

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

Luciana Cristina Ferretti de Nazareno Wollmann

**Efeito da criopreservação e/ou da descelularização na matriz
extracelular de condutos valvados porcinos**

CURITIBA

2007

Luciana Cristina Ferretti de Nazareno Wollmann

**Efeito da criopreservação e/ou da descelularização na matriz
extracelular de condutos valvados porcinos**

Trabalho de Dissertação de Mestrado
apresentada ao Curso de Ciências da Saúde da
Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
como requisito para a obtenção do título de
Mestre.

Orientadora: Andréa Novais Moreno

CURITIBA

2007

Aos meus pais e irmã, Nelson, Myrian e Ana Maria, pelo estímulo e apoio incondicional desde a primeira hora, pela paciência e eterna disponibilidade com que sempre me ajudaram, pelo amor incondicional e exemplo de caráter e responsabilidade.

Ao Alexandre, por saber compreender, como ninguém, esta fase. Acima de tudo, pelo inestimável apoio e paciência nas diversas falhas que tive por força das circunstâncias. Pelo carinho, atenção e incentivo essenciais neste período.

Especialmente a Manuella, que ainda não chegou e que amo acima de tudo, pela constante companhia e fonte inesgotável de alegria e ansiedade nesses últimos meses.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Andréa Novais Moreno, por ter aceitado a orientação da minha dissertação, pela confiança em mim depositada, pelo incentivo à realização deste trabalho, pelos conselhos acadêmicos e pessoais;

Ao Professor Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa, pela idealização da dissertação e prestimosa colaboração durante a execução da mesma;

A toda a equipe do Banco de Valvas Cardíacas Humanas da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba e Cardioprótese Ltda, em especial à Marise Brenner Affonso da Costa, supervisora deste banco, pelo apoio, compreensão e colaboração na realização desta dissertação;

Aos professores e orientadores no programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde PUCPR, pela implantação do NIMA, oferecendo novas e melhores condições de trabalho aos alunos;

Ao Eduardo Discher Vieira, Luiz Augusto Pacheco Gusso, Ana Paula Camargo, João Gabriel Roderjan Mendonça e Carlos Augusto Henning Laurindo pelo imprescindível apoio nos experimentos deste estudo;

Ao Professor Dr. Marcelo Mira, pela contribuição para o sucesso deste estudo;

A todos aqueles que estiveram envolvidos neste estudo, direta ou indiretamente.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Valva pulmonar humana invertida

Figura 2 – Análise histológica valvar

Figura 3 – Representação de artéria de grande calibre (artéria elástica)

Figura 4 – Procedimento experimental de descelularização de valvas pulmonares porcinas

Figura 5 – Empacotamento das valvas em embalagens específicas para criopreservação

Figura 6 - Empacotamento das valvas em embalagens específicas para criopreservação

Figura 7 – Câmara de resfriamento programado

Figura 8 – Procedimento de diluição do crioprotetor após descongelamento da valva

Figura 9 – Análise qualitativa da matriz extracelular de condutos pulmonares submetidos a processo de descelularização

Figura 10 – Análise qualitativa da matriz extracelular de cúspides pulmonares submetidas a processo de descelularização

Figura 11 – Análise qualitativa da matriz extracelular de condutos pulmonares criopreservados e submetidas a processo de descelularização

Figura 12 – Análise qualitativa da matriz extracelular de cúspides pulmonares criopreservadas e submetidas a processo de descelularização

Figura 13 – Dados estatísticos obtidos por análise morfométrica de lâminas de conduto de ambos os grupos, fresco e criopreservado, coradas com Orceína Acética para observação quantitativa de fibras elásticas

Figura 14 - Dados estatísticos obtidos por análise morfométrica de lâminas de cúspide de ambos os grupos, fresco e criopreservado, coradas com Orceína Acética para observação quantitativa de fibras elásticas

Figura 15 - Dados estatísticos obtidos por análise morfométrica de lâminas de conduto de ambos os grupos, fresco e criopreservado, coradas com Gomori para observação quantitativa de colágeno

Figura 16 - Dados estatísticos obtidos por análise morfométrica de lâminas de cúspide de ambos os grupos, fresco e criopreservado, coradas com Gomori para observação quantitativa de colágeno

Figura 17 – Teste de citotoxicidade. Controles positivo e negativo

Figura 18 – Teste de citotoxicidade. Fragmentos descelularizados com SDS 0,1% e DOA 1%

Figura 19 – Teste de citotoxicidade. Fragmentos descelularizados com SDS 0,3%

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquematização dos grupos e subgrupos avaliados no projeto

LISTA DE ABREVIATURAS

MEC – matriz extracelular

DOA – ácido deoxicólico

SDS – dodecil sulfato de sódio

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

DMSO – dimetil sulfóxido

SFB – soro fetal bovino

HE – hematoxilina-eosina

MEM - *Eagle's Minimal Essential Medium*

PVC – poli (cloreto de vinila)

GAGs - glicosaminoglicanos

DNA – Ácido desoxirribonucleico

HLA - *Human Leukocyte Antigen*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Constituição das valvas cardíacas semilunares.....	10
1.2 Substituição valvar	14
1.2.1 Preservação e estocagem das valvas	15
1.2.2 Engenharia de tecidos	16
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Obtenção das valvas pulmonares porcinas.....	23
3.2 Tratamentos experimentais.....	23
3.3 Análise qualitativa da matriz extracelular através de Microscopia óptica ...	26
3.4 Análise quantitativa da matriz extracelular através de Morfometria	27
3.5 Ensaio de citotoxicidade.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1 – Análise qualitativa da matriz extracelular através de microscopia óptica	29
4.1.1 - Grupo I – Valvas não submetidas à criopreservação (fresco)	29
4.1.2 - Grupo II – Valvas submetidas à criopreservação	31
4.2 – Análise quantitativa da matriz extracelular através de morfometria	34
4.2.1 - Análise de fibras elásticas	35
4.2.2 - Análise de colágeno	37
4.3 – Ensaio de citotoxicidade.....	40
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS	56

RESUMO

A engenharia de tecidos, uma nova área da biotecnologia, tem proposto a produção de estruturas vivas funcionais, tais como vasos sanguíneos, valvas cardíacas, entre outras. Várias foram as tentativas de produzir um substituto valvar com capacidade de crescimento, reparação e remodelamento usando o conceito de engenharia de tecidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a morfologia de valvas pulmonares porcinas criopreservadas e/ou descelularizadas e determinar uma solução de descelularização capaz de remover todas as células teciduais, sem promover maiores danos à matriz extracelular. Valvas cardíacas porcinas, criopreservadas ou não, foram incubadas por 24 horas, sob agitação constante, em solução contendo 1% de ácido deoxicólico e 0,1% ou 0,3% de dodecil sulfato de sódio (SDS). As valvas foram avaliadas por microscopia óptica (após coloração com hematoxilina-eosina, Weigert ou Gomori) e por análise quantitativa (morfométrica) e ensaios de citotoxicidade foram avaliados nos condutos valvares. O desempenho das soluções de descelularização foi altamente variável na preservação da matriz e, quando utilizadas em valvas criopreservadas, promoveram danos maiores à matriz extracelular comparados aos danos nas não criopreservadas. Entretanto, as soluções não apresentaram citotoxicidade direta em ensaios *in vitro*. Nossos resultados sugerem que a melhor solução descelularizante foi SDS 0,1% revelando condições ideais de descelularização sem danificar a matriz extracelular.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos, matriz extracelular, descelularização, morfologia tecidual.

ABSTRACT

Tissue engineering, a new area in biotechnology, has proposed the production of functional live structures, such as blood vessel, heart valves, among others. Several attempts have been made to create functional heart valve replacements with the ability to grow, repair, and remodel using the concept of tissue engineering. The aim of the present study was to evaluate the cryopreserved and/or decellularized pulmonary porcine valves structure and to determine a decellularization solution, capable of removing all tissue cells, without drastic damage to the extracellular matrix. Porcine heart valves, cryopreserved or not, were incubated for 24 hours, in agitation, with solution containing 1% deoxycholic acid (DOA); 0,1% or 0,3% sodium dodecyl sulfate (SDS). The valves were evaluated by light microscopy (hematoxylin and eosin, Weigert and Gomori staining) and by quantitative (morphometric) analysis and valves conduits were evaluated by cytotoxicity assays. The decellularization solutions were highly variable in efficiency and matrix preservation and the use before the cryopreservation process results in damages to the extracellular matrix. However, non decellularization solution presented direct cytotoxicity *in vitro*. Ours results suggest that the best decellularization solution was 0, 1% SDS showed to ideal conditions of decellularization without drastic damages of the extracellular matrix.

Key words: Tissue engineering, extracellular matrix, decellularization, tissue morphology.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Constituição das valvas cardíacas semilunares

Todo tecido biológico é composto de células envoltas por proteínas de matriz extracelular (MEC), que consistem principalmente de colágeno, elastina, proteoglicanas e glicoproteínas. A quantidade destes componentes, produzidos pela células, é diferente para cada tipo de tecido, dependendo da sua função. O colágeno é a principal proteína de suporte e as fibras formadas promovem resistência mecânica ao tecido. Já a elastina serve para fornecer elasticidade ao tecido e é importante para o bom funcionamento das fibras colágenas. A maior parte da matriz extracelular é composta por proteoglicanas e glicoproteínas, que juntas, formam géis de variados tamanhos de poros através da ligação da água e do colágeno que forma o tecido (revisto por MOL, 2005).

As valvas cardíacas porcinas e humanas, aórticas ou pulmonares, são semelhantes macro e microscopicamente. Macroscopicamente são formadas por três cúspides semilunares e conduto, constituído por parte da parede da artéria, aorta ou pulmonar (Figura 1).



Figura 1 – Valva pulmonar humana invertida revela as cúspides semilunares e parede da artéria pulmonar (conduto).

Microscopicamente, as valvas cardíacas apresentam células intersticiais e uma camada de células endoteliais. Sabe-se que os fibroblastos são responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular, sendo imprescindível para o adequado funcionamento e a durabilidade das valvas cardíacas. Grande parte do volume é o espaço extracelular, preenchido por uma rede complexa de macromoléculas que constituem a matriz extracelular (MEC), 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 matriz extracelular do tecido valvar é frequentemente mais abundante do que as células ao seu redor, e isso determina as propriedades físicas do tecido (ALBERTS *et al.*, 2004). O tecido das cúspides valvares cardíacas porcinas, assim como das humanas, exibe uma estrutura microscópica formada tipicamente por três camadas: ventricular, esponjosa e fibrosa. Estas camadas diferem entre si tanto pela arquitetura quanto pelos

componentes da matriz extracelular (GRAUSS, *et al.*, 2005). A espessura de cada camada varia em toda a extensão da valva desde o anel até a margem livre da cúspide. Na valva pulmonar, a fibrosa é a camada mais espessa contendo feixes de colágeno saindo do anel. O colágeno é o componente mais abundante da valva cardíaca. A esponjosa contém predominantemente glicosaminoglicanos (GAGs) e água, pouco colágeno e pouca elastina (GRAUSS *et al.*, 2005). A *ventricularis* é a camada mais fina e é composta principalmente por fibras elásticas (MULHOLLAND, *et al.*, 1996) (Figura 2).

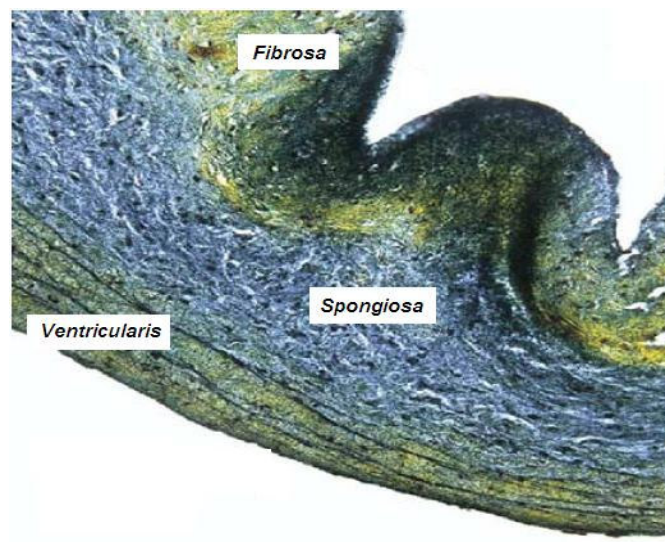


Figura 2 – Análise histológica valvar. A estrutura histológica das cúspides aórtica e pulmonar é semelhante. Na face ventricular de cada cúspide há tecido conjuntivo frouxo, com aspecto mixomatoso, e na face arterial uma camada mais densa, a fibrosa, delimitada por fibras elásticas.

A MEC valvar contém uma variedade de estruturas, ao redor das células intersticiais, que efetuam funções essenciais, incluindo suporte mecânico, força física e elasticidade. Além disso, a MEC exerce profunda influência na adesão, migração e diferenciação celular. Consequentemente a integridade estrutural e

funcional da MEC são cruciais para um desempenho valvar satisfatório (SCHENKE-LAYLAND, K. *et al.*, 2006). A função estrutural desempenhada pela matriz extracelular está relacionada com a resistência mecânica conferida pelas fibrilas de colágeno, ao papel estabelecido pela elastina e proteoglicanos na elasticidade, às inter-relações entre célula e matriz e com a propriedade adesiva proporcionada pelas glicoproteínas (laminina, fibronectina, vitronectina, entactina, trombospondina) (HAY, 1991). As células intersticiais e uma camada de células endoteliais estão contidas no interior da matriz das valvas. Dois outros tipos de células intersticiais foram identificados por microscopia eletrônica nas cúspides de valvas cardíacas: células musculares lisas e miofibroblastos que parecem estar dispersos por toda a cúspide (BAIRATI & DEBIASI, 1981).

Os condutos das valvas cardíacas são formados por três camadas teciduais características (Figura 3). A túnica íntima é fina e constituída por um revestimento endotelial, uma camada de tecido conjuntivo e uma camada de material elástico. O principal tipo celular desta camada é a célula muscular lisa, que produz os componentes da matriz. A túnica média, mais espessa que a íntima, é constituída por lâminas de material elástico, entre as quais estão situadas camadas de células musculares lisas e fibras colágenas. Não há fibroblastos nesta camada, sendo as células musculares responsáveis pela produção das fibras colágenas e elásticas. A túnica adventícia apresenta-se como uma camada de tecido conjuntivo relativamente fino, onde o principal componente extracelular são as fibras colágenas e suas células são fibroblastos e macrófagos. Esta camada ainda contém pequenos vasos sanguíneos (*vasa*

vasorum) para irrigarem a parede arterial (revisto por ROSS & ROMRELL, 1993).

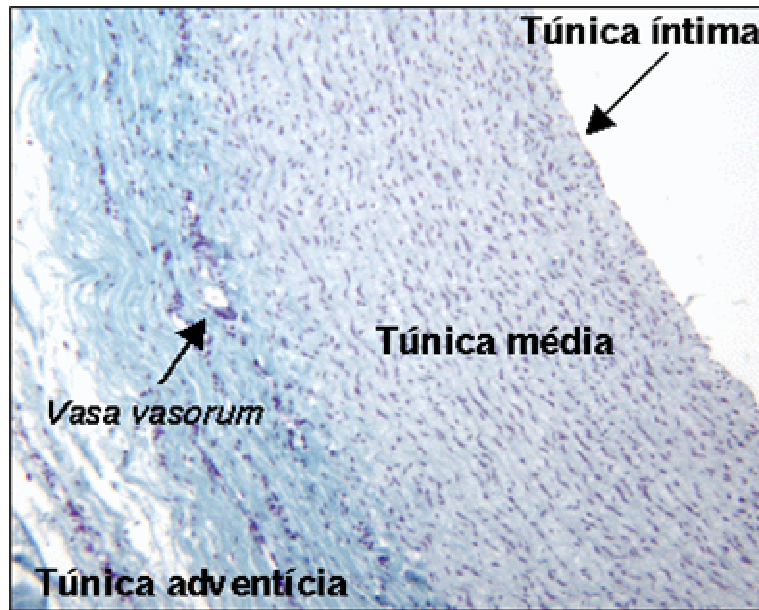


Figura 3 – Representação de artéria de grande calibre (artéria elástica). Observa-se a túnica íntima, a túnica média bem desenvolvida e com várias camadas de músculo liso e também a túnica adventícia, constituída de tecido conjuntivo frouxo contendo pequenos vasos sanguíneos, responsáveis pela nutrição das células das paredes da artéria, chamados de *vasa vasorum*. Imagem obtida do site: <http://rbp.fmrp.usp.br>

1.2 Substituição valvar

Doenças diversas podem afetar qualquer uma das quatro valvas cardíacas e estão associadas a altas taxas de mortalidade (SCHOEN & LEVY, 1999). A substituição valvar é método freqüente para tratamento das disfunções avançadas de valvas cardíacas.

Vários modelos de próteses valvares têm sido desenvolvidos desde 1950. No entanto, embora estas próteses sejam eficientes e reduzam significativamente a morbidade e a mortalidade dos pacientes, há ainda várias complicações relacionadas ao seu uso (CEBOTARI, *et al.*, 2002). As próteses

valvares mecânicas, apesar de duráveis, requerem tratamento com anticoagulantes indefinidamente e apresentam complicações a longo prazo pelos riscos relacionados à anticoagulação e tromboembolismo. As próteses valvares biológicas heterólogas (porcinas e bovinas), embora possuam bom desempenho, têm durabilidade limitada (STEINHOF, *et al.*, 2000). As valvas cardíacas humanas (homoenxertos) são uma alternativa ao implante das próteses mecânicas e biológicas heterólogas com algumas vantagens sobre estas (CEBOTARI *et al.*, 2002). Em 1962, Ross iniciou o uso clínico de valvas cardíacas humanas. Homoenxertos frescos e criopreservados, muito utilizados atualmente, consistem em tecidos viáveis, relativamente resistentes à infecção, com propriedades hemodinâmicas fisiológicas e resultados satisfatórios.

1.2.1 Preservação e estocagem das valvas

Inicialmente, as valvas cardíacas humanas eram utilizadas de duas formas: homovitalis, onde os enxertos não eram submetidos a nenhum tratamento e utilizados nas primeiras 48 horas ou “frescos”, onde permaneciam em solução de antibióticos até seu uso. No entanto, estes enxertos eram descartados caso não fossem utilizados brevemente. Técnicas de preservação e estocagem foram desenvolvidas com a finalidade de aumentar o tempo de estocagem dos tecidos, reduzindo assim o descarte por validade e disponibilizando imediatamente grande variedade de tamanhos e tipos de enxertos. Os métodos utilizados inicialmente como liofilização, óxido de etileno, irradiação gama, entre outros, eram mais agressivos ao tecido, diminuindo sua

durabilidade quando comparados aos enxertos frescos (HOPKINS, 1989a; HOPKINS, 1989b; PARKER, 1997b).

Atualmente, a criopreservação de valvas cardíacas é o método mais frequentemente empregado dentre as várias formas de preservação e estocagem dos tecidos, pois possibilita preservação tecidual mais apropriada e conseqüentemente, melhores resultados. Acredita-se que a criopreservação preserve a viabilidade celular, mas cause alguns danos à matriz extracelular. Deterioração significativa e sérias alterações de colágeno e fibras elásticas, acompanhadas de danos gerais na histoarquitetura da cúspide podem ser causadas pela formação de gelo extracelular, principalmente dentro da camada esponjosa, caracterizada pela sua alta hidratação (SCHENKE-LAYLAND *et al.*, 2006; NARINE *et al.*, 2006).

1.2.2 Engenharia de tecidos

Apesar das vantagens, a durabilidade a longo prazo dos homoenxertos permanece limitada, especialmente em crianças e adultos jovens. Na maioria dos casos, a deterioração do tecido, manifestada como degeneração estrutural e calcificação das valvas, leva a uma disfunção do enxerto e eventualmente reoperações são necessárias (SCHENKE-LAYLAND *et al.*, 2006). A calcificação destes enxertos tem origem multifatorial e mecanismo ainda não totalmente elucidado. A viabilidade celular causa resposta imune, a qual possivelmente contribui com a calcificação e conseqüente degeneração da valva (CEBOTARI *et al.*, 2002). Na tentativa de eliminar a reação imunológica, procura-se encontrar

um tratamento apropriado para remover restos celulares, mantendo a integridade da estrutura valvar (COURTMAN *et al.*, 1994).

As características de uma valva ideal incluem a não trombogenicidade, potencial de crescimento, reparo, remodelamento e nenhuma resposta imunológica (SCHENKE-LAYLAND *et al.*, 2004). Pensando em eliminar as desvantagens das próteses valvares mecânicas e biológicas (heterólogas e homólogas) existentes e comumente utilizadas, surgiu o conceito de engenharia de tecidos, criando um tecido baseado em uma matriz formada anatomicamente, repovoada com células viáveis e componentes tissulares (LEYH *et al.*, 2003). O conceito de engenharia de tecidos foi primeiro apresentado utilizando matrizes sintéticas de polímero biodegradável semeadas com células autólogas para reconstruir valvas pulmonares. Entretanto, a construção de condutos valvares tridimensionais baseados nestas matrizes não obteve grande êxito pelas limitações de adesão celular e regeneração tecidual (STEINHOFF *et al.*, 2000). A limitação de adesão celular pode ter ocorrido pela falta de ligante proteína-específicos existentes em matrizes biológicas, os quais são essenciais para fixar as células na matriz (CEBOTARI *et al.*, 2002). Além disso, a estrutura tridimensional da valva dificilmente seria reproduzida com as técnicas existentes, bem como, as propriedades estruturais e mecânicas de uma variedade de polímeros não seriam ideais (STAMM *et al.*, 2004). As matrizes sintéticas ainda poderiam apresentar sérios riscos como degradação tóxica e reação inflamatória (DOHMEN *et al.*, 2003).

Valvas porcinas preservadas com glutaraldeído também foram utilizadas como matrizes alternativas nas quais seriam semeadas apenas células endoteliais, após neutralização do glutaraldeído. No entanto, mesmo após o emprego de métodos sofisticados na tentativa de remover ou neutralizar o glutaraldeído, não foi possível criar uma monocamada confluenta de células endoteliais funcionais nestas valvas (DOHMEN *et al.*, 2003). O tratamento com glutaraldeído não eliminou a resposta imunológica dos enxertos além de ter apresentado propriedades indesejáveis, incluindo citotoxicidade e calcificação (NUGENT and EDELMAN, 2003). Também, matrizes porcinas teriam muitas desvantagens como risco de transferência de doenças infecciosas animais enquanto utilizadas para repovoamento com células humanas, rejeição xenogênica e dimensões assimétricas como perímetro do anel, tamanho e modelo das cúspides. Ainda, o implante de enxertos xenogênicos poderia resultar em aneurisma e degradação da elastina da matriz, esta deduzida pela imunogenicidade entre espécies (CEBOTARI *et al.*, 2002).

A alternativa proposta então seriam matrizes de origem homóloga, optando, neste caso, pela descelularização do tecido. O uso de condutos valvares livres de antígenos celulares resultaria em intensa redução da imunogenicidade (STEINHOFF *et al.*, 2000). Uma matriz extracelular homóloga descelularizada não causaria conflitos imunológicos entre espécies e, ainda, o posterior repovoamento com células do receptor transformaria o enxerto em tecido autólogo (CEBOTARI *et al.*, 2002), criando assim uma estrutura viva, com

potencial de remodelamento, regeneração e crescimento (DOHMEN *et al.*, 2002).

A engenharia de tecidos atualmente tem trabalhado com diversas soluções descelularizantes. Processos enzimáticos e diferentes tipos e concentrações de detergentes e álcool têm sido amplamente avaliados com o mesmo intuito: o de eliminar as células nativas assim como outras estruturas celulares que poderiam causar resposta imune adversa no paciente. Ressalta-se que a técnica empregada não deve resultar em ruptura da anatomia do tecido transplantado ou alterar as propriedades biomecânicas dos elementos estruturais. Além disso, não pode apresentar citotoxicidade, o que pode prejudicar o repovoamento do tecido com células autólogas, seja este repovoamento feito anteriormente ao implante *in vitro* ou posteriormente *in vivo* (GOLDSTEIN, 1999). O repovoamento do tecido é crucial uma vez que as células endoteliais agem como uma barreira fisiológica no tecido valvar, prevenindo a deposição de plaquetas e fibrina na superfície da valva. Ambos os fatores são considerados como causas de degeneração e calcificação do enxerto (DOHMEN *et al.*, 2003)

Várias metodologias de descelularização têm sido pesquisadas. Os tratamentos enzimáticos como a exposição intensa das células à tripsina, resulta em morte celular. Entretanto, pelo menos uma porção do colágeno tipo I, a proteína mais abundante na matriz extracelular de valvas cardíacas, é sensível à tripsina. As descelularizações enzimáticas, utilizando tripsina em várias concentrações, são mais agressivas, enfraquecem e prejudicam as propriedades

mecânicas do tecido valvar, impedindo sua implantação em sistemas de alta pressão (TUDORACHE, *et al.*, 2007; KARIM, *et al.*, 2006; GRAUSS, *et al.*, 2003). Para solucionar este problema, alguns autores revestiram a matriz, descelularizada pela tripsina, com polímeros biodegradáveis, aumentando a resistência da matriz às forças hemodinâmicas (STAMM *et al.*, 2004). Por outro lado, Cebotari *et al* (2002) utilizaram tripsina 0,5% e obtiveram completa descelularização além da preservação da estrutura da MEC.

Tratamentos com detergentes não-iônicos e aniônicos, combinados ou não, têm sido amplamente testados. Alguns grupos utilizaram Triton X-100 1% e obtiveram a descelularização completa das cúspides, no entanto não conseguiram retirar totalmente as células do conduto da valva (MEYER *et al.*, 2006; GRAUSS *et al.*, 2005). Enquanto outros grupos utilizaram Triton X-100 e outros reagentes da mesma classe como MEGA 10, Tween 20 e CHAPS sem sucesso para a descelularização (BOOTH *et al.*, 2002). Foram testados também glicerol e polietilenoglicol (PEG), amplamente utilizados na bioquímica por suas habilidades de rompimento de membrana celular, mas também se apresentaram insatisfatórios. Os testes com dodecil sulfato de sódio (SDS) e deoxicolato de sódio, detergentes aniônicos, foram satisfatórios ao promover a completa descelularização das valvas, mantendo a histoarquitetura básica das valvas (BOOTH *et al.*; 2002; MIRSADRAEE, *et al.*, 2006; KASIMIR, *et al.*, 2003). Os reagentes solúveis em água foram dissolvidos em diferentes concentrações de solução: hipertônica, isotônica e hipotônica. A solução hipotônica apresentou melhores resultados uma vez que permite a entrada de água na célula,

dilatando-a e induzindo o rompimento celular. É possível que esta ação dilatadora esclareça a presença do detergente dentro das células e de seus núcleos (BOOTH *et al.*, 2002).

Após implantar homoenxertos celulares e descelularizados em ratos, Grauss *et al* perceberam que todos os enxertos celulares transplantados tornaram-se deformados, edemaciados e acelulares com grandes mudanças na estrutura da MEC. Os enxertos descelularizados, por sua vez, mantiveram suas cúspides preservadas quando comparadas com o primeiro grupo. Os autores concluíram que os danos causados pela técnica de descelularização são menores do que os causados pela resposta imunológica do receptor (GRAUSS, *et al.*, 2003).

Portanto, muitos estudos têm revelado novos agentes descelularizantes de valvas cardíacas com o intuito de se formar uma matriz acelular, o que supostamente não acionaria a imunidade do receptor e poderia ser repovoado após seu implante por células do próprio receptor. Porém, ainda são poucos os estudos que revelam o perfil da matriz extracelular das valvas após o processo de descelularização. A manutenção da matriz extracelular é essencial para o sucesso de uma substituição valvar, uma vez que o repovoamento celular depende de interação e adesão celular à moléculas específicas desta matriz. Este trabalho teve como seu principal objetivo analisar a matriz extracelular de valvas pulmonares porcinas submetidas a processos de criopreservação e/ou de descelularização e desta forma contribuir para a identificação de um agente

descelularizante capaz de promover remoção das células sem danificar e comprometer a funcionalidade da matriz extracelular.

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos decorrentes do processo de criopreservação associado ou não ao processo de descelularização na matriz extracelular de valvas pulmonares porcinas. Para tanto, propusemos-nos a:

- Determinar danos causados pelo processo de criopreservação e/ou descelularização com SDS 0,1% ou 0,3% e DOA 1% na matriz extracelular por microscopia óptica e quantificação dos elementos de matriz.
- Avaliar citotoxicidade na matriz extracelular através do cultivo de células associadas ao tecido descelularizado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das valvas pulmonares porcinas

Foram utilizados 32 corações de porcos brancos machos, com idade entre 90 e 120 dias, obtidos por compra direta em frigoríficos filiados ao SINDICARNE (Sindicato da Indústria de Carnes e derivados do Estado do Paraná) e transportados em solução salina 0,9% gelada. O tempo de isquemia total, entre o sacrifício e a dissecação, não ultrapassou 20h, nem a temperatura máxima de 10°C. Para obtenção das valvas pulmonares, os corações foram dissecados no Laboratório de Cultivo Celular Experimental da PUC-PR. Foi retirado todo o tecido gorduroso do tronco pulmonar bem como a camada adventícia. Os enxertos permaneceram em solução salina 0,9% gelada por poucas horas antes de serem processados.

3.2 Tratamentos experimentais

As 32 valvas foram divididas em dois grupos: submetidos somente a descelularização (Grupo I – “fresco”) ou submetidos à criopreservação e após descongelamento ao processo de descelularização (Grupo II – “criopreservado”), como descrito na Tabela 1. Para padronizar o processo de descelularização, ambos os grupos foram subdivididos em subgrupos. Subgrupo A corresponde às valvas controle, isto é, que não sofreram nenhum processo de descelularização; o subgrupo B às valvas submetidas ao processo de descelularização com ácido deoxicólico (DOA) 1%, por 24 horas, sob agitação constante e os subgrupos C e D correspondem às valvas submetidas a descelularização com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,1% ou 0,3% (respectivamente), sob agitação constante

(Figura 4). Após lavagens em soro fisiológico, foram obtidos com auxílio de material cirúrgico apropriado, fragmentos de condutos e cúspides e os mesmos foram processados por técnica histológica de rotina.

Tabela 1 – Esquematização dos grupos e subgrupos avaliados no projeto

	Subgrupo A	Subgrupo B	Subgrupo C	Subgrupo D
Grupo I	sem tratamento	DOA 1%	SDS 0,1%	SDS 0,3%
Grupo II	criopreservação	DOA 1% + crio	SDS 0,1% + crio	SDS 0,3% + crio
		DOA: ácido deoxicólico		SDS: dodecil sulfato de sódio



Figura 4 – Procedimento experimental de descélularização de valvas pulmonares porcinas. Na representação, frasco contendo valva pulmonar em SDS 0,1%, sob agitação constante.

Para a criopreservação, os enxertos foram transferidos para embalagens plásticas (*Kapak, Sealpack 4"x 6" – 4.5MIL Bulk case*) contendo 100ml de solução de RPMI 1640, 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) e 10% de soro fetal bovino (SFB) e selados. Foram, então, acondicionados em embalagens de

alumínio (*Kapak, Foilpack 5"x 8" – 4.5MIL Bulk case, Minneapolis-U.S.A.*) (Figuras 5 e 6), selados e mantidos a temperatura 2-8°C por 30 minutos. O congelamento foi feito em equipamento de criopreservação (*Marca Planer, KRYO 10 Series, Model 10-16; Controller: marca Planer, KRYO 10 Series, Model 10-20*) que permite congelamento com velocidade de resfriamento tecidual programada -1°C/min até que a temperatura do enxerto chegue a -60°C e -5°C/min até que chegue a -80°C) (Figura 7). Ao término do congelamento, os enxertos foram estocados por 15 dias em containers específicos à temperatura do vapor do nitrogênio líquido (-195°C). O descongelamento foi feito de forma rápida, com soro fisiológico a temperaturas entre 42-50°C, seguido de diluição gradual do crioprotetor com solução de RPMI 1640 e 10% de SFB (Figura 8).



Figuras 5 e 6 – Representando o momento de empacotamento das valvas em embalagens específicas para criopreservação.



Figura 7 – Câmara de resfriamento programado, utilizada para congelar os enxertos.

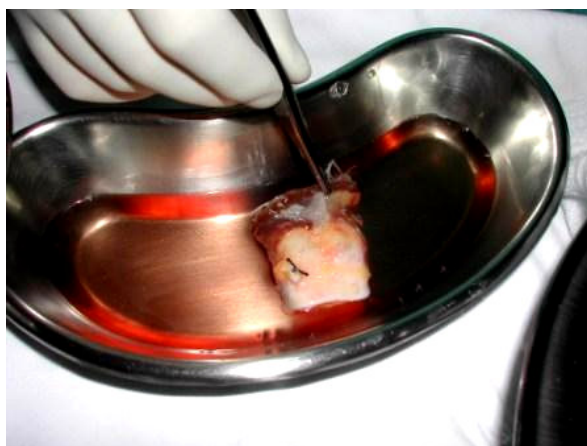


Figura 8 – Figura demonstrativa do procedimento de diluição do crioprotetor após descongelamento da valva.

3.3 Análise qualitativa da matriz extracelular através de Microscopia óptica

Após fixação em Alfac (85 mL de etanol a 80% (v/v), 10 mL de formol e 5 mL de ácido acético (PA) por 16 horas a temperatura ambiente, os fragmentos de cúspide e conduto dos grupos I e II foram desidratados em série crescente de álcoois (50, 70, 80, 90 e 100%) por uma hora em cada concentração,

diafanizados em xilol por 1 hora e meia, incluídos em parafina histológica líquida (a temperatura de 58°-60°C) por 4 horas e depois emblocados em moldes de papel com parafina fina por 24 horas a temperatura ambiente. Os blocos resultantes foram submetidos à microtomia para a obtenção de cortes de 5 µm e os mesmos foram acondicionados em lâminas histológicas. As lâminas foram então deixadas em estufa a 58°C por 12 horas, para a retirada da parafina restante e, após re-hidratação, submetidas à coloração com hematoxilina-eosina para observação de morfologia geral.

As lâminas, após coloração com Hematoxilina-Eosina (HE), foram desidratadas, diafanizadas, para então serem montadas com Entellan. Os resultados foram analisados em microscópio Olympus BX 50.

3.4 Análise quantitativa da matriz extracelular através de Morfometria

Para quantificação de colágeno e elastina, as lâminas foram submetidas às colorações:

1. Gomori (para observação de colágeno);
2. Orceína Acética (para observação de fibras elásticas).

As lâminas, após coloração, foram desidratadas, diafanizadas, para então serem montadas com Entellan.

Foi utilizado o programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics). Para tanto, foram capturadas imagens das lâminas com colorações específicas para cada componente de matriz (10 imagens em objetiva de 40x de cada lâmina de modo a capturar toda a extensão da cúspide e partes aleatórias de conduto – Olympus BX 50) para análise estatística.

3.5 Ensaio de citotoxicidade

A linhagem celular NCTC Clone 929, na concentração de 3×10^5 células/ml foi semeada em placa de Petri (15 × 60 mm), no volume de 5 ml e incubada durante 48 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após esse período, com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi desprezado e adicionado 5 ml do meio “overlay” em cada placa de Petri. Este meio é composto de partes iguais de MEM duas vezes concentrado e ágar (Difco) a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro. No momento do uso, o ágar foi aquecido e fundido, e então misturado na mesma proporção com o MEM duas vezes concentrado, ambos a uma temperatura de 44 °C. Fragmentos, com cerca de 0,25 cm² de área superficial das amostras coletadas dos grupos descritos acima, foram colocados sobre o ágar antes de sua solidificação completa. As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa com 5% CO₂ a 37 °C por 24 horas.

Como controle positivo foram utilizados fragmentos de 0,25cm² de PVC poli(cloreto de vinila) estabilizada com estanho, atóxico (Dacarto SA Indústria de Plásticos) para polímeros; placas de Ti (Multi Alloy Ltda) para metais e alumina (Carlo Erba) para cerâmicas. O controle negativo foi realizado com a adição de papel de filtro estéril.

3.6 Análise estatística

Os resultados da análise morfométrica foram analisados utilizando o teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla. Foram consideradas significativas comparações com um *P* igual ou menor a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 – Análise qualitativa da matriz extracelular através de microscopia óptica

4.1.1 - Grupo I – Valvas não submetidas à criopreservação (fresco)

Conduto: Observa-se nas imagens de conduto pulmonar do subgrupo controle (IA) a presença de células envoltas por grande quantidade de matriz extracelular. A matriz apresenta-se íntegra, sem modificação morfológica aparente (coloração rósea típica) e com características de um tecido bem preservado (Figura 09 – A). Por outro lado, as imagens obtidas de conduto pulmonar submetido à descelularização com DOA 1% (subgrupo IB) revelam uma coloração mais azulada que o controle negativo e uma matriz mais compacta. Esta coloração pode ser devido ao extravasamento nuclear, uma vez que o DNA pode se fixar a glicoproteínas presentes na matriz extracelular. Além disso, percebe-se a presença de células íntegras no interior desta matriz, o que sugere falha da solução em promover a descelularização completa (Figura 09 – B). Já as imagens obtidas de condutos descelularizados com SDS 0,1% revelam total desaparecimento de células, sem fixação de restos nucleares na matriz. A matriz apresenta-se visualmente íntegra e sem compactação das fibras, revelando os espaços entre as mesmas que correspondem à localização celular (Figura 09 – C). Característica semelhante foi observada nas imagens obtidas de conduto submetido a descelularização com SDS 0.3% (Figura 09 – D).

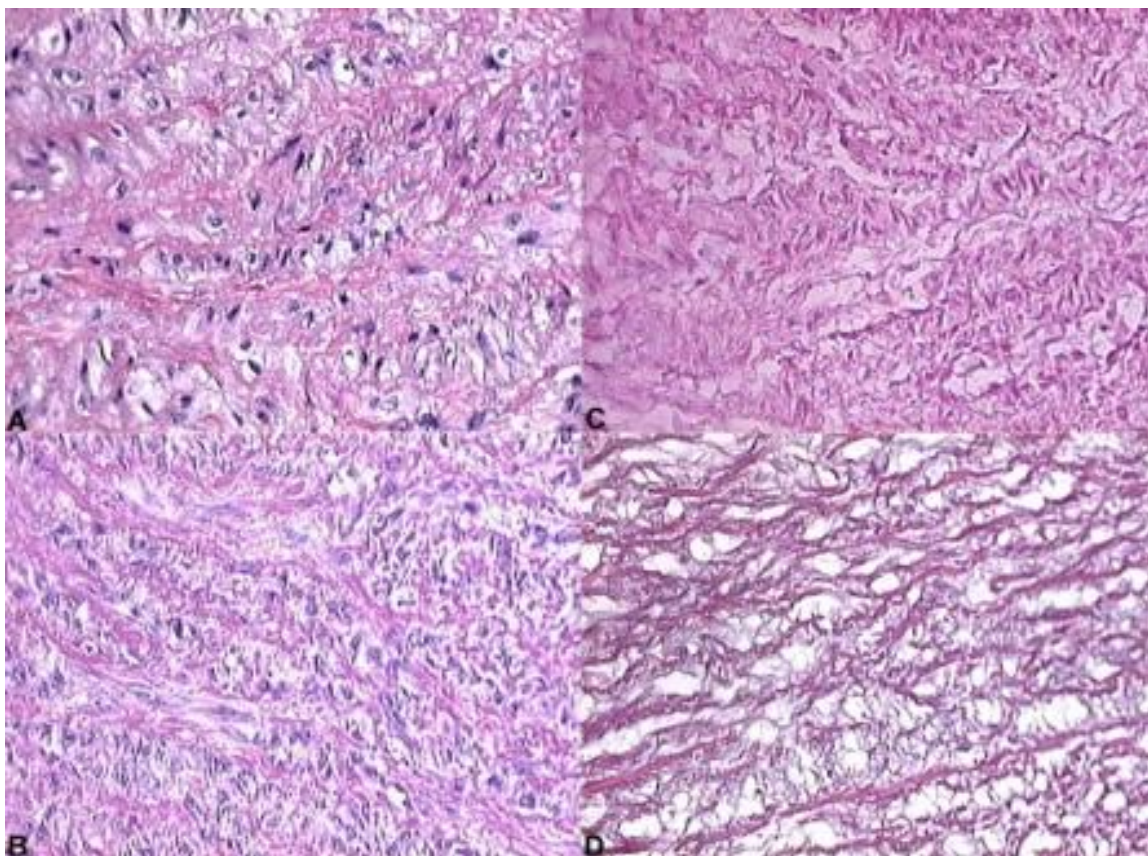


Figura 09 – Análise qualitativa da matriz extracelular de condutos pulmonares submetidos a processo de descélularização. A – Controle (Fresco), não submetido a qualquer processo experimental. B – DOA 1%; C – SDS 0,1% e D – SDS 0,3%.

Cúspide: Quando se observa as imagens obtidas de cúspides pulmonares submetidas a tratamento com SDS 0,1% (Figura 10 - C) e DOA 1% (Figura 10 – B), percebe-se que não há vestígios de células, sendo ambos os tratamentos eficazes para a retirada de células nas cúspides, uma vez que elas são muito mais finas do que os condutos. Não se observa danos significativos à matriz extracelular nestes tratamentos. Porém, apesar da ausência de células nas cúspides descélularizadas com SDS 0,3%, a matriz extracelular revelou-se totalmente compactada, com características de degradação da matriz (Figura 10 – D), quando comparadas às imagens do controle (Figura 10 – A).

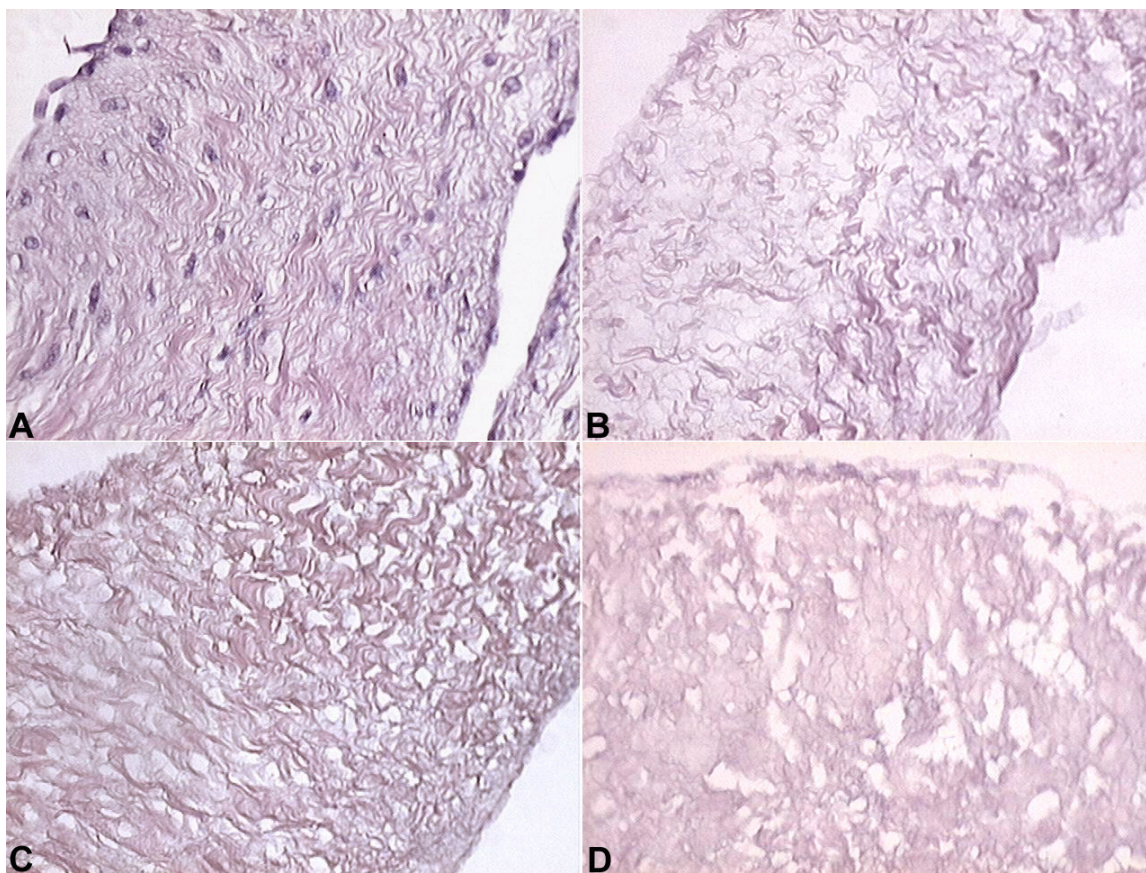


Figura 10 – Análise qualitativa da matriz extracelular de cúspides pulmonares submetidas a processo de descélularização. A – Controle (Fresco), não submetido a qualquer processo experimental. B – DOA 1%; C – SDS 0,1% e D – SDS 0,3%.

4.1.2 - Grupo II – Valvas submetidas à criopreservação

Conduto: Nas imagens obtidas do grupo II (criopreservadas), observam-se diferenças significativas na composição celular das valvas após serem submetidas ao processo de descélularização. O próprio procedimento de criopreservação parece afastar as fibras do conduto pulmonar deixando o tecido mais frouxo e menos compacto (Figura 11 – A) quando comparado ao controle “fresco” (Figura 09 – A). Não se sabe que limitações esta característica pode

trazer ao enxerto criopreservado, mas se observa que os tratamentos descelularizantes quando conjugados ao criopreservado acentuam a degradação da matriz extracelular. O tratamento com DOA 1%, de forma muito mais acentuada, não foi capaz de induzir a completa descelularização do conduto pulmonar e a quantidade de fibras é visualmente menor (Figura 11 – B). Tanto os condutos criopreservados tratados com SDS 0,1% (Figura 11 – C) ou com SDS 0,3% (Figura 11 – D) revelaram-se compactados em partes do conduto e com espaços maiores entre as fibras, com pontos de degeneração tecidual.

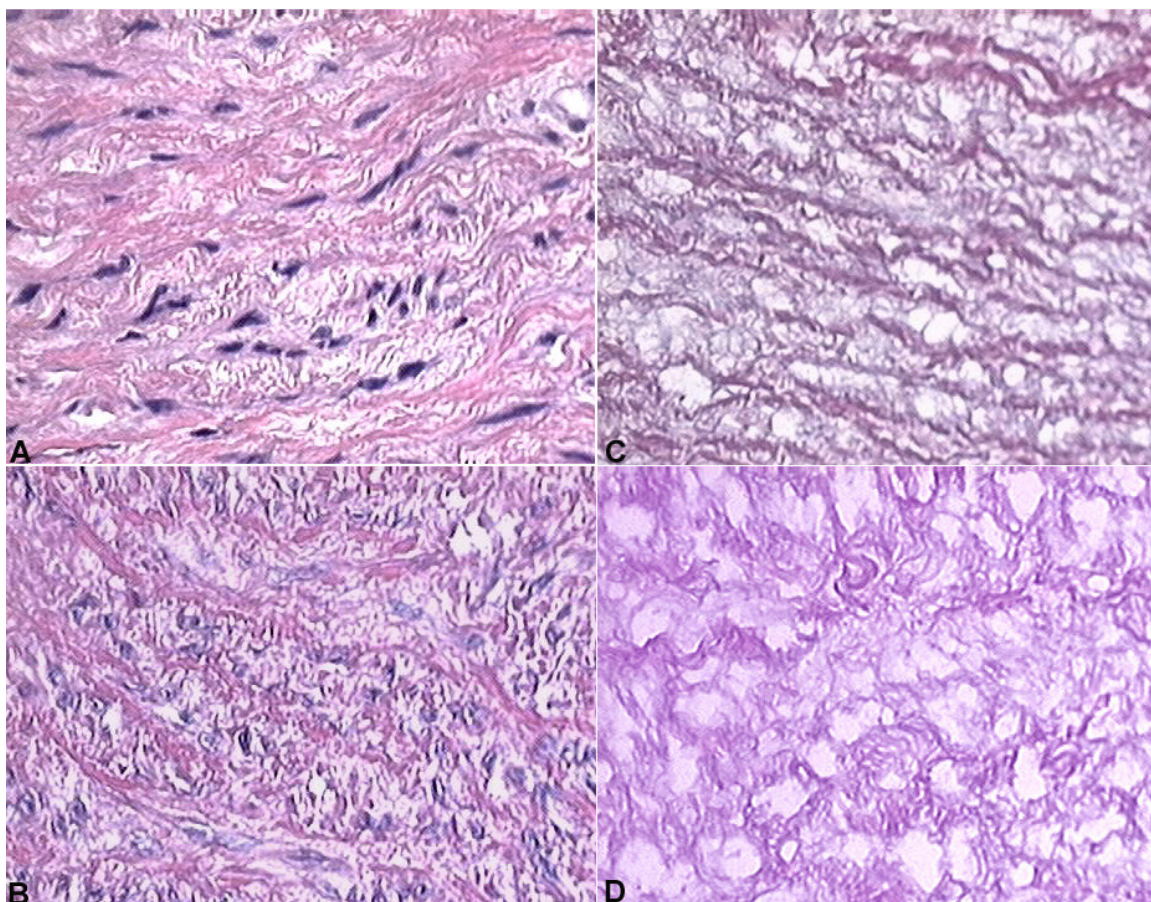


Figura 11 – Análise qualitativa da matriz extracelular de condutos pulmonares criopreservados e submetidas a processo de descelularização. A – Controle: criopreservado e não submetido a processo de descelularização. B – DOA 1%; C – SDS 0,1% e D – SDS 0,3%.

Cúspide: As cúspides obtidas deste grupo também apresentaram modificações na matriz quando comparadas às obtidas do grupo controle “fresco” (Figura 10 – A). As cúspides oriundas de valvas pulmonares criopreservadas (Figura 12 – A) possuem uma compactação maior próxima à camada endotelial, não seguindo o caminho sinuoso que as fibras possuem logo abaixo desta camada. As imagens obtidas das cúspides tratadas com DOA 1% e SDS 0,3% (Figuras 12 – B e 12 – D, respectivamente) revelam grande compactação das fibras, sendo a concentração de SDS 0,1% (Figura 12 – C) a melhor resposta à manutenção de uma matriz extracelular comparável a do controle.

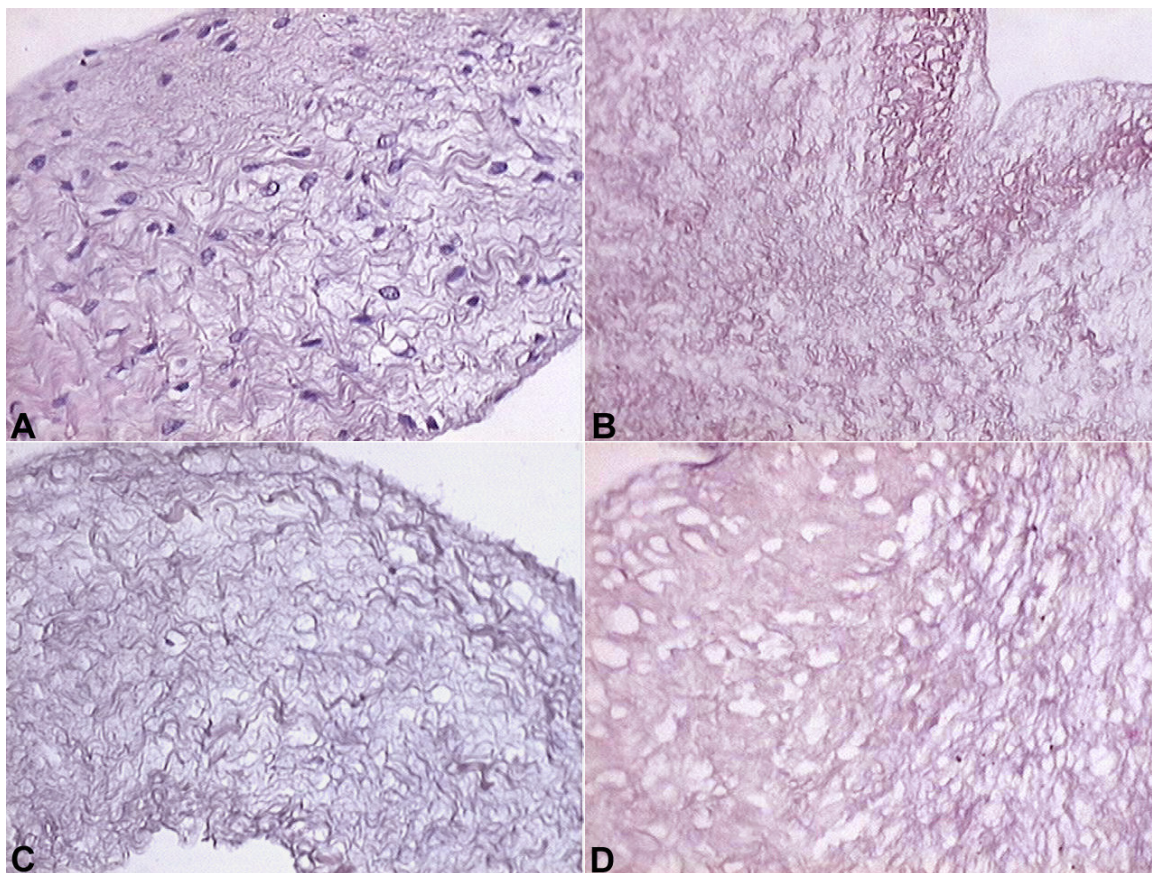


Figura 12 – Análise qualitativa da matriz extracelular de cúspides pulmonares criopreservadas e submetidas a processo de descclularização. A – Controle: criopreservado e não submetido a processo de descclularização. B – DOA 1%; C – SDS 0,1% e D – SDS 0,3%.

4.2 – Análise quantitativa da matriz extracelular através de morfometria

A técnica da morfometria foi utilizada para medir o nível dos componentes da matriz extracelular antes e após a descclularização, para que se tenha uma base concreta quanto aos danos causados ou não ao tecido após o tratamento, visto que não há na literatura atual artigos para serem usados para comparação e portanto nossos dados são inéditos.

4.2.1 - Análise de fibras elásticas

Conduto: Ao analisar-se a Figura 13, considerando somente a medição de fibras elásticas nos condutos das valvas pulmonares, percebe-se uma diferença significativa entre o criopreservado e o fresco, sugerindo que a criopreservação por si só já altera a matriz extracelular. A análise morfométrica baseia-se na medição das fibras por área, e o tecido criopreservado apresenta-se mais frouxo do que o controle (Figura 11 – A).

Tendo ainda como base a Figura 13, e comparando somente os enxertos que não passaram pela criopreservação, chamados “frescos”, percebe-se que os métodos descelularizantes utilizando SDS 0,1% e DOA 1% não alteram significativamente a quantidade de fibras elásticas em relação ao controle. Entretanto a descelularização feita com SDS 0,3% apresenta diferença significativa na mesma comparação. Quando se compara o enxerto controle com os tecidos que foram criopreservados, observa-se diferença significativa em todos os métodos descelularizantes, com maior ênfase ao método que utiliza SDS 0,3%.

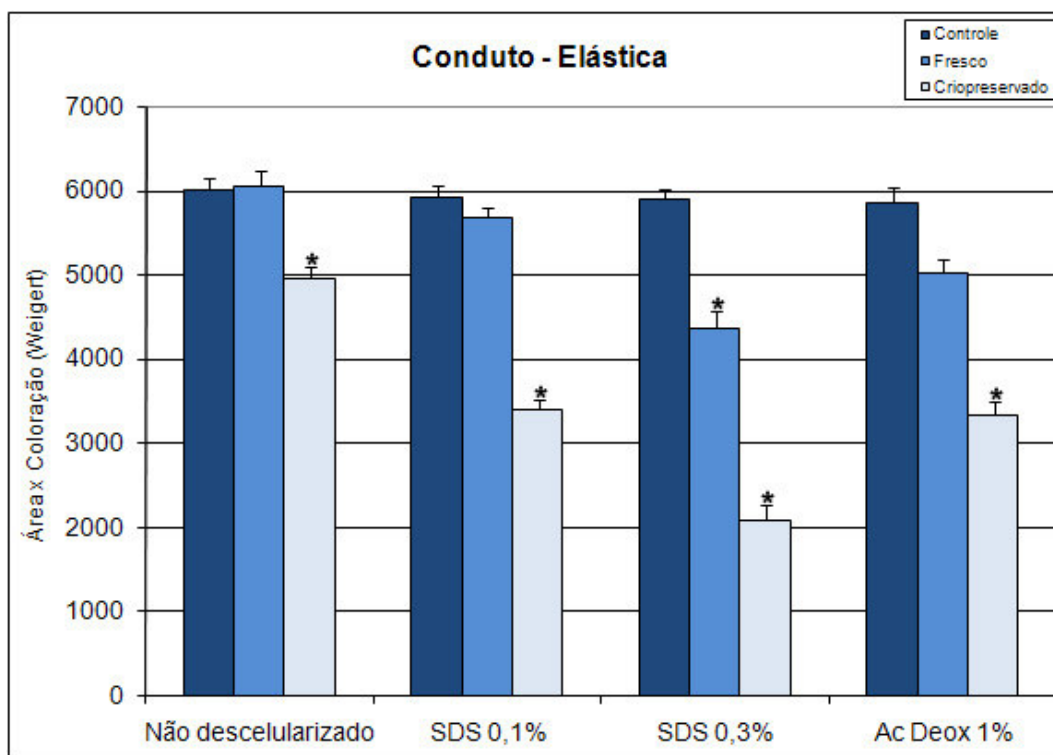


Figura 13 – Dados estatísticos obtidos por análise morfométrica de lâminas de conduto de ambos os grupos (I – Fresco e II – Criopreservado), respectivamente, coradas com Orceína Acética para observação quantitativa de fibras elásticas. O grupo controle corresponde ao total de fibra elástica encontrada em condutos de valvas que não receberam qualquer tratamento e servem como comparativo entre os grupos tratados. Os dados apresentados são significativos em relação ao controle (*), com $p < 0.05$.

Cúspide: A cúspide apresenta-se mais delgada do que o conduto. Além disso, apresenta uma quantidade menor de fibras elásticas, visto que a camada ventricular, onde predomina este tipo de fibra, é a mais fina. Talvez por isso, as diferenças apresentadas após criopreservação e/ou descelularização sejam mais significativas. Comparando o controle com o criopreservado (Figura 14), percebe-se que a cúspide sofre ainda mais que o conduto em relação à perda de fibras elásticas. Os enxertos descelularizados por qualquer um dos métodos, SDS 0,1%, SDS 0,3% ou DOA1%, após criopreservação, tiveram perdas de

fibras elásticas. Nos enxertos frescos, somente os que passaram pela descelularização com SDS 0,1% não tiveram diferença significativa comparados ao controle.

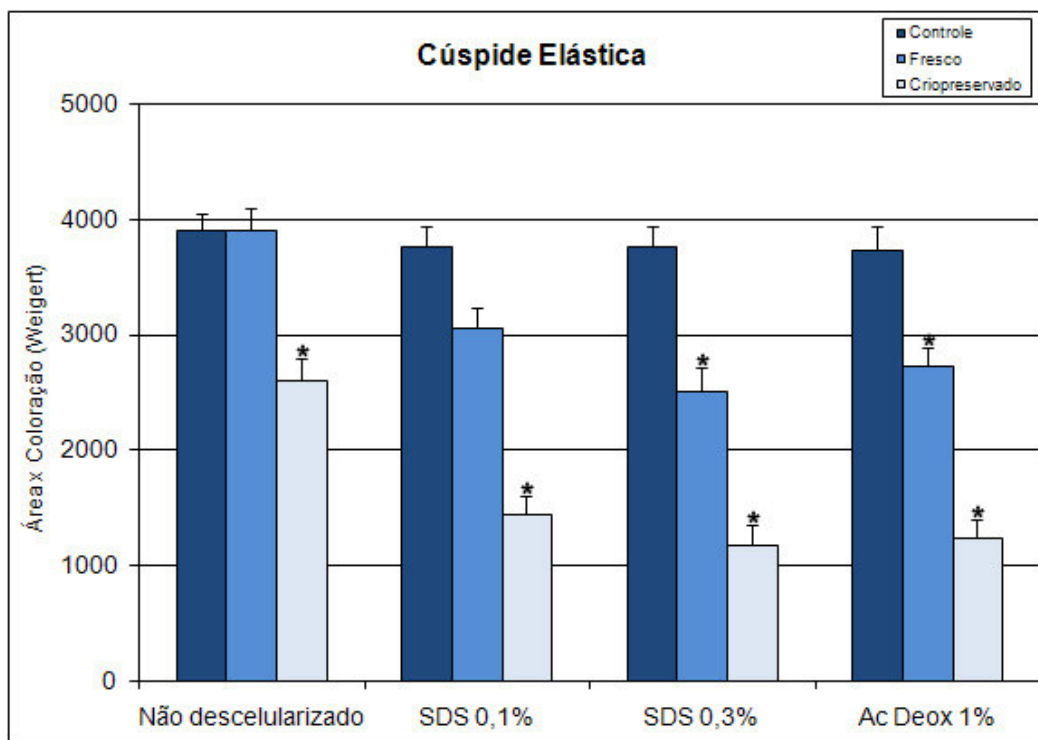


Figura 14 – Dados estatísticos obtidos por análise morfométrica de lâminas de cúspide de ambos os grupos (I – Fresco e II – Criopreservado), respectivamente, coradas com Orceína Acética para observação quantitativa de fibras elásticas. O grupo controle corresponde ao total de fibra elástica encontrada nas cúspides de valvas que não receberam qualquer tratamento e servem como comparativo entre os grupos tratados. Os dados apresentados são significativos em relação ao controle (*), com $p < 0.05$.

4.2.2 - Análise de colágeno

Conduto: Para a quantificação de colágeno, foram utilizadas lâminas coradas com Tricrômico de Gomori e avaliamos os condutos das valvas pulmonares (Figura 15). Observa-se diferença significativa entre o criopreservado e o fresco, sem tratamento descelularizante.

Com base ainda na Figura 15, percebe-se que, nos condutos frescos descelularizados, os tratamentos feitos com SDS 0,1% e DOA 1% não alteram significativamente a quantidade de colágeno. A alteração da matriz ocorre somente com o tratamento feito com SDS 0,3% nos condutos frescos. Nos condutos criopreservados, observa-se diferença significativa em qualquer um dos tratamentos descelularizantes, sendo do tratamento com SDS 0,3% a diferença mais enfática.

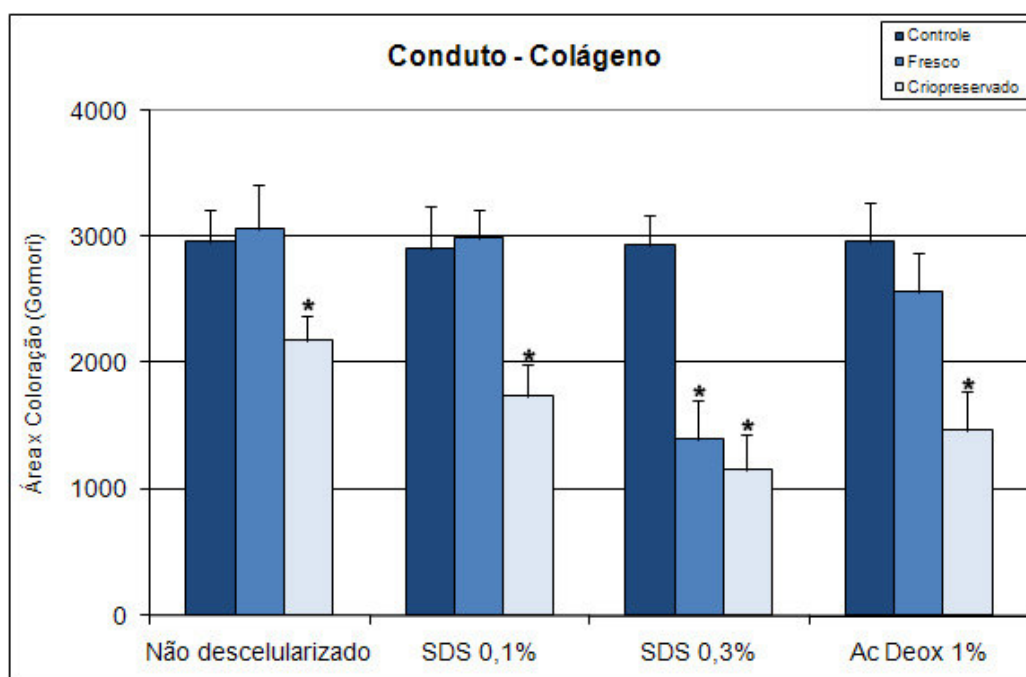


Figura 15 – Dados estatísticos obtidos por análise morfométrica de lâminas de conduto de ambos os grupos (I – Fresco e II – Criopreservado), respectivamente, coradas com Gomori para observação quantitativa de colágeno. O grupo controle corresponde ao total de fibra colágena encontrada em condutos de valvas que não receberam qualquer tratamento e servem como comparativo entre os grupos tratados. Os dados apresentados são significativos em relação ao controle (*), com $p < 0.05$.

Cúspide: Nas cúspides, o resultado apresentado difere um pouco dos resultados obtidos na quantificação do conduto. O que se observa na análise dos enxertos frescos é uma diferença insignificante entre o controle e o descelularizado pelo tratamento com SDS 0,1%, e diferença significativa nos outros dois tratamentos, SDS 0,3% e DOA 1% (Figura 16). Nos enxertos criopreservados, há alteração em todos os tratamentos descelularizantes, inclusive nas cúspides criopreservadas sem a descelularização, comparando ao controle.

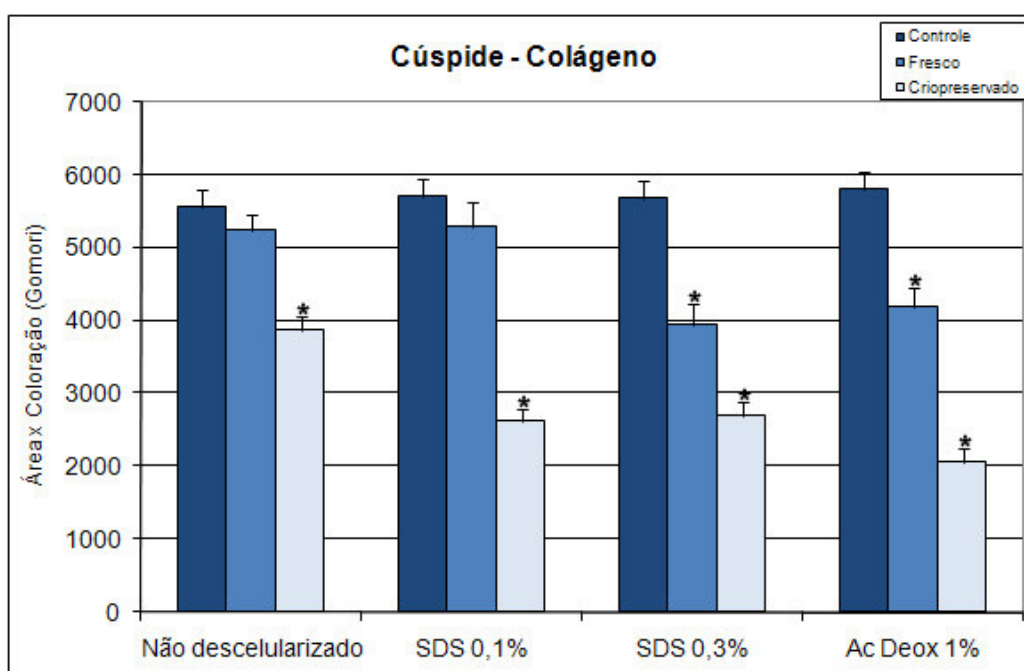


Figura 16 – Dados estatísticos obtidos por análise morfométrica de lâminas de cúspide de ambos os grupos (I – Fresco e II – Criopreservado), respectivamente, coradas com Gomori para observação quantitativa de colágeno. O grupo controle corresponde ao total de fibra colágena encontrada em cúspides de valvas que não receberam qualquer tratamento e servem como comparativo entre os grupos tratados. Os dados apresentados são significativos em relação ao controle (*), com $p < 0.05$.

4.3 – Ensaio de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade apresentaram-se negativos para todos os fragmentos de condutos, criopreservados ou não, submetidos às três soluções descelularizantes. Os testes realizados com o controle positivo e negativo estão apresentados na Figura 17. Observa-se formação de halo nos poços dos controles positivos, demarcado com pontos pretos. O mesmo não ocorre nas placas dos controles negativos.



Figura 17 – Teste de citotoxicidade. Nos poços superiores foram utilizados fragmentos de $0,25\text{cm}^2$ de PVC como controles positivos. Nos poços inferiores foram utilizados pedaços de papel de filtro estéril como controles negativos.

Na Figura 18, observa-se os testes realizados com fragmentos descelularizados com SDS 0,1% e DOA 1%. Não se observa formação de halo

ao redor dos fragmentos em nenhum dos poços, o que caracteriza resultado negativo para citotoxicidade em ambos os tratamentos.



Figura 18 – Teste de citotoxicidade. Nos poços superiores foram adicionados fragmentos de conduto descelularizados com SDS 0,1% e nos poços inferiores, fragmentos descelularizados com DOA 1%.

O tratamento descelularizante que utiliza SDS 0,3% também não causa citotoxicidade, como observado na Figura 19. O que se percebe ao redor dos fragmentos, não é um halo e sim uma falha no preparo do agar, também percebida no controle negativo apresentado nos poços superiores desta mesma Figura.

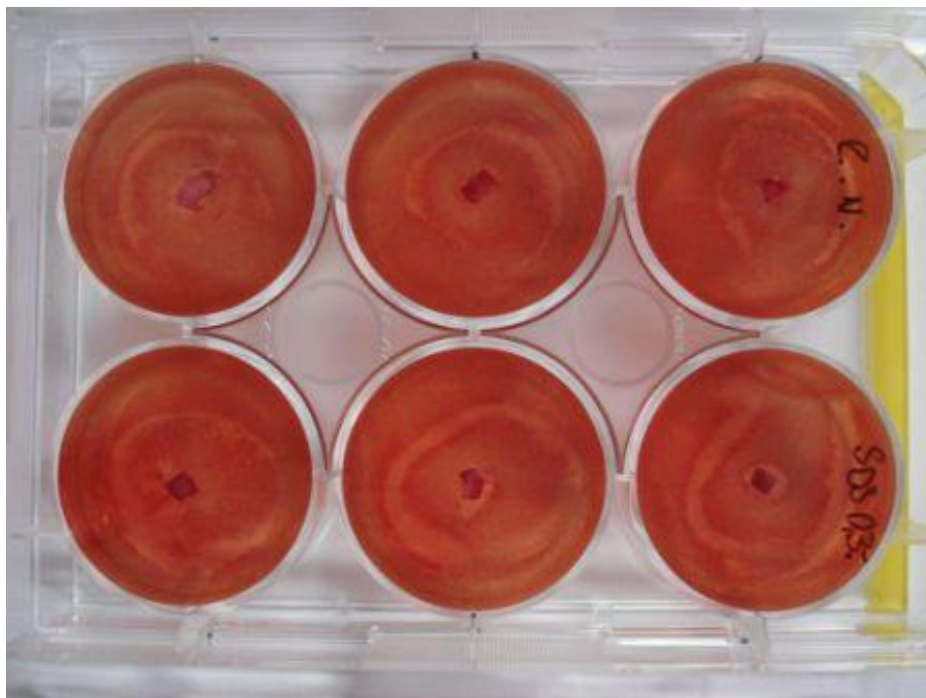


Figura 19 – Teste de citotoxicidade, Nos poços superiores foram adicionados pedaços de papel de papel de filtro estéril (controle negativo) e nos poços inferiores, fragmentos descelularizados com SDS 0,3%.

5. DISCUSSÃO

Na última década, o conceito de engenharia de tecidos tem sido amplamente utilizado em todos os campos da medicina criando substitutos para órgãos e tecidos. As técnicas oriundas a partir do conceito de engenharia de tecidos também tem sido cada vez mais aplicadas, otimizando valvas cardíacas para implantes. Nossos resultados revelam as alterações da matriz extracelular decorrentes, principalmente do processo de criopreservação, técnica muito utilizada para a preservação de homoenxertos. Ainda, quando conjugado ao processo de descelularização, as alterações na matriz extracelular, tanto de condutos como de cúspides, foram altamente significativas quando comparadas ao controle. Que significado nossos resultados podem ter na clínica médica? O primeiro passo da engenharia de tecidos é prover uma matriz com a arquitetura valvar natural e condições ideais para o repovoamento de células do receptor (STEINHOFF *et al.*, 2000). Entretanto, nossos resultados revelam pelo menos dois problemas: 1. As propriedades teciduais deterioradas após a remoção das células podem ser repovoadas após substituição valvar? 2. Superfícies colágenas rompidas podem ser altamente trombogênicas, uma vez que o colágeno diretamente induz a ativação plaquetária bem como o fator XII de coagulação, principalmente em vasos de pequeno calibre (MAHDI *et al.*, 2002). Poderia então, a combinação de criopreservação e a utilização de agentes descelularizantes, que por si só promove alterações significativas na matriz colágena, resultar na falha do enxerto valvar? Estas são questões altamente relevantes na procura de um agente descelularizante capaz de remover as

células e com isso a imunogenicidade tecidual, com a manutenção dos componentes de matriz extracelular. Demonstramos com nossos resultados que agentes como SDS 0,1% e DOA 1% podem ser classificados como ótimos agentes descelularizantes quanto à manutenção dos elementos de matriz extracelular, mas não na remoção total das células do tecido valvar já que DOA 1% não foi capaz de retirar completamente as células do conduto valvar. A análise de antígenos HLA de pacientes que receberam enxertos descelularizados com DOA 1% revela que nove pacientes não tiveram nenhuma resposta humoral ou resposta baixa, o que revela a não imunogenicidade do enxerto, porém dois pacientes tiveram aumento significativo nos níveis de anticorpos anti-HLA do doador o que pode ser resultante da não descelularização completa do tecido (COSTA *et al.*, 2005).

A degeneração dos homoenxertos baseada em reações imunológicas pode ser evitada com o uso dos princípios da engenharia de tecidos, com os quais pretende-se obter valvas cardíacas que não condenem o receptor a tratamentos com anticoagulantes por toda a vida, não causem resposta imunológica e que possuam potencial de reparo, remodelamento e crescimento, sendo especialmente indicados a pacientes jovens e crianças. A descoberta de um método totalmente não imunogênico para os transplantes de valvas cardíacas possibilitaria, teoricamente, uma melhora significativa na qualidade de vida de pessoas que sofrem de doenças valvares por não haver necessidade de outras intervenções cirúrgicas para substituição, e não precisar de tratamentos complementares, não tendo, portanto riscos de haver complicações

imunológicas pós-transplante. Estas reações imunes ocorrem devido à presença de células viáveis ou restos de membranas celulares ou nucleares, que apresentam receptores capazes de causar a rejeição pelo paciente, presentes nas valvas transplantadas, problema que aparece nos homoenxertos frescos e criopreservados (GRAUSS *et al.*, 2005).

Até então, a preservação da viabilidade celular era considerada essencial para a qualidade do enxerto implantado, utilizando-se enxertos homovitalis, frescos e criopreservados. A integridade celular bem como a preservação dos componentes de matriz extracelular sempre foram mostrados como determinantes importantes para a funcionalidade dos enxertos a longo prazo (CEBOTARI *et al.*, 2002). A criopreservação surgiu como forma de preservação e estocagem por longos períodos, diminuindo o descarte de enxertos por validade e proporcionando variedade de tipos e tamanhos de enxertos. Atualmente, sabe-se que a presença de células ou material nucléico nos enxertos causam resposta imune, a qual possivelmente leva à degeneração da valva (CEBOTARI *et al.*, 2002). Em um estudo, onde enxertos autólogos passaram por condições idênticas aos homólogos, como tempo de isquemia, tratamento com antibióticos e criopreservação, mostrou-se que nenhum destes procedimentos foi responsável pela deterioração a longo prazo dos enxertos homólogos (NEVES *et al.*, 1997). É essencial então encontrar um método que retire completamente estes fatores imunogênicos além de manter a integridade da matriz extracelular.

Goffin *et al* avaliaram a qualidade dos constituintes valvares de enxertos criopreservados e frescos, utilizando o tempo de isquemia como comparativo. Nos enxertos onde o tempo de isquemia foi mais curto, não houve alteração significativa nos enxertos criopreservados em relação aos frescos. No entanto, houve influência na qualidade dos enxertos com maior tempo de isquemia (50-62 horas), especialmente na integridade celular e ultraestrutural de macrófagos e GAGs (GOFFIN *et al.*, 1997). Os dados que relacionam o tempo de isquemia e a viabilidade do uso de enxertos valvares, não são comparativos para o nosso estudo já que o tempo de isquemia de todas as valvas utilizadas foi menor que 20h (ver Materiais e Métodos – item 3.1).

Na análise dos resultados de microscopia ótica obtidos neste estudo, observamos que o processo de criopreservação por si só parece danificar a matriz extracelular. As fibras do conduto pulmonar parecem estar afastadas e o tecido apresenta-se mais frouxo. Schenke-Layland *et al* obtiveram resultados parecidos quando encontraram alterações e deteriorações significantes nas estruturas de matriz após criopreservação de valvas cardíacas. Colágeno e fibras elásticas apresentaram-se enfraquecidas em diferentes graus (SCHENKE-LAYLAND *et al.*, 2006). O método de criopreservação utilizado aqui é idêntico ao utilizado pelo Banco de Valvas Cardíacas Humanas da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba (COSTA *et al.*, 2005) e a escolha das soluções descelularizantes utilizadas neste estudo foi baseada nos resultados obtidos com DOA (DOHMEN *et al.*, 2002; DOHMEN *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2004) e com SDS (GRAUSS *et al.*, 2003; BOOTH *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2007), além

de resultados obtidos pelo nosso grupo, no Núcleo de Enxertos Cardiovasculares PUCPr, após testes com Triton X-100, tripsina, SDS 0,1% até 1% e DOA 1%. As soluções que utilizaram as concentrações 0,1% e 0,3% de SDS e DOA 1% foram as que apresentaram os melhores resultados nos testes, e por isso foram novamente investigadas neste trabalho (dados não publicados). Quando analisamos as lâminas de condutos frescos submetidos à descelularização com DOA 1%, percebemos que ainda há presença de células íntegras no interior da matriz extracelular, além de uma coloração azulada em todo o tecido. Como o material nucléico cora-se de azul com HE, acreditamos que ocorra fixação do DNA à glicoproteínas presentes na matriz. Esses resultados evidenciam uma possível falha na descelularização utilizando DOA 1%. Curiosamente, este resultado difere do achado por Costa *et al* (2004) que relatam total descelularização tecidual após incubação de valvas porcinas com solução de DOA e etanol. Uma possibilidade desta discordância pode ser devido ao fato de que em nosso estudo utilizamos solução preparada imediatamente ao uso, enquanto no trabalho de Costa foi utilizada solução previamente estocada e comercializada pelos detentores da patente (patenteado pela Universidade Humboldt de Berlim). Os autores relatam, porém, que dois pacientes que receberam enxertos descelularizados com DOA produziram resposta humoral significativa contra antígenos HLA do doador, o que pode sugerir a falha na completa descelularização do enxerto transplantado. Quando analisamos as lâminas de cúspides frescas submetidas à mesma técnica descelularizante, observamos a completa retirada de células do tecido, além da preservação da

matriz e está de acordo com o relato de Costa *et al* (2004). A descelularização de valvas cardíacas utilizando DOA 1% foi a técnica escolhida por Dohmen *et al* (2002; 2003) por não interferir na integridade do colágeno, alterando sua estrutura, como acontece com tratamentos enzimáticos. Porém, em nossos estudos observamos que se houver criopreservação anterior ao tratamento com DOA 1%, os resultados revelam intensa degradação da matriz extracelular quando comparada ao controle. Observamos que o conduto apresentou menos fibras quando comparado ao controle, e a descelularização foi ainda mais ineficiente. Na análise das cúspides, fica evidente a compactação destas fibras. Experimentos *in vivo* revelam que a presença de restos celulares nesses enxertos podem não alterar a viabilidade de uso destas valvas descelularizadas com DOA. Erdbrügger *et al* (2006) utilizaram valvas pulmonares porcinas descelularizadas com DOA em ovelhas jovens com o método de cirurgia de Ross. Investigações clínicas revelaram excelentes propriedades hemodinâmicas das valvas, sem necessidade de tratamento anti-trombótico e repovoamento das valvas por células do hospedeiro, sem sinais de calcificação. Contraditoriamente, Kasimir *et al* (2006) ao avaliar o crescimento de células endoteliais em condutos pulmonares porcos descelularizados com Triton X-100, DOA, Igepal CA-630 e ribonuclease, observaram numerosas plaquetas aderentes e ativadas que dificultaram o crescimento de células endoteliais na matriz descelularizada. Os autores concluíram que se uma valva completamente livre de células foi atacada por monócitos e plaquetas como um foco inflamatório

primário, o uso destas valvas acelulares necessitaria ser feito com rigoroso controle.

Avaliando o tratamento feito com SDS 0,1% no conduto de valvas pulmonares sem criopreservação anterior, a descelularização mostrou-se eficaz, retirando completamente as células e ainda preservando a integridade da matriz extracelular. O mesmo encontramos na concentração de 0,3%. Já para as cúspides, a concentração menor de SDS causou o mesmo efeito do conduto, descelularizando-o completamente e preservando a matriz. A concentração maior provocou degradação na matriz, talvez pelo fato de a cúspide apresentar-se mais delgada que o conduto. O tratamento descelularizante utilizando-se SDS conjugado à criopreservação acentuam a degradação da matriz. Os condutos tratados com ambas as concentrações de SDS revelaram-se compactados em partes do conduto e com espaços maiores entre as fibras, com pontos de degeneração tecidual. No caso das cúspides criopreservadas, a concentração menor de SDS foi a que apresentou a melhor resposta à manutenção da matriz comparável ao controle.

Os diferentes trabalhos que relatam os efeitos contraditórios da descelularização e posterior repovoamento de células do hospedeiro (WILCOX, *et al.*, 2005; KIM and HUH, 2004; GRAUSS, *et al.*, 2005; RIEDER, *et al.*, 2004; KASIMIR, *et al.*, 2006) não trazem nenhuma informação sobre possíveis danos nos componentes de matriz extracelular e muito menos, informações sobre a importância destes danos na recuperação da matriz descelularizada *in vivo*. Sabe-se que a matriz extracelular é composta por glicosaminoglicanas e

proteínas fibrilares. A proteína fibrilar mais importante é o colágeno, que proporciona força tensiva aos tecidos pela formação de fibras, existindo ainda, fibrilina, elastina e fibronectina (STEVENS & LOWE, 1995). Nas valvas e artérias, os GAGs geralmente encontrados são os sulfatos de condroitina e os sulfatos de heparana, além de proteoglicanas, que são GAGs ligadas a um eixo protéico e por serem grandes moléculas são capazes de manter um grande espaço hidratado na matriz. A elastina é o principal componente extracelular das artérias de grande calibre, como a pulmonar e a aorta, responsáveis por conduzir o sangue a partir do coração para os pulmões e para o resto do corpo respectivamente. (TAYLOR *et al.*, 2000).

Assim, dependendo do método utilizado para a descélularização do enxerto haverá maior ou menor degradação da matriz extracelular. Por isso é imprescindível que a técnica utilizada não danifique ou diminua os componentes desta matriz. As valvas cardíacas consistem em várias camadas de tecido histologicamente distintas dispostas uma sobre a superfície da outra. As camadas das cúspides semilunares dividem-se em fibrosa, esponjosa e ventricular. Na valva porcina, a fibrosa é a camada mais espessa proximalmente ao anel, contendo feixes de colágeno (MULHOLLAND *et al.*, 1996). Por causa da espessura e densidade do tecido nesta camada, mecanicamente é a porção mais forte da cúspide e sofre principalmente o stress da pressão diastólica. A esponjosa é uma camada de tecido conectivo frouxo e caracteriza a maior parte da espessura na margem livre da cúspide. É composta na sua maior parte por proteoglicanos e água, e em menor quantidade colágeno e fibras elásticas. A

natureza semifluida desta camada dá à cúspide uma plasticidade considerável. Sugere-se que a sua principal função seja amortecer as vibrações na fibrosa, associada com flexões no fechamento da cúspide. A ventricular é a camada mais fina e composta principalmente por fibras elásticas. Esta camada começa na parede da região de fluxo do ventrículo e tem por essa razão um aspecto de endocárdio. A superfície lisa ventricular da cúspide é importante para a manutenção do fluxo sanguíneo laminar durante a sístole. O colágeno fornece a maior parte da força de tensão e mecânica da valva enquanto as fibras elásticas fornecem extensibilidade (MULHOLLAND *et al.*, 1996).

A análise morfométrica da matriz extracelular de valvas cardíacas é um fato inédito, e por isso, não há como comparar com resultados de outros autores. As comparações que pudemos fazer são entre os enxertos “controle”, que não sofreram nenhum tipo de processamento, com os que passaram pela criopreservação e/ou pela descelularização. Para esta análise, utilizamos lâminas coradas com Tricrômico de Gomori para quantificação de colágeno e Orceína Acética para fibras elásticas. Quando comparamos quantitativamente os enxertos frescos e criopreservados, observamos que há diferença significativa entre eles, seja no conduto ou na cúspide, considerando colágeno ou fibras elásticas. Analisando a quantidade de fibras elásticas dos condutos que não passaram pela criopreservação e foram tratados com DOA 1%, observamos que não houve diferença significativa em relação ao enxerto controle. O mesmo não ocorre se a criopreservação preceder a descelularização. As cúspides, mais delgadas que o conduto, apresentaram perda de fibras elásticas com DOA 1%,

tanto “frescas” quanto criopreservadas. A camada ventricular é a mais fina nas cúspides, e é onde predomina este tipo de fibras. Passando para o tratamento de condutos com SDS, e comparando somente os tecidos “frescos”, observamos que quando utilizamos SDS 0,1%, não há alteração significativa em relação ao controle, diferente do SDS 0,3% na mesma comparação. Após criopreservação, há diferença em ambas as concentrações, porém com maior ênfase ao SDS 0,3%. Nas cúspides criopreservadas, há diferença significativa em SDS 0,1% ou 0,3%. Nas cúspides “frescas”, somente o SDS 0,1% não causou perda de fibras elásticas significativamente em relação ao controle.

Quando comparamos condutos frescos com criopreservados, tratados com DOA 1%, percebemos uma diferença significativa somente no segundo caso. Quando passamos às cúspides descelularizadas da mesma forma, a diferença ocorre em qualquer um dos casos, sejam frescos ou criopreservados. No caso da descelularização feita com SDS, a concentração de 0,3% diminui a quantidade de colágeno seja nos condutos frescos ou criopreservados, com maior ênfase neste último grupo. O SDS 0,1% apresenta diferença significativa quando a criopreservação o precede, e insignificante nos condutos frescos. Nas cúspides, o resultado é exatamente o mesmo.

O teste de citotoxicidade é especialmente importante, uma vez que ele vai indicar se houve a completa remoção do agente descelularizante, permitindo a reendotelização do enxerto. O repovoamento do tecido é crucial uma vez que as células endoteliais agem como uma barreira fisiológica no tecido valvar, prevenindo a deposição de plaquetas e fibrina na superfície da valva. Ambos os

fatores são considerados como causas de degeneração e calcificação do enxerto (DOHMEN *et al.*, 2003). Courtman *et al* excluíram o SDS do seu protocolo por encontrarem desestabilização do tecido, afetando principalmente elastina, e dificuldade em remover resíduos do detergente. No entanto, a concentração de SDS utilizada por eles foi de 1% (COURTMAN *et al.*, 1994). Encontramos maiores danos na matriz extracelular com a concentração de 0,3%, mas não houve dificuldade na remoção como pudemos ver no teste de citotoxicidade.

Vários grupos de pesquisadores descreveram métodos para descelularização utilizando detergentes iônicos e não-iônicos e também métodos de extração enzimática, no entanto, a morfologia da matriz extracelular das valvas tem passado muitas vezes despercebida. Este estudo torna-se muito importante pelo fato de que esses agentes descelularizantes podem causar danos irreversíveis à matriz extracelular das valvas. Sabe-se que a matriz extracelular está diretamente vinculada às interações das células em processos como os de diferenciação, migração, adesão, proliferação, modulação celular, entre outros (revisto por BIRK & TRELSTAD, 1984). Os resultados obtidos neste estudo foram altamente satisfatórios e são inéditos, uma vez que não há referência de análise quantitativa por análise morfométrica de componentes da matriz extracelular em valvas submetidas a processos de engenharia de tecidos. Além disso, nossos resultados podem auxiliar outros pesquisadores na procura de uma solução altamente eficiente na remoção das células do enxerto e na manutenção da matriz extracelular, combinação que pode resultar em resultados

eficientes e que estão em evidência na área médica. A partir dos resultados aqui descritos, podemos sugerir SDS 0,1% como a melhor opção como solução descelularizante, uma vez que promove a descelularização completa do tecido sem causar danos maiores à quantidade e integridade das moléculas de matriz extracelular.

6. CONCLUSÕES

Conforme a análise dos resultados obtidos, concluímos que:

1) A solução SDS 0,1% promove a descelularização completa do enxerto sem danificar visualmente a matriz extracelular e sem diminuir seus componentes, colágeno e fibras elásticas.

2) A solução SDS 0,3% é capaz de remover completamente as células, mas causa sérios danos à matriz extracelular.

3) A solução SDS é mais efetiva nas cúspides que no conduto.

4) A solução DOA 1% mantém a integridade da matriz, mas se mostrou incapaz de remover completamente as células dos enxertos.

5) A criopreservação não é um tratamento ideal a ser feito anteriormente à descelularização, pois há diminuição mais evidente dos componentes da matriz extracelular, quando associados os dois procedimentos.

6) Nenhuma solução testada mostrou-se citotóxica em ensaios *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS

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

BADER, A. *et al.* Tissue engineering of heart valves – human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. **Eur J of Cardiothorac Surg.**, 14(3): 279-84, 1998.

BAIRATI, A.; DEBIASI, S. Presence of a smooth muscle system in aortic valve leaflets. **Anat Embryol.**, 161(3): 329-40, 1981.

BIRK, D.E.; TRELSTAD, R.L. Extracellular compartments in matrix morphogenesis: Collagen fibril, bundle and lamellar formation by corneal fibroblasts. **J Cell Biol.**, 99:2033, 1984.

BOOTH, C. *et al.* Tissue Engineering of Cardiac Valve Prostheses I: Development and Histological Characterization of an Acellular Porcine Scaffold. **J Heart Valve Dis.**, 11(4): 457-62, 2002.

CEBOTARI, S. *et al.* Construction of Autologous Human Heart Valves Based on an Acellular Allograft Matrix. **Circulation**, 106(12 suppl 1): I63-I68, sep 2002.

COSTA, F.D.A. *et al.* Experimental study with decellularized porcine heterografts: the prosthesis of the future. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, 19(1)74:82, 2004.

COSTA, F.D.A. *et al.* Immunological and echocardiographic evaluation of decellularized versus cryopreserved allografts during the Ross operation. **Eur J Cardiothorac Surg**, 27: 572-78, 2005.

COSTA, F.D.A. *et al.* Operação de Ross com homoenxertos valvares descelularizados – resultados de médio prazo. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, trabalho submetido em 05/03/2007 – no prelo

COSTA, M.T.B.A. *et al.* Análise das atividades dos oito anos iniciais do Banco de Valvas Cardíacas Humanas do Hospital de Caridade da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, 20(4): 398-407, oct 2005

COURTMAN, D.W. *et al.* Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: Biochemical and mechanical effects of cell extraction. **J Biomed Mater Res**, 28(6): 655-66, 1994.

DOHMEN, P.M. *et al.* Valvas cardíacas obtidas por engenharia de tecidos: A mais nova geração de próteses biológicas. **Arq Bras Cardiol**, v.79, n.5, 2002.

DOHMEN, P.M. *et al.* A tissue engineered heart valve implanted in a juvenile sheep model. **Med Sci Monit**, 9(4): BR97-BR104, 2003.

ERDBRUGGER, W. *et al.*, Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential in vivo. **Tissue Eng**, 12(8): 2059-68, 2006.

GOFFIN, Y.A.H. *et al.* Morphologic Study of Homograft Valves before and after Cryopreservation and after Short-Term Implantation in Patients. **Cardiovasc Pathol**, 6(1): 35-42, 1997.

GRABOW, N. *et al.* Mechanical and Structural Properties of a Novel Hybrid Heart Valve Scaffold for Tissue Engineering. **Int J Artif Organs**, 28(11): 971-9, 2004.

GRAUSS, R.W. *et al.* Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. **J Thorac Cardiovasc Surg.** 126(6):2003-10, 2003.

GRAUSS, R.W. *et al.* Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. **Eur J Cardiothorac Surg**, 27(4): 566-71, 2005.

HAY, E.D. **Cell Biology of Extracellular Matrix** Plenum Press, 2ed, New York, 1991, p.468

HOPKINS, R.A. Historical development of the use of homograft valves. In _____. Cardiac reconstructions with allograft valves. New York: Springer-Verlag; 1989a, p.3-13

HOPKINS, R.A. Rationale for use of cryopreserved allograft tissues for cardiac reconstructions. In _____. Cardiac reconstructions with allograft valves. New York: Springer-Verlag; 1989b, p. 15-20

KARIM, N.; GOLZ, K.; BADER, A. The cardiovascular tissue-reactor: a novel device for the engineering of heart valves. **Int J Artif Organs**, 30(10):809-14, 2006.

KASIMIR, M.T. *et al.* Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. **Int J Artif Organs**, 26(5):421-7, 2003.

KASIMIR, M.T. *et al.*, Decellularisation does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. **J Heart Valve Dis**, 15: 278-86, 2006.

KIM, W.G.; HUH, J.H. Time related histopathologic changes of acellularized xenogenic pulmonary valved conduits. **ASAIO J**, 50(6): 601-5, 2004.

LEYH, R.G. *et al.*, In vivo repopulation of xenogenic and allogenic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation. **Ann Thorac Surg**, 75(5): 1457-63, 2003.

MEYER, S.R. *et al.* Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. **J Biomed Mater Res A**. 79(2):254-62, 2006.

MIRSADRAEE, S. *et al.* Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering. **Tissue Eng**, 12(4):763-73, 2006.

MOL, ANITA. **Functional tissue engineering of human heart valve leaflets**. Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven, 2005. p129.

MULHOLLAND, D.L.; GOTLIEB, A.I. Cell biology of valvular interstitial cells. **Can J Cardiol**, 12(3): 231-6, 1996.

NARINE, K. *et al.*, Readily available porcine aortic valve matrices for use in tissue valve engineering. Is cryopreservation an option? **Cryobiology**, 53(2): 169-81, 2006.

NEVES, J.P. *et al.*, Mechanisms underlying degeneration of cryopreserved vascular homografts. **J Thorac Cardiovasc Surg**, 113(6): 1014-21, 1997.

NUGENT, H.M.; EDELMAN, E.R. Tissue Engineering Therapy for Cardiovascular Disease. **Circ Res**, 92(10): 1068-78, 2003.

PARKER, R. An international survey of allograft banks. In: Yankah A.C., Yacoub, M.H., Hetzer, R. Cardiac valve allografts: science and practice. Darmstadt: Springer: 1997b, p.5-9.

RIEDER, E. *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. **J Thorac Cardiovasc Surg**, 127(2): 399-405, 2004.

ROGERO, S.O. *et al.*, Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat Res**, 6(3): 317-320, 2003.

ROSS, D.N. Homograft replacement of the aortic valve. **Lancet**, 2: 487, 1962.

ROSS, M.H. & ROMRELL, L.J. **Histologia: texto e atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993.

SAYK, F. *et al.*, Histopathologic Findings in a Novel Decellularized Pulmonary Homograft: An Autopsy Study. **Ann Thorac Surg**, 79(5): 1755-8, 2005.

SCHENKE-LAYLAND, K. *et al.*, Impact of Cryopreservation on Extracellular Matrix Structures of Heart Valve Leaflets. **Ann Thorac Surg**, 81(3): 918-26, 2006.

SCHENKE-LAYLAND, K. *et al.*, Comparative study of cellular and extracellular matrix composition of native and tissue engineered heart valves. **Matrix Biol**, 23(2): 113-25, 2004.

SCHOEN, F. J. and LEVY, R. J. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives, founder's award 25th annual meeting of the society for biomaterials. **Journal of biomedical materials research**, 47:439–465, 1999.

STAMM, C. *et al.*, Biomatrix/Polymer Composite Material for Heart Valve Tissue Engineering. **Ann Thorac Surg**, 78(6): 2084-92, 2004.

STEINHOFF, G. *et al.*, Tissue Engineering of Pulmonary Heart Valves on Allogenic Acellular Matrix Conduits. **Circulation**, 102(19):50-5, 2000.

STEVENS, A. & LOWE, J. **Histologia**. São Paulo: Manole, 1995.

TAYLOR, P. M.; ALLEN, S. P.; YACOUB, M. H. Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin. **J Heart Valve Dis**, 9(1): 150-8, 2000.

TUDORACHE, I. *et al.* Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. **J Heart Valve Dis**. 16(5):567-73, 2007.

USPTO United States Patent. Steven Goldstein. **Treated tissue for implantation and methods of preparation**. 5.899.936, June 5, 1995. May 4, 1999

VILLALBA, R. *et al.*, Characterization of Ultrastructural Damage of Valves Cryopreserved under Standard Conditions. **Cryobiology**, 43(1): 81-4, 2001.

WILCOX, H.E.; *et al.*, Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. **J Heart Valve Dis**, 14(2): 228-36, 2005.

ZELTINGER, J. *et al.*, Development and Characterization of Tissue-Engineered Aortic Valves. **Tissue Eng**, 7(1): 9-22, 2001.