sem lavagem (Figura 14D) foi possível detectar sinais cromatográficos idênticos ao padrão. O SDS foi detectado e quantificado nas amostras de valvas aórticas descélularizadas no tempo imediato  $47,17 \pm 7,52$  (Figura 14E); tempo 6 meses  $63,4 \pm 5,47$  (Figura 14G); tempo 12 meses  $63,35 \pm 16,83$  (Figura 14I); tempo 18 meses  $70,98 \pm 20,57$  (Figura 14K) e pulmonares descélularizadas no tempo imediato  $54,55 \pm 11,90$  (Figura 14F); tempo 6 meses  $55,25 \pm 12,14$  (Figura 14H); tempo 12 meses  $62,7 \pm 3,6$  (Figura 14J); tempo 18 meses  $68,58 \pm 29,49$  (Figura 14L).

O resíduo de SDS nas valvas pulmonares no tempo 0 comparado aos demais tempos não foi significativo ( $p = 0.734$ ) e também não foi significativo nas valvas aórticas ( $p = 0.354$ ) a um nível de significância de 5%.

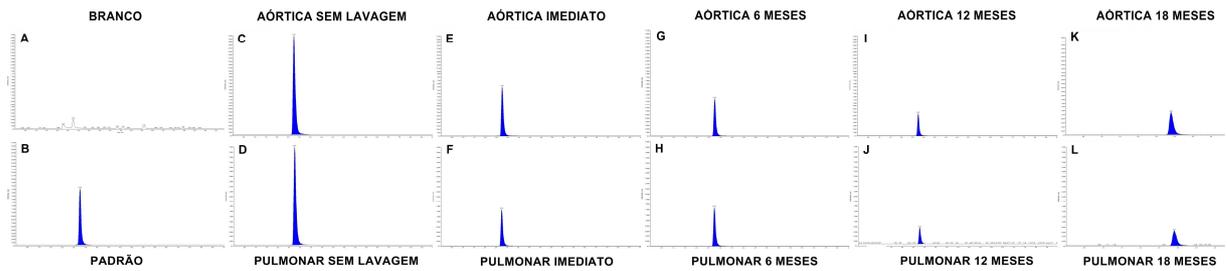


Figura 14. Cromatogramas de massa para o composto SDS obtidos por LC-MS/MS em valva aórtica e pulmonar descelularizadas. Controles: branco (A), padrão de 60 ng/mL de SDS (B), valva aórtica sem lavagem da solução de descontaminação (C), valva pulmonar sem lavagem da solução de descontaminação (D), valva aórtica tempo imediato (E), valva pulmonar tempo imediato (F), valva aórtica 6 meses (G), valva pulmonar 6 meses (H), valva aórtica 12 meses (I), valva pulmonar 12 meses (J), valva aórtica 18 meses (K), valva pulmonar 18 meses (L). Fonte: o autor, 2018.

### 5.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR CONTATO DIRETO

De acordo com a figura 9, a morfologia dos fibroblastos murinos cultivados com o tecido das valvas aórticas e pulmonares descelularizadas durante os tempos 0, 6, 12 e 18 meses (figura 15) mostrou-se normal após 72 horas de incubação, semelhante ao controle negativo, com fibroblastos alongados em crescimento. O SDS (controle positivo) causou forte citotoxicidade celular, exibindo morte celular acentuada.

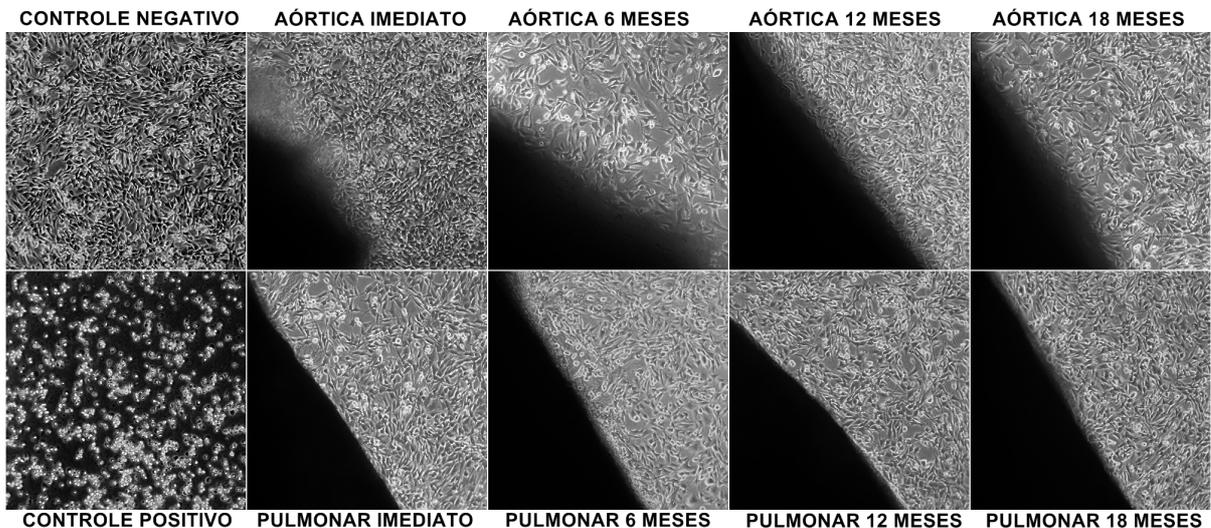


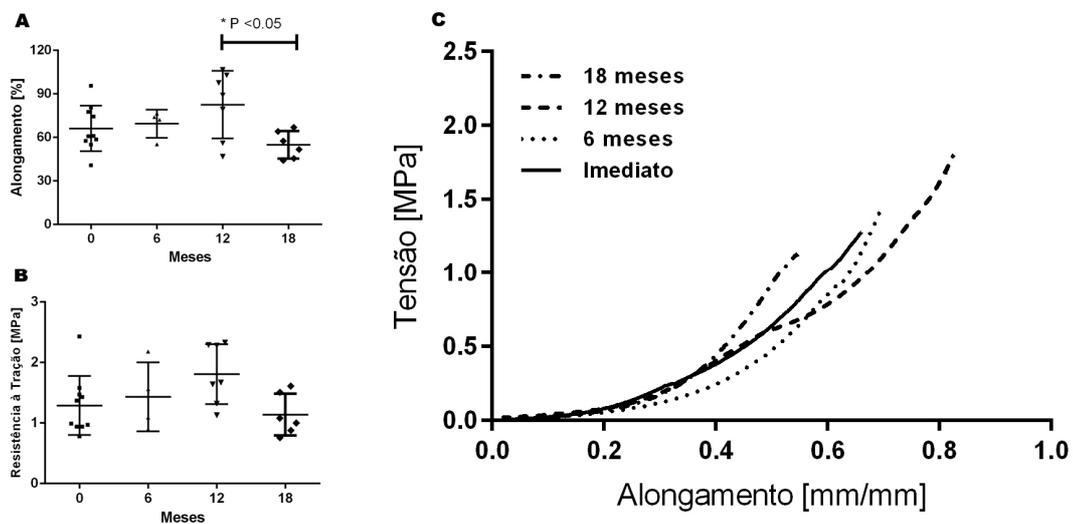
Figura 15. Ensaio de citotoxicidade por contato direto. Aparência morfológica de fibroblastos murinos BALB/c 3T3 no ensaio de citotoxicidade por contato direto após 72 horas de cultivo com das valvas descelularizadas. Aumento de 10x. Fonte: o autor, 2018.

### 5.6 TESTE BIOMECÂNICO DE TRAÇÃO E ALONGAMENTO

As propriedades de resistência a tração e de alongamento das valvas aórticas descelularizadas (Figura 16 e 17) e pulmonares descelularizadas (Figura 18 e 19) estão representadas nos gráficos mostrando a média e o desvio padrão, e nas curvas médias de resistência à tração x alongamento.

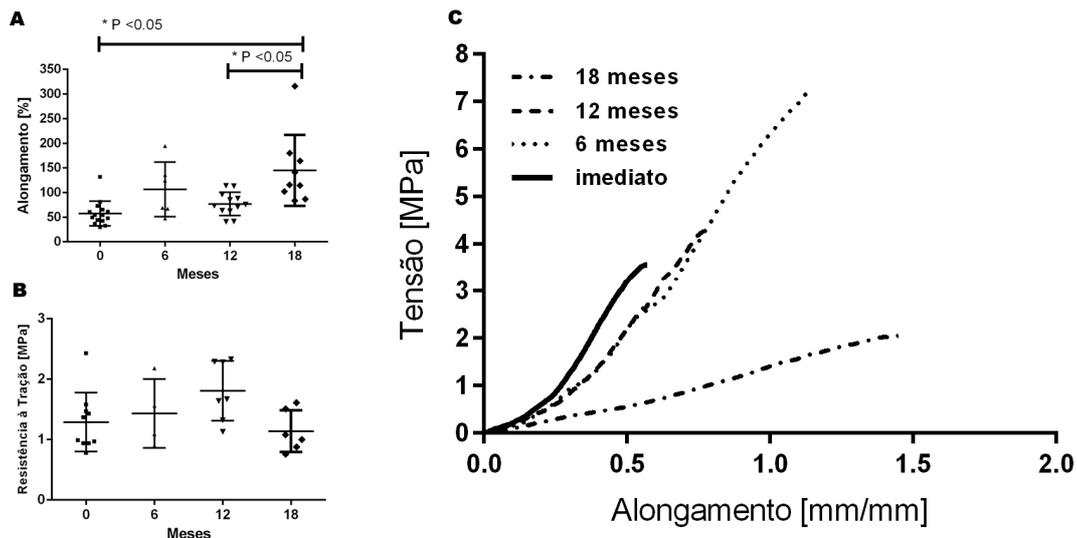
Nos condutos aórticos e pulmonares descelularizados, as curvas correspondentes aos quatro períodos testados apresentaram o mesmo comportamento na fase inicial, onde há solicitação de elastina; na fase de transição, onde há transferência da resistência da elastina para as fibras de colágeno e na fase final onde o colágeno é bastante solicitado até o momento da ruptura do tecido.

Nos condutos aórticos não houve diferença significativa entre os quatro tempos em relação à resistência à tração. Com relação à propriedade de alongamento, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 12 e 18 meses (Figura 16).



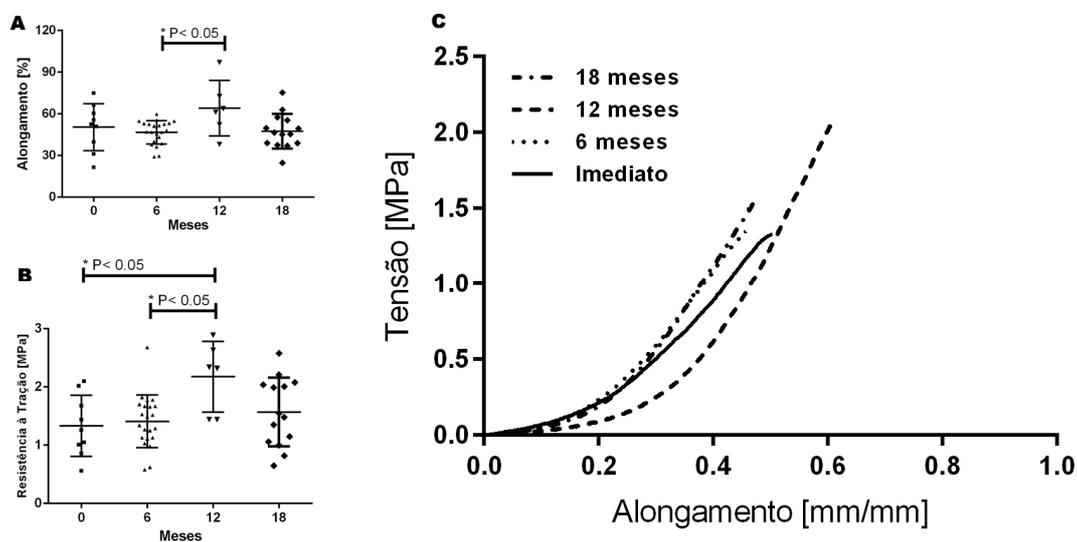
**Figura 16.** Representação gráfica dos parâmetros mecânicos obtidos para valvas aórticas descelularizadas imediatamente após o processo de descelularização (tempo 0) e após armazenamento (tempo 6, 12 e 18 meses): Alongamento do conduto aórtico (A) e resistência a tração do conduto aórtico (B) e curva (C). Fonte: o autor, 2018.

Nas cúspides aórticas, houve diferença significativa em relação ao alongamento do tecido entre os tempos 0 e 18 meses e entre 12 e 18 meses. Quanto à resistência à tração, não houve diferença entre os quatro tempos (Figura 17).



**Figura 17.** Representação gráfica dos parâmetros mecânicos obtidos para valvas aórticas descélularizadas imediatamente após o processo de descélularização (tempo 0) e após armazenamento (tempo 6, 12 e 18 meses): Alongamento da cúspide aórtica (A) e resistência a tração da cúspide aórtica (B) e curva (C). Fonte: o autor, 2018.

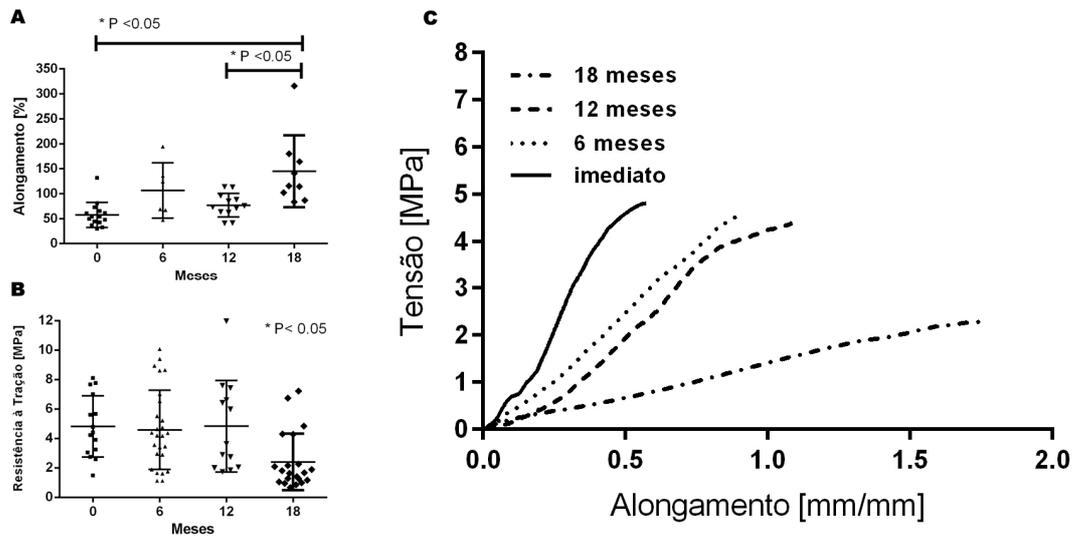
Nos resultados dos condutos pulmonares descélularizados, houve diferença significativa para ambas as propriedades: alongamento (entre 6 e 12 meses) e resistência à tração (entre 0 e 12 meses e entre 6 e 12 meses) (Figura 18).



**Figura 18.** Representação gráfica dos parâmetros mecânicos obtidos para valvas pulmonares descélularizadas imediatamente após o processo de descélularização (tempo 0) e após armazenamento (tempo 6, 12 e 18 meses): Alongamento do conduto pulmonar (A) e resistência a tração do conduto pulmonar (B) e curva (C). Fonte: o autor, 2018.

Para as cúspides pulmonares descélularizadas, a propriedade alongamento mostrou diferença significativa entre os tempos 12 e 18 meses e entre 0 e 18 meses.

No caso da resistência à tração houve diferença significativa entre os tempos 0 e 18, entre 6 e 18 e entre 12 e 18 meses (Figura 19).



**Figura 19.** Representação gráfica dos parâmetros mecânicos obtidos para valvas pulmonares descclularizadas imediatamente após o processo de descclularização (tempo 0) e após armazenamento (tempo 6, 12 e 18 meses): Alongamento da cúspide pulmonar (A) e resistência a tração da cúspide pulmonar (B) e curva (C). Fonte: o autor, 2018.

## 6 DISCUSSÃO

A descelularização de órgãos e tecidos é uma ferramenta promissora para aplicação em medicina regenerativa. Atualmente, muitas técnicas estão sendo aplicadas no processo de descelularização (CRAPO *et al.*, 2011), no entanto, faltam estudos sobre a validade destes órgãos e tecidos após o processo de descelularização. A disponibilidade de valvas cardíacas humanas depende da doação do coração e, após o processo de descelularização, do prazo de validade. Apesar da restrição do número destes tecidos e da grande demanda muitas vezes ocorre o descarte devido a expiração do prazo de validade. O armazenamento de valvas cardíacas humanas descelularizadas e a avaliação da sua qualidade durante esta estocagem são fatores determinantes de sua durabilidade (BARIC *et al.*, 2004), no entanto o conhecimento atual é limitado (WANG *et al.*, 2014).

No presente trabalho, foi observado que o armazenamento hipotérmico por até 12 meses em solução salina estéril de valvas cardíacas humanas descelularizadas permite a preservação das propriedades estruturais e funcionais da MEC.

Uma vez que as valvas cardíacas humanas descelularizadas são preparadas para uso clínico foi realizada uma avaliação macroscópica e tátil. Em nossos resultados, observamos que não ocorreram diferenças na percepção tátil após o armazenamento hipotérmico em solução salina estéril por até 18 meses, corroborando com as observações macroscópicas. Estas análises são relevantes por atuarem diretamente nos riscos associados ao uso clínico, como a falha do implante devido a diferenças na forma, consistência e textura, influenciando inclusive na força da sutura feita pelo cirurgião no implante (WESTEBRING-VAN DER PUTTEN *et al.*, 2008; TREJOS *et al.*, 2010).

Neste estudo, demonstramos que o tempo e a temperatura de armazenamento não tiveram efeito significativo no potencial hidrogênico (pH) da solução de estocagem das valvas cardíacas humanas descelularizadas mantidas por até 18 meses. Durante o processo de descelularização e armazenamento, muitos fatores ambientais como a concentração de oxigênio do meio, o pH, as forças mecânicas e a composição bioquímica influenciam na estabilidade dos produtos biológicos (BARIC *et al.*, 2004; WATERMAN, 2005). Estes fatores impactam na funcionalidade, bem como na estabilidade da maioria das proteínas por serem pH-dependente (BOWLER, 2007). O pH da solução de estocagem não se alterou significativamente durante 0, 6, 12 e 18 meses de estocagem quando comparado com o pH inicial de 5,8. Julien *et al* (1997)

demonstraram que a temperatura do armazenamento de tecidos biológicos também influencia o pH da solução, tendo uma redução a temperatura ambiente quando comparado com os tecidos refrigerados.

Por meio das análises histológicas, verificou-se que as valvas cardíacas humanas aórticas e pulmonares descelularizadas apresentaram a estrutura histológica muito similar nos diferentes tempos de armazenamento. As colorações de HE e PRM permitiram observar que nenhum efeito deletério ou sinais de autólise na estrutura da MEC ocorreram devido ao método de armazenamento. Esses resultados mostram que as alterações da MEC foram muito mais relacionadas ao processo de descelularização do que ao armazenamento. Sabe-se que qualquer processo de descelularização causa um certo grau de degeneração da MEC, podendo romper fibras elásticas e colágeno bem como diminuir a quantidade de GAGs (CRAPO *et al.*, 2011).

Os riscos decorrentes de transplantes de tecidos infectados foram amplamente documentados. Casos de infecções bacterianas, fatais ou não, em receptores tem chamado a atenção para a importância de se evitar doadores de tecidos suspeitos de carregarem doenças infecciosas (EASTLUND, 1995; KUEHNERT *et al.*, 1998; EASTLUND, 2006). Além disso, outros cuidados como não processar tecidos sabidamente contaminados por bactérias virulentas e validar os métodos de descontaminação e de detecção de microrganismos evitando resultados falso negativos devem ser aplicados. A fonte de contaminação pode ser do doador, do local de captação, da equipe de captação, como também do ambiente, reagentes e insumos utilizados para a dissecação e processamento (EASTLUND, 2006). Os tecidos utilizados neste estudo apresentaram culturas microbiológicas negativas até 18 meses de estocagem.

Por essa razão, uma etapa essencial no processamento de valvas cardíacas humanas é a descontaminação. Os protocolos diferem amplamente entre os bancos de tecidos quanto ao tipo, à concentração, à temperatura e ao tempo de exposição aos antibióticos (PAOLIN *et al.*, 2017). Após o processo de descontaminação é realizada lavagem com soro fisiológico com o objetivo de remover o excesso de antibióticos, no entanto, quantidades significativas destes compostos podem permanecer nos tecidos (LEEMING *et al.*, 2005). O problema destes resíduos em valvas cardíacas humanas utilizadas *in vivo* é que podem mascarar uma contaminação microbiológica, resultando em resultado falso negativo nos testes de esterilidade (GATTO *et al.*, 2013

e BUZZI *et al.*, 2014), com risco potencial de infecções pós-cirúrgicas (EASTLUND, 2006).

Neste estudo, as valvas cardíacas humanas foram descontaminadas com baixas concentrações de antibióticos (240 mg/L de cefoxitina, 50 mg/L de vancomicina, 120 mg/L de lincomicina e 100 mg/L de polimixina B) diluídos em meio RPMI 1640 por 24 horas, sob refrigeração. Para avaliar se as valvas cardíacas humanas apresentavam resíduos de antibióticos foi realizada a quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Dentre os antibióticos analisados, a vancomicina e a polimixina B foram detectados em todas as valvas. No entanto, os resultados de teste de bacteriostase e fungistase indicaram a ausência de atividade antimicrobiana até 18 meses de estocagem. O potencial para toxicidade local, sistêmica ou reação alérgica devido ao resíduo de antibiótico presente na valva cardíaca humana também é uma questão importante. Embora não tenham sido realizados estudos para determinar as concentrações sistêmicas de antibióticos após o transplante, é improvável que as concentrações encontradas nas valvas resultem em concentrações tóxicas sistemicamente, mesmo que sejam liberadas rapidamente das mesmas (LEEMING *et al.*, 2005).

Com o objetivo de assegurar que as valvas descelularizadas não apresentam toxicidade após o processo de descelularização foi realizado o ensaio de citotoxicidade. Os resultados dos nossos ensaios mostraram que as valvas cardíacas humanas descelularizadas e armazenadas nos diferentes tempos não apresentaram efeitos tóxicos, pois após 72 horas de incubação, os fibroblastos estavam com morfologia característica e em crescimento. De forma semelhante, em um trabalho anterior realizado em nosso grupo, não foi observada citotoxicidade em pericárdios humanos descelularizados pela mesma metodologia (WOLLMANN *et al.*, 2018, no prelo). A eficácia da remoção do detergente foi também estudada por Cebotari *et al.* (2010) em valvas pulmonares porcinas descelularizadas e a consequente reendotelização com células endoteliais humanas. Os resultados deste estudo demonstraram que após seis lavagens, a quantidade aproximada de SDS foi abaixo de 50mg/L, portanto, a concentração de detergente na solução de lavagem menor que 50mg/L pode ser usada como um indicador para produzir um tecido não citotóxico. Esta concentração não apresentou influência tóxica em culturas de células, resultando em arcabouços que poderiam ser eficientemente reendotelizados com células endoteliais humanas. Resultados similares foram obtidos por Mirsadraee *et al.* (2006)

nos quais pericárdios humanos descelularizados usando SDS 0,1% lavados várias vezes reduziram a presença de resíduos químicos na MEC a níveis não citotóxicos. Vafae *et al.* (2018) demonstraram em condutos de valvas aórticas e pulmonares descelularizadas com baixa concentração de SDS que estes tecidos não eram tóxicos para células *in vitro* conforme testes de citotoxicidade. Em contraste, Rieder *et al.* (2004) reportaram citotoxicidade em valvas aórticas porcinas descelularizadas com SDS 0,1%. Neste estudo, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial foi utilizada para detectar resíduos de SDS, os quais podem estar associados com a degeneração da MEC. No entanto, os resultados indicam que após o processo de descelularização resíduos de SDS permanecem nos tecidos sem causar dano a MEC ou toxicidade.

Como os tecidos são processados e armazenados para aplicação *in vivo*, suas propriedades funcionais devem ser preservadas. Estas são dependentes do tecido e frequentemente relacionadas às propriedades biomecânicas (HAN & BISCHOF, 2004). A caracterização biomecânica de valvas cardíacas humanas nativas e descelularizadas são raras na literatura (BALGUID *et al.*, 2007; STRADINS *et al.*, 2004), tornando difícil uma análise comparativa com outros estudos. Além disso, os parâmetros, a metodologia e o método de análise dos testes biomecânicos diferem significativamente (KOROSSIS *et al.*, 2002; GRANDE-ALLEN *et al.*, 2011).

Neste estudo, os condutos e cúspides aórticos descelularizados apresentaram as mesmas propriedades até 12 meses de armazenamento em relação à resistência à tração e alongamento. Já os condutos pulmonares descelularizados, apresentaram diferença significativa para estas propriedades. A diferença entre os tecidos pode ser atribuída a proporção de colágeno/elastina (JANA *et al.*, 2014), uma vez que estes componentes respondem por importantes funções na manutenção das propriedades biomecânicas da MEC.

Em valvas cardíacas, bem como em muitos tecidos, o colágeno é a principal proteína estrutural responsável pela integridade dessas propriedades, predominantemente a resistência à tração. Já foi provado que os agentes descelularizantes usados frequentemente podem romper as fibras de colágeno nos tecidos descelularizados, acabando por diminuir a resistência mecânica do arcabouço obtido pela MEC descelularizada. Além disso, a maioria dos detergentes causa redução de GAGs (VeDEPO *et al.*, 2017), causando diferentes níveis de impacto negativo nas características viscoelásticas do arcabouço.

Uma hipótese também considerada, é de que esta variação das propriedades biomecânicas pode estar relacionada a variabilidade entre os doadores (ZHU & GRANDE-ALLEN, 2018), uma vez que as valvas aórtica e pulmonar têm propriedades ultraestruturais comuns (STRADINS *et al.*, 2004). Neste estudo, a idade dos doadores variou de quatro a 59 anos, com hábitos distintos de tabagismo e alcoolismo, hipertensão arterial, obesidade, bem como sem indicativos de comorbidades. Por isso, os diferentes resultados obtidos neste estudo para valvas aórticas e pulmonares não significa a perda da funcionalidade do enxerto. COSTA *et al.* (2014) vêm demonstrando que valvas descelularizadas tem resultados superiores quando comparadas às criopreservadas.

As valvas cardíacas humanas descelularizadas precisam manter as propriedades biomecânicas consistentes para suportar as pressões e fluxos hemodinâmicos do ambiente *in vivo* (HASAN *et al.*, 2016; SANZ-GARCIA *et al.*, 2015). Além disso, a resistência encontrada neste estudo é superior às pressões as quais o tecido é submetido *in vivo*, sendo de 80 mmHg para as valvas aórticas e 10 mmHg para as valvas pulmonares (GUYTON, 1976).

Definir as propriedades biomecânicas mais relevantes para o sucesso do implante de valvas descelularizadas, bem como os experimentos diretos nos quais essas propriedades possam ser determinadas, são fatores importantes que merecem mais atenção em trabalhos futuros.

Este estudo tem algumas limitações. Não foi possível utilizar o mesmo doador para todas as análises. Por este motivo, os resultados obtidos pelos ensaios biomecânicos não podem ser extrapolados para o comportamento *in vivo*. É possível que a variabilidade entre os doadores (idade, peso, sexo) seja um dos fatores que dificultam a comparação entre os grupos. Além disso, a análise histológica foi qualitativa e não quantitativa.

As valvas cardíacas humanas processadas no Banco de Tecidos Humanos da PUCPR são descelularizadas e, atualmente, armazenadas por até 6 meses, sob refrigeração e em solução salina estéril. Tomados em conjunto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que estas valvas podem ser estocadas por até 12 meses nas mesmas condições sem perda da estrutura e com propriedades biomecânicas compatíveis com o tecido recém descelularizado. Dessa forma, podemos reduzir o número de valvas cardíacas humanas descelularizadas descartadas e aumentar o número de pacientes que podem ser beneficiados.

## 7 CONCLUSÃO

- A análise macroscópica não revelou mudanças no aspecto visual da valva cardíaca humana descelularizada nem da solução de estocagem em todos os tempos analisados;
- O pH da solução de estocagem não se alterou durante os diferentes tempos analisados;
- As análises histológicas não revelaram resultados deletérios ou sinais de degeneração estrutural na matriz extracelular até 18 meses de estocagem;
- Os ensaios de citotoxicidade não revelaram efeito citotóxico causado por amostras de valvas cardíacas humanas descelularizadas nem pela solução de estocagem destas valvas em todos os tempos analisados;
- A quantificação dos resíduos de antibióticos, utilizados na descontaminação dos tecidos, e de SDS, utilizado no processo de descelularização, mostra que mesmo presentes, a quantidade é ínfima, não causando efeito bacteriostático, fungistático ou citotóxico em todos os tempos analisados;
- As valvas cardíacas humanas descelularizadas armazenadas por 18 meses apresentaram menor resistência à tração e alongamento que aquelas armazenadas por até 12 meses;
- A análise microbiológica nos diferentes tempos de armazenamento demonstrou que não houve crescimento microbiológico até os 18 meses, validando a forma de estocagem.

Em conjunto, os resultados apresentados, levando em consideração as limitações do estudo, sugerem que as valvas cardíacas humanas descelularizadas podem ser estocadas por até 12 meses nas mesmas condições atuais sem perda da estrutura e com propriedades biomecânicas compatíveis com o tecido recém descelularizado.

Outras perspectivas que se abrem a partir deste trabalho:

Serão necessários estudos, para complementação dos resultados obtidos neste trabalho, que possam demonstrar a funcionalidade *in vivo* das valvas cardíacas humanas descelularizadas estocadas por até 12 meses.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. *et al.* *Biologia Molecular da Célula*. Quarta edição. Porto Alegre: **Artmed**, 2004.

ANDERSON, E.T.; HANCOCK, E.W. Long-term follow-up of aortic valve replacement with the fresh aortic homograft. **J Thorac Cardiovasc Surg**. v. 72, n. 1, p. 150-156. Jul, 1976.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 5ª Ed. Brasilia,2010b.

BADYLAK, S.F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. **Seminars in cell & developmental biology**. v.13, n.5, p.377-383. Oct, 2002.

BADYLAK, S.F.; GILBERT, T.W. Immune response to biologic scaffold materials. **Seminars in immunology**. v.20, n.2, p.109-116. Apr, 2008.

BALGUID, A.; RUBBENS, M.P.; MOL, A. *et al.* The role of collagen cross-links in biomechanical behavior of human aortic valve leaflets – relevance for tissue engineering. **Tissue Eng**. v.13, n.7, p.1501-1511. Jul, 2007.

BARAKI, H.; TUDORACHE, I.; HOEFFLER, K.; KHALADJ, N.; HAGL, C.; CEBOTARI S. *et al.* Aortic valve re-replacement after Bentall procedure with a biological valved conduit in a sheep model. **The Journal of heart valve disease**. v.21, n.1, p.5-11. Jan, 2012.

BARBERA, M.D.; TUDORACHE, I.; VALENTE, M.; MEYER, T.; THEODORIDIS, K.; BASSO, C. *et al.* Decellularized aortic allografts implanted in sheep: a pathological analysis. **Cardiovascular Pathology**. v.22, n.3, p.e43. May, 2013

BARIC, D.; CEBOTARI, S.; MERTSCHING, H.; LEYH, R.; HAVERICH, A. Could 37 degrees C storage temperature extend homovital valve allograft viability? **J Heart Valve Dis**. v.13, n.3, p.494-500. May, 2004.

BOWLER, B.E. Thermodynamics of protein denatured states. **Mol Biosyst**. v.3, n.2, p.88-99. Feb, 2007.

BRASIL. Informações de Saúde / Assistência à Saúde /Procedimentos Hospitalares por Gestor 2008. In: DATASUS MdS, editor. Brasil: **Ministério da Saúde**; 2012.

BRASIL. PORTARIA Nº 2.600, DE 21 DE OUTUBRO DE 2009. Aprova o regulamento técnico do sistema nacional de transplantes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, out 2009. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2600\\_21\\_10\\_2009.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2600_21_10_2009.html) Acesso em: 15 jun. 2018.

BRASIL. RESOLUÇÃO RDC nº50, DE 20 DE SETEMBRO DE 2011. Dispõe sobre os procedimentos e condições de realização de estudos de estabilidade para o registro ou alterações pós-registro de produtos biológicos e dá outras providências. **ANVISA**, Brasília, DF, set 2011. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0050\\_20\\_09\\_2011\\_rep.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0050_20_09_2011_rep.html) Acesso em: 15 jun. 2018.

BRASIL. RESOLUÇÃO RDC Nº55 DE 11 DE DEZEMBRO DE 2015. Dispõe sobre as Boas Práticas em Tecidos humanos para uso terapêutico. **ANVISA**, Brasília, DF, dez 2015. Disponível em: <http://bibliofarma.com/rdc-n-55-de-11-de-dezembro-de-2015/> Acesso em: 15 jun. 2018.

BRINKLEY, D.M.; GELFAND, E.V. Valvular heart disease: classic teaching and emerging paradigms. **The american journal of medicine**. v.126, n.12, p.1035-1042. Dec, 2013.

BROCKBANK, K.G.; LIGHTFOOT, F.G.; SONG, Y.C.; TAYLOR, M.J. Interstitial ice formation in cryopreserved homografts: a possible cause of tissue deterioration and calcification *in vivo*. **J Heart Valve Dis**, v. 9, n. 2, p. 200-206. Mar, 2000.

BROWN, J.M.; O'BRIEN, S.M.; WU, C.; SIKORA, J.A.; GRIFFITH, B.P.; GAMMIE, J.S. Isolated aortic valve replacement in North America comprising 108,687 patients in 10 years: changes in risks, valve types, and outcomes in the Society of Thoracic Surgeons National Database. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**. v.137, n.1, p.82-90. Jan, 2009.

BUZZI, M.; GUARINO, A.; GATTO, C.; MANARA, S. *et al*. Residual Antibiotics in Decontaminated Human Cardiovascular Tissues Intended for Transplantation and Risk of Falsely Negative Microbiological Analyses. **PLoS ONE**. V.9, n.11, p. e112679. Nov, 2014.

CANNEGIETER, S.C.; ROSENDAAL, F.R.; WINTZEN, A.R.; VAN DER MEER, F.J.; VANDENBROUCKE, J.P.; BRIET, E. Optimal oral anticoagulant therapy in patients with mechanical heart valves. **The New England journal of medicine**. v.333, n.1, p.11-17. Jul, 1995.

CEBOTARI, S.; TUDORACHE, I.; CIUBOTARU, A.; BOETHIG, D.; SARIKOUCH, S.; GOERLER, A. *et al.* Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. **Circulation**. v. 124, n. 11 suppl, p. S115-123. Sep, 2011.

CEBOTARI, S.; TUDORACHE, I.; JAEKEL, T.; HILFIKER, A. *et al.* Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. **Artificial Organs**. v.34, n.3, p.206-210. Mar, 2010.

CEBOTARI, S.; TUDORACHE, I.; LICHTENBERG, A.; HILFIKER, A.; HAVERICH, A. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: Toxic effects of residual detergents on human endothelial cells. **Thorac cardiovasc Surg**. v.54, p.13. 2006.

CHEN, C.H.; WEI, H.J.; LIN, W.W.; CHIU, I.; HWANG, S.M.; WANG, C.C. *et al.* Porous tissue grafts sandwiched with multilayered mesenchymal stromal cell sheets induce tissue regeneration for cardiac repair. **Cardiovascular research**. v.80, n.1, p.88-95. Oct, 2008.

CHEUNG, D.T.; WEBER, P.A.; GROBE, A.C.; SHOMURA, Y.; CHOO, S.J.; LUO, H.H.; MARCHION, D.C.; DURAN, C.M. A new method for the preservation of aortic valve homografts. **J Heart Valve Dis**. v.10, n.6, p. 728-735. Nov, 2001.

CHIKWE, J.; FILSOUFI, F.; CARPENTIER, A.F. Prosthetic valve selection for middle-aged patients with aortic stenosis. **Nature reviews Cardiology**. v.7, n.12, p.711-719. Dec, 2010.

CIUBOTARU, A.; CEBOTARI, S.; TUDORACHE, I.; BECKMANN, E.; HILFIKER, A.; HAVERICH, A. Biological heart valves. **Biomed Tech (Berl)**. v.58, n.5, p.389-397. Oct, 2013.

COFFEY, S.; CAIRNS, B. J.; IUNG, B. The modern epidemiology of heart valve disease. **Heart**. v.102, n. 1, p. 75-85. Jan, 2016.

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

D'ARCY, J.L.; PRENDERGAST, B.D.; CHAMBERS, J.B.; RAY, S.G.; BRIDGEWATER, B. Valvular heart disease: the next cardiac epidemic. **Heart**. v.97, n. 2, p. 91-93. Jan, 2011.

DA COSTA, F.D.; DA COSTA, A.C.; PRESTES, R.; DOMANSKI, A.C.; BALBI, E.M.; FERREIRA, A.D. *et al.* The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts. **The Annals of thoracic surgery**. v.90, n.6, p.1854-1860. Dec, 2010.

DA COSTA, F.D.; DOHMEN, P.M.; DUARTE, D.; VON GLENN, C.; LOPES, S.V.; FILHO, H.H.; DA COSTA, M.B.; KONERTZ, W. Immunological and echocardiographic evaluation of decellularized versus cryopreserved allografts during the Ross operation. **Eur J Cardiothorac Surg**. v. 27, n. 4, p. 572-578. Apr, 2005.

DA COSTA, F.D.; SANTOS, L.R.; COLLATUSO, C.; MATSUDA, C.N.; LOPES, S.A.; CAUDURO, S. *et al.* Thirteen years' experience with the Ross Operation. **The Journal of heart valve disease**. v.18, n.1, p.84-94. Jan, 2009.

DA COSTA, F.D.; TAKKENBERG, J.J.; FORNAZARI, D.; BALBI FILHO, E.M.; COLATUSO, C.; MOKHLES, M.M. *et al.* Long-term results of the Ross operation: an 18-year single institutional experience. **European journal of cardio-thoracic surgery**. v.46, n.3, p.415-422. Sep, 2014.

DAINESE, L.; SACCU, C.; ZOLI, S.; TRABATTONI, P.; GUARINO, A.; CAVALLERO, A.; SPIRITO, R. Vascular homograft use in a femoropopliteal rare bacterial infection bypass. **Int j Artif Organs**. v.35, n.12, p.1077-1079. Dec, 2012.

DOHMEN, P.M. Invited commentary. **The Annals of thoracic surgery**. v.91, n.2, p.490. 2011.

DREGER, S.A.; THOMAS, P.; SACHLOS, E.; CHESTER, A.H.; CZERNUSZKA, J.T.; TAYLOR, P.M. *et al.* Potential for synthesis and degradation of extracellular matrix proteins by valve interstitial cells seeded onto collagen scaffolds. **Tissue engineering**. v.12, n.9, p.2533-2540. Sep, 2006.

EASTLUND, T. Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation. **Cell Tissue Banking**, v. 7, n. 3, p. 147-166. Sep, 2006.

EASTLUND, T. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. **Cell Transplant**, v. 4, n. 5, p. 455-477. Sep-Oct, 1995.

ELKINS, R.C.; DAWSON, P.E.; GOLDSTEIN, S.; WALSH, S.P.; BLACK, K.S. Decellularized human valve allografts. **The Annals of thoracic surgery**. v.71, n.5, p.S428-432. May, 2001.

FAULK, D.M.; JOHNSON, S.A.; ZHANG, L.; BADYLAK, S.F. Role of the extracellular matrix in whole organ engineering. **Journal of cellular physiology**. v.229, n.8, p.984-989. Aug, 2014.

GATTO, C.; GIURGOLA, L.; TOTHOVA, J.D. A suitable and efficient procedure for the removal of decontaminating antibiotics from tissue allografts. **Cell Tissue Bank**. v.14, n.1, p.107-115. Mar, 2013.

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

GRANDE-ALLEN KJ, LIAO J. The heterogeneous biomechanics and mechanobiology of the mitral valve: implications for tissue engineering. **Curr Cardiol Rep**. v.13, n.2, p.113-120. Apr, 2011.

GRAUSS, R.W.; HAZEKAMP, M.G.; VLIET, S.V. *et al*. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**. v.126, n.6, p.2003-2010. Dec, 2003.

GUYTON, A.C. Textbook of Medical Physiology. **W.B. Saunders Company**, Philadelphia. 1976.

HAN, B.; BISCHOF, J.C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. **Cryobiology**. v.48, n.1, p.8-21. Feb, 2004.

HASAN, A. *et al*. Micro and nanotechnologies in heart valve tissue engineering. **Biomaterials**. v.103, p.278-292. Oct, 2016.

HAWKINS, J.A.; HILLMAN, N.D.; LAMBERT, L.M.; JONES, J.; DI RUSSO, G.B.; PROFAIZER, T. *et al*. Immunogenicity of decellularized cryopreserved allografts in pediatric cardiac surgery: comparison with standard cryopreserved allografts. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**. v. 126, n. 1, p. 247-253. Jul, 2003.

HAYKAL, S.; SOLEAS, J.P.; SALNA, M.; HOFER, S.O.; WADDELL, T.K. Evaluation of the structural integrity and extracellular matrix components of tracheal allografts following cyclical decellularization techniques: comparison of three protocols. **Tissue engineering Part C, Methods**. v.18, n.8, p.614-623. Aug, 2012.

HINTON, R.B.; YUTZEY, K.E. Heart valve structure and function in development and disease. **Annual review of physiology**. v.73, p.29-46. 2011.

HONGE, J.L.; FUNDER, J.; HANSEN, E.; DOHMEN, P.M.; KONERTZ, W.; HASENKAM, J.M. Recellularization of aortic valves in pigs. **European journal of cardio-thoracic surgery**. v.39, n.6, p.829-834. Jun, 2011.

HUDSON, T.W.; LIU, S.Y.; SCHMIDT, C.E. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. **Tissue Eng**. v.10, n.9-10, p.1346-1358. Oct, 2004.

HUMAN, P.; ZILLA, P. Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure. **The Annals of thoracic surgery**. v.71, n.5 suppl, p.S385-388. May, 2001.

HUYGENS, S.A.; GOOSSENS, L.M.A.; VAN ERKELENS, J.A.; TAKKENBERG, J.J.M.; RUTTEN-VAN MÖLKEN, M.P.M.H. How much does a heart valve implantation cost and what are the health care costs afterwards? **Open Heart**. v.5, n.1, p.e000672corr1. Apr, 2018.

ISO. International Organization for Standardization – 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices, 2009.

JULIEN, M.; LÉTOUNEAU, D.R.; MAROIS, Y.; CARDOU, A.; KING, M.W.; GUIDOIN, R.; CHACHRA, D.; LEE, J.M. Shelf-life of bioprosthetic heart valves: a structural and mechanical study. **Biomaterials**. v. 18, n. 8, p. 605-612. Apr, 1997.

KNEIB, C.; VON GLEHN, C.Q.; DA COSTA, F.D.; DA COSTA, M.T.; SUSIN, M.F. Evaluation of humoral immune response to donor HLA after implantation of cellularized versus decellularized human heart valve allografts. **Tissue antigens**. v.80, n.2, p.165-174. Aug, 2012.

KOROSSIS, S.; BOOTH, C.; WILCOX, H.E.; WATTERSON, K.G.; KEARNEY, J.N.; FISHER, J. *et al.* Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. **J Heart Valve Dis**. v.11, n.4, p.463-471. Jul, 2002.

KUEHNERT, M.J.; CLARK, E.; LOCKHART, S.R.; SOLL, D.R.; CHIA, J. *et al.* Candida albicans endocarditis associated with a contaminated aortic valve allograft: implications for regulation of allograft processing. **Clin Infect Dis**, v. 27, n. 4, p. 688-691. Oct, 1998.

JANA, S.; TEFFT, B.J.; SPOON, D.B.; SIMARI, R.D. Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves. **Acta Biomater**. v.10, n.7, p.2877-2893. Jul, 2014.

LEEMING, J.P.; LOVERING, A.M.; HUNT, C.J. Residual antibiotics in allograft heart valve tissue samples following antibiotic disinfection. **J Hosp Infect**. V.60, n.3, p.231-234. Jul, 2005.

LIAO, J.; JOYCE, E.M.; SACKS, M.S. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. **Biomaterials**. v.29, n.8, p. 1065-1074. Mar, 2008.

LOTUFO, P.A.; BENSEÑOR, I.M. Trends of stroke subtypes mortality in Sao Paulo, Brazil (1996-2003). **Arquivos de neuro-psiquiatria**. v.63, n.4, p.951-955. Dec, 2005.

MA, R.; LI, M.; LUO, J.; YU, H.; SUN, Y.; CHENG, S. *et al.* Structural integrity, ECM components and immunogenicity of decellularized laryngeal scaffold with preserved cartilage. **Biomaterials**. v.34, n.7, p.1790-1798. Feb, 2013.

MCGROGAN, D.; MARK, D.; LEE, B.; O'DONNELL, M.E. Implementation of best medical therapy for cardiovascular risk factors in vascular surgery patients treated in a tertiary referral regional unit. **Int J Clin Pract**. v.68, n.9, p.1100-1109. Sep, 2014.

MENDELSON, K.; SCHOEN, F.J. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. **Ann Biomed Eng**. v.34, n.12, p.1799-1819. Dec, 2006.

MEYNS, B.; JASHARI, R.; GEWILLIG, M.; MERTENS, L. *et al.* Factors influencing the survival of cryopreserved homografts. The second homograft performs as well as the first. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**. v.28, n.2, p.211-216. Aug 2005.

MIRSADRAEE, S.; WILCOX, H.E.; KOROSSIS, S.A.; KEARNEY, J.N. *et al.* Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering. **Tissue Eng**. v.12, n.4, p.763-773. Apr, 2006.

MOL, A.; SMITS, A.I.; BOUTEN, C.V.; BAAIJENS, F.P. Tissue engineering of heart valves: advances and current challenges. **Expert review of medical devices**. v.6, n.3, p.259-275. May, 2009.

MONTEIRO, C.A.; LEVY, R.B.; CLARO, R.M.; DE CASTRO, I.R.; CANNON, G. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. **Public Health Nutr**. V.14, n.1, p.5-13. Jan, 2011.

MOO, E.K.; HAN, S.K.; FEDERICO, S.; SIBOLE, S.C.; JINHA, A.; ABU OSMAN, N.A. *et al*. Extracellular matrix integrity affects the mechanical behaviour of in-situ chondrocytes under compression. **Journal of biomechanics**. v. 47, n.5, p.1004-1013. Mar, 2014.

MORONI, F.; MIRABELLA, T. Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering. **American journal of stem cells**. v.3, n.1, p.1-20. Mar, 2014.

NARAYAN, R.P. Development of tissue bank. **Indian J Plast Surg**. v.45, n.2, p.396-402. Sep, 2012.

NELSON, C.M.; BISSELL, M.J. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. **Annu Rev Cell Dev Biol**. v.22, p.287-309. 2006.

NKOMO, V.T.; GARDIN, J.M.; SKELTON, T.N.; GOTTDIENER, J.S.; SCOTT, C.G.; ENRIQUEZ-SARANO, M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. **Lancet**. v.368, n.9540, p.1005-1011. Sep, 2006.

O'BRIEN, M.F.; STAFFORD, E.G.; GARDNER, M.A.; POHLNER, P.G.; McGIFFIN, D.C. A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. **J Thorac Cardiovasc Surg**. v.94, n. 6, p. 812-823. Dec, 1987.

O'BRIEN, M.F.; STAFFORD, G.; GARDNER, M. *et al*. The viable cryopreserved allograft aortic valve. **Journal of Cardiac Surgery**. v.2, n.15, p. 153-167. Mar, 1987.

O'BRIEN, M.F.; GOLDSTEIN, S.; WALSH, S.; BLACK, K.S.; ELKINS, R.; CLARKE D. The SynerGraft valve: a new acellular (nonglutardialdehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. **Semin Thorac Cardiovasc Surg**. v.11, n.4 Suppl 1, p.194-200. Oct, 1999.

O'BRIEN, M.F.; HARROCKS, S.; STAFFORD, E.G.; GARDNER, M.A.; POHLNER, P.G.; TESAR, P.J. *et al.* The homograft aortic valve: a 29-year, 99.3% follow up of 1,022 valve replacements. **The Journal of heart valve disease**. v.10, n.3, p.334-345. May, 2001.

O'BRIEN, M.F.; STAFFORD, E.G.; GARDNER, M.A.; POHLNER, P.G.; TESAR, P.J.; KEAR, L. *et al.* The Medtronic Intact xenograft: an analysis of 342 patients over a seven-year follow-up period. **The Annals of thoracic surgery**. v.60, n.2 Suppl, p.S253-257. Aug, 1995.

O'DONNELL, M., Psychosocial recovery after serious injury. **Eur J Psychotraumatol**. v. 5, p.26516. Dec, 2014.

ORIQUI, L. R.; MORI, M.; WONGTSCHOWSKI, P. Guide for determining the stability of chemical products. **Quím. Nova**. v. 36, n. 2, p. 340-347, 2013 .

PAOLIN, A.; TROJAN, D.; PETIT, P.; COATO, P.; RIGOLI, R. Evaluation of allograft contamination and decontamination at the Treviso Tissue Bank Foundation: A retrospective study of 11,129 tissues. **PLoS ONE**. v.12, n.3, p.e0173154. Mar, 2017.

PARKER, R.; RANDEV, R.; WAIN, W.H.; ROSS, D.N. Storage of heart valve allografts in glycerol with subsequent antibiotic sterilisation. **Thorax**. v. 33, n. 5, p.638-645. Oct, 1978.

PARTINGTON, L.; MORDAN, N.J.; MASON, C.; KNOWLES, J.C.; KIM, H.W.; LOWDELL, M.W. *et al.* Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds. **Acta biomaterialia**. v.9, n.2, p.5251-5261. Feb, 2013.

RIBEIRO, A.L.; DUNCAN, B.B.; BRANT, L.C.; LOTUFO, P.A.; MILL, J.G.; BARRETO, S.M. Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. **Circulation**. v.133, n.4, p.422-433. Jan, 2016.

RIEDER, E.; KASIMIR, M.T.; SILBERHUMER, G.; SEEBACHER, G.; WOLNER, E.; SIMON, P. *et al.* Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**. v.127, n.2, p.399-405. 2004.

ROSS, D.N. Homograft replacement of the aortic valve. **Lancet**. v.2, n..7254, p.487. Sep, 1962.

RUZMETOV, M.; SHAH. J.J.; GEISS, D.M.; FORTUNA, R.S. Decellularized versus standard cryopreserved valve allografts for right ventricular outflow tract reconstruction: a single-institution comparison. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**. v. 143, n. 3, p. 543-549. Mar, 2012.

SAEGEMAN V., ECTORS N., LISMONT D., VERDUYCKT B., VERHAEGEN J. Bacteriostasis testing on allograft tissue inoculated in Wilkins-Chalgren broth. **J Hosp Infect**. v. 70, n. 3, p. 278-283. Nov, 2008.

SAID, S.M.; BURKHART H.M. When repair is not feasible: prosthesis selection in children and adults with congenital heart disease. **Seminars in thoracic and cardiovascular surgery Pediatric cardiac surgery annual**. v.17, n.1, p.22-29. 2014.

SALLES, C.A.; BUFFOLO, E.; ANDRADE, J.C. *et al.* Mitral valve replacement with glutaraldehyde preserved aortic allografts. **Eur J Cardiothorac Surg**. v. 13, n. 2, p.135-143. Feb, 1998.

SANZ-GARCIA, A.; OLIVER-DE-LA-CRUZ, J.; MIRABET, V.; GANDÍA, C.; VILLAGRASA, A.; SODUPE, E. *et al.* Heart valve tissue engineering: how far is the beside from the bench? **Expert Rev Mol Med**. v.17, p.e16. Sep, 2015.

SCHENKE-LAYLAND, K.; MADERSHAHIAN, N.; RIEMANN, I.; STARCHER, B.; HALBHUBER, K.J.; KÖNIG, K.; STOCK, U.A. Impact of cryopreservation on extracellular matrix structures of heart valve leaflets. **Ann Thorac Surg**. v. 81, n. 3, p.918-926. Mar, 2006.

SCHMID, M.; MADGE, M.; GEISSLER, H.J.; DE VIVIE, E.R. [Homograft implantation in heart surgery]. **Versicherungsmedizin**. v.48, n.2, p.46-48. Apr, 1996.

SCHMIDT, C.E.; BAIER, J.M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. **Biomaterials**. v.21, n.22, p.2215-2231. Nov, 2000.

SCHMIDT, M.I.; DUNCAN, B.B.; AZEVEDO E SILVA, G.; MENEZES, A.M.; MONTEIRO, C.A.; BARRETO, S.M.; CHOR, D.; MENEZES, P.R. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet**. v. 377, n. 9781, p.1949–1961. Jun, 2011.

SCHOEN, F.J. Cardiac valves and valvular pathology: Update on function, disease, repair, and replacement. **Cardiovascular Pathology**, v.14, n.4, p.189-194, Jul-Aug, 2005.

SCHOEN, F.J. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. **Circulation**. v.118, n.18, p.1864-1880. Oct, 2008.

SCHOEN, F.J. Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves. **Annual review of pathology**. v.7, p.161-183. 2012

SCHOEN, F.J.; LEVY, R.J. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. **J Biomed Mater Res**, v.47, n.4, p.439-465. Dec, 1999.

SEWELL-LOFTIN, M.K.; CHUN, Y.W.; KHADEMHOSEINI, A.; MERRYMAN, W.D. EMT-inducing biomaterials for heart valve engineering: taking cues from developmental biology. **Journal of cardiovascular translational research**. v.4, n.5, p.658-671. Oct, 2011.

SILVERTHORN, D.U. Fisiologia Humana. 5 ed. Porto Alegre, 2010

SMEDIRA, N.G.; BLACKSTONE, E.H.; ROSELLI, E.E.; LAFFEY, C.C.; COSGROVE, D.M. Are allografts the biologic valve of choice for aortic valve replacement in nonelderly patients? Comparison of explantation for structural valve deterioration of allograft and pericardial prostheses. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**. v.131, n.3, p.558-564. Mar, 2006.

SODIAN, R.; HOERSTRUP, S.P.; SPERLING, J.S.; MARTIN, D.P.; DAEBRITZ, S.; MAYER, J.E.Jr. *et al.* Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves. **ASAIO J**. v.46, n.1, p.107-110. Fev, 2000.

SOUZA, H.J.; PALMA, J.H.; CASAGRANDE, I.S.; CHRISTO, S.C.; ALVEZ-SILVA, L.S.; ALMEIDA, M.A. *et al.* Replacement of pulmonary artery trunk in sheep using tubular valved heterograft in non-aldehydic preservation. **Revista brasileira de cirurgia cardiovascular**. v.27, n.3, p.419-428. Sep, 2012.

STRADINS, P.; LACIS, R.; OZOLANTA, I. *et al.* Comparison of biomechanical and structural properties between human aortic and pulmonary valve. **Eur J Cardiothorac Surg**. v.26, n.3, p.634-639. Sep, 2009.

STRADINS, P.; LACIS, R.; OZOLANTA, I.; PURINA, B.; OSE, V.; FELDMANE, L.; KASYANOV, V. Comparison of biomechanical and structural properties between human aortic and pulmonary valve. **Eur J CardioThorac Surg.** v.26, n.3, p.634-639. Sep, 2004.

TARASOUTCHI, F.; MONTERA, M.W.; GRINBERG, M.; PINEIRO, D.J.; SANCHEZ, C.R.; BACELAR, A.C. *et al.* [Brazilian Guidelines for Valve Disease - SBC 2011 / I Guideline Inter-American Valve Disease - 2011 SIAC]. **Arq Bras Cardiol.** v.97, n.5suppl 1, p.1-67. 2011.

TARASOUTCHI, F.; MONTERA, M.W. *et al.* Atualização das Diretrizes Brasileiras de Valvopatias: Abordagem das Lesões Anatomicamente Importantes. **Arq Bras Cardiol.** v.109, n.6 suppl 2, p.1-34. 2017.

THOMSON, R.Y.M.; AHMED, M.; SOMERVILLE, W.; TOWERS, M. The use of "fresh" unstented homograft valves for replacement of the aortic valve. Analysis of 8 years' experience. **J Thorac Cardiovasc Surg.** v. 79, n. 6, p. 896-903. Jun, 1980.

TIMERMAN, S.; GONZALEZ, M.M.; ZARONI, A.C.; RAMIRES, J.A. Emergency medical services: Brazil. **Resuscitation.** v.70, n.3, p.356-359. Sep, 2006.

TREJOS, A.L.; PATEL, R.V.; NAISH, M.D. Force sensing and its application in minimally invasive surgery and therapy: A survey. **Proc. Inst. Mech. Eng. Part C.** v.224, n.7, p.1435-1454. Jan, 2010.

TROOST, E.; MEYNS, B.; DAENEN, W.; VAN DE WERF, F.; GEWILLIG, M. *et al.* Homograft survival after tetralogy of Fallot repair: determinants of accelerated homograft degeneration. **Eur Heart J.** v.28, n.20, p.2503-2509. Oct, 2007.

TUDORACHE, I.; CALISTRU, A.; BARAKI, H.; MEYER, T.; HOFFLER, K.; SARIKOUCH, S. *et al.* Orthotopic replacement of aortic heart valves with tissue-engineered grafts. **Tissue engineering Part A.** v. 19, n. 15-16, p. 1686-1694. Aug, 2013.

TUDORACHE, I.; CEBOTARI, S.; STURZ, G.; KIRSCH, L.; HURSCHLER, C.; HILFIKER, A. *et al.* Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. **The Journal of heart valve disease.** v.16, n.5, p.567-574. Sep, 2007.

VAFAGEE, T.; THOMAS, D.; DESAI, A.; JENNINGS, L.M. et al. Decellularization of human donor aortic and pulmonary valved conduits using low concentration sodium dodecyl sulfate. **J Tissue Eng Regen Med**. V.12, n.2, p.e841-e853. Feb, 2018.

VAHANIAN, A.; ALFIERI, O.; ANDREOTTI, F. et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). **Eur Heart J** v.33, n.19, p.2451-2496. Aug, 2012.

VEDEPO, M.C.; BUSE, E.E.; QUINN, R.W.; WILLIAMS, T.D.; DETAMORE, M.S.; HOPKINS, R.A.; CONVERSE, G.L. Species-specific effects of aortic valve decellularization. **Acta Biomater**. v.50, p.249-258. Mar, 2017.

VILLALBA, R.; PEÑA, J.; LUQUE, E.; GÓMEZ VILLAGRAN, J.L. Characterization of ultrastructural damage of valves cryopreserved under standard conditions. **Cryobiology**. v. 43, n. 1, p. 81-84. Aug, 2001.

WANG, S.; OLDENHOF, H.; DAI, X. et al. Protein stability in stored decellularized heart valve scaffolds and diffusion kinetics of protective molecules. **Biochim Biophys Acta**. V.1844, n.2, p.430-438. Feb, 2014.

WARWICK, R.M.; MAGEE, J.G.; LEEMING, J.P.; GRAHAM, J.C.; HANNAN, M.M.; CHADWICK, M. et al. Mycobacteria and allograft heart valve banking: an international survey. **The Journal of hospital infection**. v.68, n.3, p.255-261. Mar, 2008.

WATERMAN, K.C.; ADAMI, R.C. Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **Int J Pharm**. v.293, n.1-2, p.101-125. Apr, 2005.

WESTEBRING-VAN DER PUTTEN, E.P.; GOOSSENS, R.H.M.; JAKIMOWICZ, J.J.; DANKELMAN, J. Haptics in minimally invasive surgery-a review. **Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies**. v.17, n.1, p.3-16. 2008.

WOLLMANN, L. C. et al. Characterization of decellularized human pericardium for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 2018. No prelo.

World Health Organization. (WHO). World Health Statistics 2015. Geneva; 2015.

YACOUB, M.H.; TAKKENBERG, J.J. Will heart valve tissue engineering change the world? **Nat Clin Pract Cardiovasc Med** v.2, n.2, p.60-61. Feb, 2005.

ZEHR, K.J.; YAGUBYAN, M.; CONNOLLY, H.M.; NELSON, S.M.; SCHAFF, H.V. Aortic root replacement with a novel decellularized cryopreserved aortic homograft: postoperative immunoreactivity and early results. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**. v.130, n.4, p.1010-1015. Oct, 2005.

ZELTINGER, J.; LANDEEN, L.K.; ALEXANDER, H.G.; KIDD, I.D.; SIBANDA, B. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. **Tissue engineering**. v.7, n.1, p.9-22. Feb, 2001.

ZHU, A.S.; GRANDE-ALLEN, K.J. Heart valve tissue engineering for valve replacement and disease modeling. **Current Opinion in Biomedical Engineering**. v.5, p.35-41. Mar, 2018.

## 9 ANEXOS

**Tabela 1:** Medianas dos halos de inibição para classificação semiquantitativa. Para cada microrganismo e tempo foram testadas 3 amostras de cada tipo valvar.

Valva	Tempo	Microrganismo	mediana	mín. (mm)	máx. (mm)	
Aórtica	imediatO	<i>S. aureus</i>	8	8	8	
Pulmonar			6	6	7	
Aórtica	6 meses		8	8	8	
Pulmonar			6	6	6	
Aórtica	12 meses		9	8	10	
Pulmonar			6	6	8	
Aórtica	18 meses		7	6	10	
Pulmonar			7	7	7	
Aórtica	imediatO		<i>P. aeruginosa</i>	6	6	6
Pulmonar				6	6	6
Aórtica	6 meses			6	6	6
Pulmonar				6	6	6
Aórtica	12 meses	6		6	6	
Pulmonar		6		6	6	
Aórtica	18 meses	6		6	6	
Pulmonar		6		6	6	
Aórtica	imediatO	<i>B. subtilis</i>		11	10	11
Pulmonar				7	7	9
Aórtica	6 meses			9	7	11
Pulmonar				6	6	6
Aórtica	12 meses		10	10	11	
Pulmonar			7	7	9	
Aórtica	18 meses		10	8	14	
Pulmonar			7	7	9	
Aórtica	imediatO		<i>C. albicans</i>	6	6	6
Pulmonar				6	6	6
Aórtica	6 meses			6	6	6
Pulmonar				6	6	6
Aórtica	12 meses	6		6	6	
Pulmonar		6		6	6	
Aórtica	18 meses	6		6	6	
Pulmonar		6		6	6	
Aórtica	imediatO	<i>A. brasiliensis</i>		6	6	6
Pulmonar				6	6	6
Aórtica	6 meses			6	6	6
Pulmonar				6	6	6
Aórtica	12 meses		6	6	6	
Pulmonar			6	6	6	
Aórtica	18 meses		6	6	6	
Pulmonar			6	6	6	

