

FACULDADE EVANGÉLICA MACKENZIE DO PARANÁ

PEDRO HENRIQUE DALL'IGNA CALEFFI

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE DESCELULARIZAÇÃO, POR ANÁLISE
HISTOLÓGICA

Curitiba
2022

PEDRO HENRIQUE DALL'IGNA CALEFFI

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE DESCELULARIZAÇÃO, POR ANÁLISE
HISTOLÓGICA

Trabalho de Curso apresentado à Faculdade
Evangélica Mackenzie como requisito parcial para
graduação em Medicina

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Kubrusly

Curitiba
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná)

C148 Caleffi, Pedro Henrique Dall'igna.
Estudo comparativo de métodos de descelularização por análise
histológica / Pedro Henrique Dall'igna Caleffi. — Curitiba, 2022.

Orientador : Prof. Dr. Luiz Fernando Kubrusly.

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Presbiteriano
Mackenzie,

Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curso de Medicina, 2022.

1. Bioprótese. 2. Engenharia tecidual. 3. Enxerto vascular. I. Título.

CDD

617.954

PEDRO HENRIQUE DALL'IGNA CALEFFI

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE DESCELULARIZAÇÃO, POR ANÁLISE
HISTOLÓGICA

Trabalho de Curso apresentado à Faculdade
Evangélica Mackenzie como requisito
parcial para graduação em Medicina
Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando
Kubrusly

Aprovado em __ / __ / 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____
Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná

Prof. Dr. _____
Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná

Dedico este trabalho ao meu pai e minha mãe, por seu apoio, paciência, amor e carinho, encontrados especialmente nos dias de maior cansaço.

Agradecimentos

À Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná pela oportunidade de realizar o trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Kubrusly pela orientação

À Fernanda Prehs Izar por permitir que eu participasse de seu estudo piloto e utilizasse como meu trabalho de curso.

Aos integrantes do grupo de pesquisa, Cris Rangel de Abreu, Douglas Mesadri Meher, Larissa de Andrade, Mariana Duarte Rangel Garcia, Rebecca Skalski Costa.

“Para mim todas as verdades são verdades de sangue”

F. Nietzsche

RESUMO

As doenças cardiovasculares são as causas mais comuns de óbitos no Brasil e no mundo. O desenvolvimento dessas doenças pode levar à obstrução de vasos e, quando medidas primárias não são suficientes para o tratamento, é necessária intervenção cirúrgica. Técnicas de revascularização, como a angioplastia, colocação de stent e enxerto vascular são utilizados quando a doença está mais desenvolvida. Os enxertos preferíveis são os autólogos, porém, quando não há disponibilidade de retirada deste material, recorre-se a enxertos heterólogos. Enxertos sintéticos, descelularizados e mistos são utilizados com o objetivo de diminuir a rejeição do receptor à prótese, a fim de evitar complicações como trombose, hiperplasia e infecções. O processo de descelularização tem se mostrado promissores na engenharia de tecidos, devido à possibilidade de manter uma matriz orgânica, mas retirando agentes antigênicos. Detergentes e agentes biológicos são utilizados para a remoção celular de tecidos para enxertia. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho é verificar a eficácia dos métodos enzimático e detergente para a descelularização de artérias, e suas respectivas validades como métodos para criação de enxertos biológico. **Métodos:** Consiste na extração de artérias de coelhos, com conseguinte descelularização dos vasos por dois protocolos distintos: utilizando o detergente Triton X-100 e utilizando tripsina, ambos complementados pela ação de endonucleases. A eficácia da descelularização será avaliada através de análise histológica, utilizando as colorações H&E, tricrômio de Masson e Picrosyrius red. **Resultados:** Encontramos ineficácia da descelularização por parte do método com detergente, porém descelularização quase total com a tripsina. A matriz extracelular se manteve em melhores condições no grupo descelularizado por Triton X, do que no grupo por enzimas. **Conclusão:** Nenhum método se mostrou bom o suficiente para ser utilizado na criação de enxertos biológicos, porém o método com tripsina se mostrou mais promissor.

Palavras-Chave: Bioprótese. Engenharia tecidual. Enxerto Vascular.

Abstract

The cardiovascular diseases are the most common cause of death in Brazil and in the world. Their pathogenesis is involved with the obstruction of the vessel's lumen and, when primary measures aren't enough for the treatment, surgical interventions are needed. Revascularization techniques, as angioplasties, stent allocation or by-passes with vascular grafts, are used when the disease advances. The preferable grafts are the autologous, but, when those aren't available, heterologous grafts are used. Synthetic grafts, decellularized and mixed are utilized to diminish the receptor's rejection to the prostheses, with the goal to avoid complications, such as thrombosis, hyperplasia and infections. The decellularization process has been showing itself promising in tissue engineering, due to the possibility of maintaining an organic matrix while removing antigenic agents. Detergents and biological agents are utilized to remove cells from the tissue used for grafts. **Objective:** The goal of this paper is to verify the efficacy of the detergent and enzymatic methods in decellularization, and their respective validities to create functional grafts. **Methods:** Consists in the extraction of bunny's arteries and their decellularization of the vessels with two different protocols: one utilizing a detergent, Triton X-100, and other utilizing an enzyme, trypsin. Both complemented with the action of endonucleases. To evaluate the efficacy of the decellularization we used histological analysis, utilizing three distinct colorizations, hematoxylin and eosin, Masson's trichrome and Picrosirius Red. **Results:** We found inefficacy to decellularize the arteries utilizing Triton X, but there was an almost total decellularization in the group decellularized by trypsin. The extracellular matrix kept better conditions in the group decellularized by Triton X, than the group decellularized by enzymes. **Conclusion:** None of the methods showed to be good enough to be used in the creation of vascular grafts, though the method with trypsin showed to be more promising.

Keywords: Bioprosthesis. Tissue Engineering. Vascular Grafts.

Lista de ilustrações

FIGURA 1 - COMPARAÇÃO DE REMANESCENTES ENDOTELIAIS E RESÍDUOS NUCLEARES NOS DIFERENTES GRUPOS, HE.	26
FIGURA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE CONTROLE E DESCELULARIZAÇÃO POR DETERGENTE NAS DIFERENTES COLORAÇÕES.....	27
FIGURA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE CONTROLE E DESCELULARIZAÇÃO POR ENZIMA EM TP2 NAS DIFERENTES COLORAÇÕES.....	27
FIGURA 4 - COMPARAÇÃO ENTRE CONTROLE E DESCELULARIZAÇÃO POR ENZIMA EM TP3 NAS DIFERENTES COLORAÇÕES.....	28
FIGURA 5 - COMPARAÇÃO ENTRE CONTROLE E DESCELULARIZAÇÃO POR ENZIMA EM TP1 NAS DIFERENTES COLORAÇÕES.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

AAA	Aneurisma da aorta abdominal
AVE	Acidente vascular encefálico
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doenças Cardiovasculares
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
ePTFE	Politetrafluoroetileno expandido
EV	Endovenoso
H&E	Hematoxilina e Eosina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
PBS	Phosphate buffered saline
PU	Poliuretano
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TnBP	tri-n-butil fosfato
UV	Ultravioleta

Sumário

1. Introdução	13
1.1. Objetivo.....	14
1.1.1. Objetivos Gerais.....	14
1.1.2. Objetivos Específicos	14
2. Revisão de Literatura	15
2.1. OS VASOS SANGUÍNEOS	15
2.2. DOENÇAS VASCULARES.....	15
2.2.1. Doença Arterial Coronariana	16
2.2.2. Doença Arterial Carotídea	17
2.2.3. Aneurisma de Aorta Abdominal	17
2.2.4. Doença arterial periférica	18
2.3. Enxerto Vascular	18
2.4. Descelularização	21
2.4.1. Descelularização por detergentes	22
2.4.2. Descelularização por enzimas	23
2.5. Recelularização	23
3. Materiais e Métodos	24
3.1. ANIMAIS	24
3.2. OBTENÇÃO DAS ARTÉRIAS PARA DESCELULARIZAÇÃO	24
3.3. DESCELULARIZAÇÃO	24
3.3.1. DESCELULARIZAÇÃO POR DETERGENTE	24
3.3.2. DESCELULARIZAÇÃO POR MÉTODO ENZIMÁTICO.....	25
3.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	25
4. Resultados	26
5. Discussão	29
6. Conclusão.....	31
Referências	32

1. Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) são as causas mais comuns de óbitos em todo o mundo, com uma incidência de mortalidade anual prevista a aumentar para 23,3 milhões de indivíduos até 2030. (1). Sendo que, nos Estados Unidos, mais de 60 milhões de pessoas sofrem desta desordem (1,2) e no Brasil, são responsáveis por 20% das mortes de pessoas com mais de 30 anos, correspondendo a 962.931 pessoas no ano de 2009. As causas cardiovasculares relacionadas à aterosclerose foram responsáveis por 193.309 mortes. Apesar de serem, ainda, a principal causa de óbitos no Brasil, seus casos fatais vêm diminuindo nos últimos anos, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, nos indivíduos acima de 60 anos (3).

Essas doenças levam a redução do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, uma nutrição insuficiente dos tecidos. Isso se dá pela obstrução nos vasos, na maioria das vezes causada por placas ateroscleróticas. As apresentações mais comuns envolvem doenças coronarianas, doenças cerebrovasculares, doença arterial periférica e trombose venosa profunda (4).

O tratamento dessas condições varia desde mudança de estilo de vida, com dietas e exercícios físicos, utilização de fármacos; até a necessidade de procedimentos cirúrgicos (4).

O desenvolvimento de procedimentos terapêuticos de revascularização continua sendo altamente relevante. Em casos complexos envolvendo doença aterosclerótica, tanto no miocárdio quanto doenças periféricas, o padrão ouro tem sido o enxerto vascular (2,5,6). As técnicas atuais de revascularização são a angioplastia, colocação de stent e o enxerto vascular (2). Aproximadamente 400 mil procedimentos de enxerto vascular na artéria coronária são realizados anualmente, somente nos Estados Unidos (4). Além disso, esses enxertos também são necessários para tratamento de doenças aneurismáticas, e, em alguns casos, até mesmo traumas (7).

A cirurgia de enxerto vascular majoritariamente envolve a utilização de vasos autólogos, como a veia safena e a artéria torácica interna. No entanto, esses vasos exigem procedimentos altamente invasivos, gerando grande morbidade e muitas vezes acabam sendo inutilizáveis, mesmo sendo considerados o padrão ouro para substituir vasos de pequeno diâmetro (menores de 6 mm). Cerca de 30% dos pacientes que necessitam de revascularização de não possuem um vaso autólogo que seja adequado (6). Ainda, 50% dos enxertos utilizando a veia safena acabam falhando no decorrer de 10 anos (4).

Como uma alternativa aos vasos autólogos, existem os enxertos sintéticos. Esses, por sua vez, têm mostrado resultados satisfatórios a longo prazo quando usados em artérias de diâmetro maior (acima de 8 mm). Entretanto, quando aplicados em artérias de pequeno diâmetro (inferior a 6 mm) apresentam limitações devido a baixas taxas de perviedade sendo associados a trombose como complicação (4). Os mais utilizados são os de politereftalato de etileno, conhecido comercialmente por Dacron, politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) e o poliuretano (PU) (7).

Dentre as complicações relacionadas aos enxertos vasculares estão a formação de trombos, hiperplasia da íntima, aterosclerose e infecções (4). Com o objetivo de

minimizar tais complicações, materiais sintéticos devem apresentar propriedades químicas e mecânicas semelhantes ao tecido nativo (8).

Visto que existem variadas limitações para esses procedimentos, o desenvolvimento de um novo modelo por meio de técnicas de engenharia de tecidos é uma opção com alto potencial para o futuro da cirurgia vascular, uma vez que é possível remodelá-lo fisiologicamente, reparar in vivo, sem a necessidade de enxerto autólogo (4).

O processo de descélularização se mostra potencialmente vantajoso para a aplicação em técnicas de engenharia de tecidos devido a arquitetura natural acoplada à sua diversidade biomolecular tanto em aspectos estruturais como funcionais (4). Há na atualidade uma ampla gama de técnicas que permitem obter um tecido acelular por meio de procedimentos químicos, físicos ou biológicos. Através da remoção do material celular antigênico é possível evitar reações do sistema imunológico minimizando, desta forma, possíveis complicações. Por meio deste processo, é possível ainda otimizar a estrutura e o desempenho mecânico da matriz extracelular (9). Além disso, a literatura revela ainda que tais propriedades mecânicas se mostram ideais para a aplicação em enxertos vasculares (4), o que caracteriza o procedimento como uma alternativa promissora.

1.1. Objetivo

1.1.1. Objetivos Gerais

A proposta do presente estudo é avaliar dois protocolos de descélularização por métodos diferentes, com o objetivo de validá-los e identificar o método mais eficaz para potencial enxerto biológico.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Verificar a remanescente celularidade nos vasos após a descélularização
- Verificar a qualidade da matriz extracelular dos vasos após a descélularização
- Avaliar se algum dos protocolos de descélularização utilizados teria como ser utilizado na criação de enxertos biológicos

2. Revisão de Literatura

2.1. OS VASOS SANGUÍNEOS

O vaso sanguíneo é um órgão formado por 3 tecidos diferentes, separados em camadas: túnica interna, ou íntima; túnica média; túnica adventícia ou externa. A camada interna é composta de tecido epitelial simples e lâmina basal. As células presentes nessa camada são metabolicamente ativas, com a capacidade de alterar o diâmetro vascular, controlar a ativação de plaquetas e controlar a passagem de substâncias para a túnica média (impedindo a passagem da maioria). A lâmina basal é formada principalmente de colágeno do tipo IV e de quantidades variáveis de fibras elásticas. Existe ainda uma camada de fibras elásticas chamada de membrana elástica interna, que tem o intuito de separar a túnica íntima da média(10).

A túnica média é composta principalmente de células musculares lisas, organizadas de modo concêntrico e unidas por tecido conjuntivo. A principal função das células musculares é permitir a vasodilatação e vaso constrição dos vasos e aumentar sua resistência contra a pressão intravascular. Motivo pelos quais essa túnica é muito mais desenvolvida nas artérias do que nas veias, já que essas têm menos necessidade de variação no diâmetro luminal e menores pressões no seu interior. As fibras colágenas, por sua vez, atuam como conexão entre as células musculares e são formadas principalmente por colágeno do tipo III com um pouco de tipo I e tipo IV(10).

Separada da túnica média por uma fina camada de fibras elásticas, a túnica adventícia tem como função criar uma bainha ao redor do vaso conectando-o com o corpo. Sua formação é de fibras colágenas, de tipo e proporção similares ao da túnica média, e de uma maior quantidade de fibras elásticas ao se aproximar da camada média. Também encontramos fibroblastos, macrófagos, os vasa vasorum, responsáveis por nutrir e levar oxigênio para as partes mais externas dos vasos, e nervos na camada externa(10).

2.2. DOENÇAS VASCULARES

As doenças cardiovasculares são a causa número um de mortes no mundo, sendo responsáveis por 30% dos óbitos no mundo, das quais, 80% são de doença arterial coronariana ou doença cerebrovascular. Entretanto, os novos tratamentos e políticas preventivas fez com que a mortalidade caísse 50% nos países de primeiro mundo, porém, o crescimento e envelhecimento da população levou ao aumento de 40% nas mortes por doenças cardiovasculares desde 1990 (1)

As doenças vasculares podem atingir artérias, veias e vasos linfáticos, de forma geral, prejudicando o fluxo sanguíneo e podendo causar estenose. As doenças arteriais podem ter como sintomas, dependendo da região que afetam: claudicação intermitente; dor em repouso (do tipo queimação ou aperto); alteração de temperatura; alteração da cor da pele, como palidez, cianose, eritrocianose, rubor e fenômeno de Raynaud; alterações tróficas, como queda de pelos, lesões ulceradas, edemas hemorrágicos, bolhas e gangrenas. É comum que as doenças artérias necessitem de

intervenção cirúrgica como tratamento, com a revascularização por enxertos vasculares ou criação de um by-pass (11).

2.2.1. Doença Arterial Coronariana

A doença arterial coronariana (DAC), isoladamente, é a causa de morte de 19% dos homens e 20% das mulheres no mundo(1). Foi a causa de 6 milhões de mortes nas populações americanas no ano de 2005 e estima-se que um em cada 30 pacientes com doença arterial coronariana morrem por ano(2).

A principal causa dessa patologia é a aterosclerose, gerando uma oclusão das artérias coronárias. A deposição das placas ateroscleróticas é uma reação a lesão ou infecção que altera a função do endotélio. Com isso há o acúmulo de gotículas de lipoproteínas na camada íntima das coronárias. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) permeiam o endotélio alterado e sofrem oxidação, o que atrai leucócitos para a região e a fagocitose da gordura acumulada abaixo do endotélio leva à formação de células espumosas. Essas, irão produzir lesões chamadas de faixa gordurosa, que será a primeira lesão observada na aterosclerose (2).

Em seguida, é desencadeando sinais que atraem células do músculo liso para o local, que irão produzir matriz extracelular, principalmente proteoglicanos e colágeno, assim há progressão da lesão, formando uma placa fibrosa que invade o lúmen do vaso. Dessa forma, a placa formada é composta por uma cápsula fibrosa e um núcleo lipídico, com alto potencial trombogênico. Essa oclusão da coronária gerada pela placa causa um desequilíbrio entre a demanda e o suprimento de oxigênio no miocárdio, isso irá provocar a sintomatologia da DAC. Os sintomas geralmente são desconforto subesternal, sensação de pressão, com irradiação para ombro, braço, dorso e mandíbula, comumente relacionados a refeições pesadas, estresse ou esforço, que após minutos é aliviado. Quando não tratado, pode evoluir para isquemia cardíaca, (2).

O tratamento e controle da doença arterial coronariana inclui estratégias não invasivas de prevenção primárias e secundárias e técnicas invasivas de revascularização, a colocação de stent de modo percutâneo e criação de um by-pass de artéria coronária por enxerto (6). A prevenção e controle não cirúrgico envolvem a mudança nos hábitos de vida, como mudança dietética, largar o tabagismo e adotar atividades físicas, o controle de hipertensão arterial e a utilização de medicamentos, como antiagregantes plaquetários e betabloqueadores (2). Entretanto, apesar das diversas estratégias de controle e de técnicas não invasivas, a realização do by-pass arterial continua sendo o tratamento padrão ouro para a doença arterial coronariana em pacientes complexos com lesões em múltiplos vasos, e é o tratamento mais utilizado até hoje. O enxerto utilizado pode ser de dois vasos diferentes, o com melhor resultados é a artéria mamária interna esquerda, os pacientes que recebem esse enxerto têm melhores prognósticos de sobrevivência, menos casos de eventos cardíacos futuros e mais de 90% das artérias se mantêm viáveis por mais de 10 anos. Já o vaso mais utilizado é a veia safena magna, porém entre 10% e 25% dos enxertos ocluem no primeiro ano e entre 40% e 50%, até 10 anos. Por esse motivo vem se estudando a possibilidade de múltiplas artérias serem utilizadas para enxerto, principalmente a artéria mamária direita e a artéria radial, porém eles ainda são pouco utilizados devido à dificuldade da coleta dos enxertos e

maior resistência da veia safena para manipulação durante a coleta e anastomose e menor chance de vaso espasmos (6).

2.2.2. Doença Arterial Carotídea

Corresponde ao estreitamento das artérias grandes do pescoço, em especial, da carótida interna e, assim como a DAC, está associada a formação de placas ateroscleróticas, e essa obstrução pode levar a um evento isquêmico. Quando há uma obstrução grande, pequenos pedaços da placa podem se romper e chegar ao cérebro, podendo causar uma perda de visão súbita, um evento isquêmico transitório ou um acidente vascular encefálico (AVE) (5).

O diagnóstico pode ser feito através da ausculta do pescoço, porém o som a ser identificado não necessariamente é exclusivo dessa patologia. A maneira mais simples de fazer esse diagnóstico é por meio do ultrassom Doppler (5).

O tratamento objetiva prevenir um AVE e pode ser feito através de medicações para estabilizar a placa, ou, em casos de obstrução mais severa, pode ser tratado cirurgicamente por meio de endarterectomia e angioplastia com a colocação de stent (5).

2.2.3. Aneurisma de Aorta Abdominal

O aneurisma da aorta abdominal (AAA) é definido como um aumento maior ou igual que 30 mm da aorta abdominal visto por ultrassom ou tomografia computadorizada, que afeta principalmente a parte infra renal da aorta (7). É uma manifestação de um processo sistêmico caracterizado por inflamação, apoptose de células musculares lisas e destruição do colágeno e elastina das camadas médias e adventícias (7,12). O processo inflamatório parece ser causado por reação do sistema imune contra a parede da aorta abdominal, os pacientes possuem elevação em citocinas, aumento de células T e B na parede da artéria e uma elevação nos níveis séricos de IL-6, sugerindo uma relação causal entre esta interleucina e o aneurisma de aorta abdominal (7).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de AAA são: a idade avançada acima de 60 anos, o sexo masculino em que a prevalência é 4 a 6 vezes maior do que no sexo feminino. Além disso, é mais comum de aparecer e de romper em tabagistas, 7 vezes mais do que em indivíduos não tabagistas. A raça caucasiana também apresenta maior prevalência. Pacientes com história familiar positiva, principalmente em familiares de primeiro grau; histórico de aneurismas em outros grandes vasos, como carótidas ou vasos de extremidades; comorbidades associadas a placas de aterosclerose, como DAC, doença cerebrovascular, HAS e hipercolesterolemia, também são importantes fatores de risco (12).

A apresentação clínica geralmente apresenta um sinal clássico que é uma massa pulsátil abdominal achada no exame físico, no entanto, se mostra com uma sensibilidade de 68% e uma especificidade de 75%, devido a interferência de alguns fatores, como obesidade, distensão da parede abdominal ou um aneurisma de tamanho pequeno. Muitos casos são achados incidentais em exames de imagens, visto que 66% a 75% dos AAA são assintomáticos. Nos casos em que há sintomatologia, geralmente é

associado a dor persistente no dorso, no abdome, na região de flanco ou na virilha. A tríade clínica que indica ruptura do aneurisma é formada por dor compressiva em abdome ou flanco, hipotensão e massa pulsátil (12).

O tratamento para ruptura de AAA atualmente consiste na cirurgia aberta ou endovascular. A cirurgia aberta é feita por laparotomia e envolve a colocação de um enxerto, comumente usando Dacron ou politetrafluoroetileno. A cirurgia endovascular é um método menos invasivo onde é colocado stents por meio de punções percutâneas na virilha, sendo essa a cirurgia de escolha na maioria dos países desenvolvidos. No entanto, o reparo endovascular possui falha de até 20% dos enxertos em excluir completamente o AAA da circulação (7).

2.2.4. Doença arterial periférica

A doença arterial periférica é uma estenose de artérias que irrigam os membros inferiores, pode ser desde a parte final da aorta, ilíacas, femoral e poplítea, que afeta 13% da população ocidental com mais de 50 anos. A origem da doença arterial periférica é a aterosclerose (13), uma condição sistêmica em que há acúmulo de gordura na camada íntima das artérias e posterior fibrose mediada por inflamação (2). Assim, os principais fatores de risco são as condições que predisõem para a formação das placas ateroscleróticas. O mais significativo é o tabagismo, metade de todas as doenças arteriais periféricas podem ser atribuídas ao tabagismo, seguido pela diabetes mellitus, altos níveis de colesterol sérico, hipertensão e doença renal crônica (13).

A maioria dos pacientes são assintomáticos, mas dentre os sintomáticos o sintoma mais comum é a claudicação intermitente, dor ao caminhar que faz com que o paciente precise parar para aliviar a dor e poder voltar a caminhar. A maioria dos pacientes com claudicação intermitente tem sintomas estáveis ou melhora dos sintomas depois de 5 anos do diagnóstico, mas cerca de 25% dos pacientes sintomáticos vão precisar de intervenção e menos de 5% vai progredir para isquemia crítica dos membros. Caso o paciente desenvolva isquemia, a sobrevida geral é pior do que na maioria dos cânceres (13).

Por isso, é importante o controle da doença antes que ela chegue neste ponto. Os tratamentos dos pacientes com claudicação intermitente consistem em mudanças nos hábitos de vida, como parar de fumar e controlar a diabetes, caminhadas supervisionadas e vasodilatadores, oxalato de naftidrofurila e Cilostazol. Nos pacientes com claudicação muito limitante, que não responderam ao tratamento clínico ou com isquemia de membros, o tratamento de escolha é a revascularização. A revascularização pode ser feita através da colocação de stent, ou angioplastia (13).

2.3. Enxerto Vascular

A enxertia vascular é um método de revascularização amplamente empregado, cuja finalidade consiste em substituir ou desviar um vaso previamente danificado ou ocluído. Consiste na alternativa terapêutica preferencial para pacientes que necessitam de soluções de revascularização do miocárdio a longo prazo (4). A principal doença em que os enxertos são empregados é a doença arterial coronariana. Ela pode ser tratada de forma farmacológica, por meio de betabloqueadores, agentes antiplaquetários e fator

de proliferação de fibroblastos do tipo 2. Ou ainda por meio de revascularização, com stents e angioplastia (2). Porém, apesar de a colocação de stents ser o procedimento mais comum para a revascularização miocárdica, o método com mais eficácia na revascularização é a ponte vascular, normalmente realizada com a veia safena ou artéria radial, criando uma ponte aorto-coronária, ou com a artéria mamária interna esquerda, sendo que ela é apenas anastomosada ao ponto pós-estenótico. Entretanto, a utilização desses aloenxertos encontra empecilhos, em primeiro lugar, muitas vezes é difícil encontrar um local viável da veia ou artéria para realizar o enxerto, já que o paciente com doença arterial coronariana costuma ter placas ateroscleróticas em outros vasos e a coleta de vasos do paciente pode levar a complicações pós-operatórias, como os altos índices de infecção externa nos pacientes que fazem pontes com ambas as mamárias internas (6).

Os enxertos vasculares podem ser de diversos tipos, autólogos, homólogos (aloenxertos), heterólogos (xenoenxertos) ou ainda podem ser produzidos de maneira sintética (8). Enxertos vasculares autólogos são originados a partir de artérias ou veias do próprio indivíduo. Artérias como artéria torácica interna ou radial apresentam resultados positivos na reconstrução arterial em termos de permeabilidade, porém, ambas apresentam limitações importantes quanto à disponibilidade e complicações associadas à remoção, o que impede que sejam a primeira escolha. O aloenxerto mais utilizado na prática é proveniente da veia safena e, apesar de representar o padrão ouro, o uso deste vaso apresenta menor taxa de perviedade demonstrando falhas de cerca de 50% em um período de 10 anos. Outro fator limitante para o uso de enxertos autólogos de maneira geral se refere à disponibilidade limitada pois podem ser de baixa qualidade e sua extração pode resultar em complicações para o doador (4).

Atualmente, os xenoenxertos bovinos preparados a partir da artéria carótida, veia mesentérica ou ureter desses animais têm sido utilizados para a construção de fístulas arteriovenosas para pacientes em hemodiálise e para vascularização da região femoro-poplítea. Dentre estes, os provenientes de artérias carótidas para fístulas arteriovenosas têm apresentado mais vantagens frente a sua disponibilidade, maior facilidade de implantação e adequação para o acesso pós-implantação. No entanto, limitações como baixas taxas de perviedade e complicações já descritas previamente têm limitado sua aplicação. Processos de descelularização incompleta têm sido associados a essas complicações devido a resposta imunológica do receptor, que pode levar a rejeição tendo como resultado a predisposição a formação de aneurismas, trombos e estenoses (8).

Os enxertos vasculares homólogos, também conhecidos como aloenxertos, são aqueles provenientes de indivíduos da mesma espécie do receptor. São utilizados, especialmente, quando há indisponibilidade de material autólogo. Podem ser provenientes de vasos criopreservados e são indicados quando há processo infeccioso, devido à baixa antigenicidade proporcionada pelo método. Atualmente, os enxertos criopreservados são utilizados na reconstrução arterial de locais previamente ocupados por próteses artificiais ou na preparação de fístulas arteriovenosas em pacientes submetidos a procedimento de hemodiálise. Apresentam baixas taxas de permeabilidade como fator limitante (8).

Ainda dentre os enxertos homólogos, segmentos de veia umbilical descelularizada também podem ser utilizados, a exemplo de revascularizações fêmoro-poplíteas e tibiais e na formação de fístulas arteriovenosas. Além disso, podem ser utilizados em reconstruções vasculares pós lesões traumáticas ou em situações de excisão de tumores abdominais. Em relação à aplicação na formação de fístulas arteriovenosas, não se apresentam superiores alternativas portanto não são muito utilizadas para esse fim. Quanto ao seu uso para revascularização, apresentam resultados semelhantes a próteses sintéticas e demonstram ser uma alternativa viável em relação a enxertos autólogos provenientes de veia safena (8).

Biomateriais sintéticos sozinhos ou associados a material orgânico também são uma opção para enxertos vasculares. O desenvolvimento do primeiro substituto sintético para vasos sanguíneos se deu na segunda metade do século XX. Este se baseou na produção de culturas de células endoteliais bovinas, células do músculo liso e fibroblastos em camadas de gel de colágeno sustentadas por uma malha constituída por politereftalato de etileno, conhecido comercialmente por Dacron (14). Além deste, outros dois biomateriais sintéticos passaram a ser comercializados, sendo eles o politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) e o poliuretano (PU) (8).

A fim de minimizar possíveis complicações, materiais sintéticos devem apresentar propriedades químicas e mecânicas semelhantes ao tecido nativo, sendo de fundamental importância que apresentem resistência à degradação e a trombose (8). O Dacron e o ePTFE apresentam resultados promissores devido à alta perviedade quando utilizados em artérias de grande diâmetro (> 8mm) como substitutos aorto-ilíacos bem como quando aplicadas em artérias de diâmetro médio (entre 6 e 8mm) como substitutos da artéria femoral comum ou carótídea. Já em relação a artérias de pequeno diâmetro (< 6mm) como artérias coronárias, infrainguinais e infrageniculadas, apresentam limitações devido a baixas taxas de perviedade apresentando trombose como possível complicação e, portanto, nestes casos, o uso de vasos autólogos se torna superior (4).

As complicações mais associadas ao uso de enxertos são, de maneira geral, associadas a trombose, hiperplasia da íntima, aterosclerose e infecção (15). A trombose decorre de danos ou ausência de células endoteliais autólogas que revestem o lúmen do enxerto, resultando em aderência de proteínas e ativação de mecanismos de coagulação. Já a hiperplasia da íntima pode ocorrer no vaso nativo ao redor da anastomose ou no vaso do enxerto e resulta da migração de células do músculo liso vascular, sua proliferação e deposição de matriz extracelular na região. A hiperplasia da íntima apresenta várias causas, sendo elas: incompatibilidade de conformidade entre o enxerto e o vaso nativo; incompatibilidade do diâmetro do vaso; danos ou falta de células endoteliais; concentrações de tensão na linha de sutura; trauma durante a cirurgia; fatores hemodinâmicos que causam distúrbios no fluxo sanguíneo (4).

A principal causa de falha de enxerto após o período de um ano decorre de aterosclerose, sendo resultante de processo semelhante ao que ocorre em vasos nativos. Processos infecciosos são mais comuns em próteses sintéticas devido a suscetibilidade à colonização por patógenos. A inflamação crônica resultante da infecção prévia traz complicações ao processo de cicatrização do enxerto e pode evoluir

para falha, ruptura da anastomose ou sepse. Tendo em vista as limitações apresentadas pelos atuais condutos de derivação vascular, o desenvolvimento de enxertos por meio de técnicas por engenharia de tecidos se apresenta como potencial alternativa para o tratamento vascular (4).

Pesquisas experimentais e clínicas tem se esforçado cada vez mais com o objetivo de obter uma prótese vascular sintética com as características ideais. O enxerto considerado ideal seria aquele que apresentasse todas as características que o tornassem mais duradouro e que se apresente da maneira mais próxima possível a um vaso natural (11). As características que definem um enxerto ideal são: apresentar fácil manuseio cirúrgico, biocompatibilidade com o receptor, livre de toxinas, não ter efeito imunogênico ou cancerígeno, boa perviedade, não trombogênico, boa integração com os tecidos subjacentes, não interferir na cicatrização, não induzir a formação excessiva de fibrose ou espessamentos dos tecidos no seu trajeto, ser durável, não estar sujeito a degenerações aneurismáticas, alongamentos ou acotovelamentos, ser complacente, flexível, elástico e resistente à compressão, ter tamanhos variados, adaptáveis a cada situação de artéria. Além disso, deve ser resistente às infecções, sendo possível sua esterilização sem perda de integridade, e, preferivelmente, deve ser de baixo custo (16).

Para minimizar as complicações, obtendo materiais biocompatíveis e de baixo potencial para desencadeamento de respostas imunogênicas e conseqüente inflamação crônica, têm sido desenvolvidos enxertos heterólogos livres de células, ou seja, que passam por um processo de descclularização, retirando os possíveis antígenos previamente à cirurgia de inserção do enxerto. Com o aperfeiçoamento da técnica, este método obtém resultados que se aproximam dos requerimentos para um enxerto ideal (17).

2.4. Descclularização

Os primeiros enxertos vasculares obtidos por meio de processos de descclularização foram desenvolvidos em 1960, através de tecido de origem animal (18). Desde então, numerosos órgãos e tecidos de bovinos, ovinos, macacos, porcos e coelhos, incluindo humanos têm sido investigados como potenciais fontes de matriz extracelular. Aorta, veia, bexiga, submucosa do intestino delgado, pele, ureter, fígado, membrana amniótica e tendão foram submetidos ao processo e obtiveram relativo sucesso (9).

Por meio do processo de descclularização é possível otimizar a estrutura e o desempenho mecânico da matriz extracelular evitando reações do sistema imunológico devido ao processo de remoção de material celular antigênico (9). A remoção do endotélio e de células musculares é especialmente importante, pois estas possuem os antígenos referentes aos complexos principais de histocompatibilidade classes I e II(10). A preservação dos componentes estruturais permite que a matriz gerada forneça integridade estrutural e força biomecânica para que o novo tecido possa se integrar e possibilita uma nova migração de células do tecido nativo e propagação eficiente (9).

Há na atualidade uma ampla gama de técnicas que permitem obter um tecido descclularizado seja por meios químicos, físicos ou biológicos. As técnicas podem envolver vários agentes químicos como ácidos e bases, soluções hipo/hipertônicas, detergentes iônicos e não iônicos ou extração com solventes (9). Além disso, pode

utilizar agentes biológicos tais como enzimas e agentes quelantes ou ainda métodos físicos por meio de agitação, pressão e abrasão. Atualmente, vários produtos de processos de descélularização tanto de origem humana como de origem animal estão disponíveis para diversas aplicações incluindo dérmica, tecidos moles, área cardíaca, oftalmológica e odontológica (4).

O procedimento para a remoção de células em geral contempla três etapas, as quais podem variar em metodologia, mas almejam os mesmos objetivos. A primeira etapa é a de inativação celular, nela, as células teciduais devem ser lisadas osmoticamente por solução hipotônica ou detergente. Na sequência, os ácidos nucleicos devem ser digeridos enzimaticamente ou por detergentes e são utilizados, ainda, métodos mecânicos para auxiliar nessa etapa. Por fim, é necessária a lavagem do tecido, com o objetivo de remover células e produtos químicos residuais(10).

O processo de descélularização se mostra potencialmente vantajoso para a aplicação em técnicas de engenharia de tecidos devido a arquitetura natural acoplada à sua diversidade biomolecular tanto em aspectos estruturais como funcionais. As propriedades mecânicas se mostram ideais para a aplicação em enxertos vasculares. À medida que o tecido descélularizado é implantado, há a liberação de substâncias pela matriz as quais apresentam capacidade mitogênica e quimiotáticas que atuam estimulando a migração de células hospedeiras auxiliando no processo de integração e remodelação do tecido implantado. No entanto, para obter um material biológico de qualidade é necessário que haja um compromisso entre a remoção do material celular antigênico e a manutenção da matriz extracelular, o que significa que técnicas inadequadas podem resultar em falhas nos implantes. Além disso, outra limitação se refere à geometria de tecidos pois o tamanho e forma do tecido disponível podem ser variáveis e apresentar restrições (4).

2.4.1. Descélularização por detergentes

A descélularização por detergentes é um dos métodos químicos possíveis, outros seriam o tratamento com ácido-base e soluções hipotônicas e hipertônicas. O modo como o detergente faz o processo de descélularização depende do seu tipo, no caso do Triton X-100, ele é um detergente não iônico que age desestabilizando as ligações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, tendo menos efeito nas interações de proteína-proteína, sendo, por isso, menos danoso para o tecido extracelular do que outros detergentes. Outros detergentes disponíveis seriam os iônicos, como o dodecil sulfato de sódio (SDS) e os detergentes zwitterionicos, que afetam as interações proteína-proteína e, portanto, são mais danosos para o tecido extracelular (19).

A descélularização por métodos detergentes já foi testada de diversas maneiras. Uma maneira que nos pareceu pertinente foi a utilizada por KUNA, XU e SUMITRAN-HOLGERSSON em vais safenas humanas(20). Uma vez retiradas as amostras, eles lavaram com tampão fosfato-salino (PBS, phosphate buffered saline) três vezes e dividiram o protocolo de descélularização em 3 etapas distintas. A primeira etapa constitui na perfusão e lavagem da veia com uma solução de Triton X-100; a segunda, na perfusão das amostras com uma solução de TnBP (tri-n-butil fosfato); a terceira, com uma perfusão de DNAase (20).

2.4.2. Descelularização por enzimas

A descelularização por métodos enzimáticos utiliza de diferentes enzimas para obter o resultado desejado, como nucleases, proteinases, lipases, dispases e α -galactosidase. Muito comumente essas enzimas são combinadas para um melhor resultado, sendo que o uso de nucleases é muito comum e costuma ser combinado até mesmo com outros métodos de descelularização, já que o DNA é de difícil retirada do tecido extracelular, pois tem uma capacidade de grudar às suas proteínas. A enzima mais utilizada para a descelularização por método enzimático é a tripsina, isso se deve à sua menor atividade no colágeno do tipo I. Ela possui uma maior taxa de descelularização do que as lipases, porém menor do que a dispase (enzima capaz de quebrar a fibronectina). A sua vantagem em relação a dispase, entretanto, é a limitada resistência do colágeno à tripsina, ou seja, se utilizada por um tempo limitado a tripsina conserva melhor o tecido extracelular do que a dispase (19).

Para a utilização da tripsina é necessário, para sua máxima atividade, um pH=8, 37°C e um agente quelante, geralmente utilizado o ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) (19).

2.5. Recelularização

A recelularização consiste na deposição de novas células sobre o tecido descelularizado. O procedimento pode ocorrer *in vitro*, utilizando meio de cultivo adequado e células próprias do receptor do enxerto, ou *in vivo*, este segundo se dando juntamente ao processo de recuperação do paciente. É importante, portanto, durante a descelularização, que a matriz extracelular seja preservada ao máximo, pois componentes como elastina, colágeno e fibrina precisam estar presentes para suportar a deposição de novas células (4,16,17). Após a endotelização, a preservação do endotélio é fundamental para o sucesso do enxerto, visto que ele forma uma barreira que limita a entrada de células inflamatórias, evitando que plaquetas sejam atraídas para o local e que ocorra trombose na área danificada, além evitar a proliferação de fibras musculares lisas. Esses dois eventos podem causar hiperplasia da íntima, ocluindo e inutilizando o vaso (9).

3. Materiais e Métodos

3.1. ANIMAIS

Foi selecionado 1 coelho macho da espécie *New Zealand* (6 meses de idade, pesando entre 2 e 2,5 kg) para obtenção de artérias carótidas, aorta abdominal e cajado da aorta junto com a aorta torácica. Estes animais serão obtidos de um criador particular e mantidos pelo Instituto de Pesquisas Médicas (IPEM) da FEMPAR. Os animais serão mantidos de acordo com padrões de criação sanitários convencionais, ciclo luz-escuridão de 12 em 12 horas, com alimentação similar para todos os animais, constituída de ração comercial sólida, apropriada à idade e peso dos animais e água *ad libitum*; além de permanecerem, durante todo o período, em ambiente silencioso, com temperatura ambiente aproximada de 20-28°C, em caixas plásticas individuais, de 47x34x18 cm, forradas com maravalha.

3.2. OBTENÇÃO DAS ARTÉRIAS PARA DESCELULARIZAÇÃO

Para a obtenção dos enxertos biológicos os coelhos foram medicados com midazolam 1-2 mg/kg e eutanasiados com 30 mg/kg de propofol EV. Após 15 minutos da eutanásia foi feita a tricotomia da região cervical e torácica, assepsia com clorexidina solução alcoólica e em seguida a incisão cervical e torácica mediana para a obtenção dos enxertos. Os enxertos extraídos foram a aorta abdominal, aorta torácica e cajado da aorta, carótidas, ventrículo esquerdo e ventrículo direito.

Após retirados os vasos, eles foram lavados com soro fisiológico e 5 vezes com PBS, em uma câmara biológica após luz UV ligada por 1 hora. Eles foram, então, transferidos para potes estéreis de 100 ml e 50 ml, contendo as soluções descelularizantes. Como controle, um segmento de aorta abdominal, aorta torácica e carótida comum foram mantidos em solução de PBS mais antibiótico sem passar pelo processo de descelularização.

3.3. DESCELULARIZAÇÃO

3.3.1. DESCELULARIZAÇÃO POR DETERGENTE

A solução com detergente foi feita da seguinte maneira: 0,1 ml de Triton-X 100 (Neon, BR) 0,25%; 0,1 ml de Tri-n-butil fosfato (TnBP) (Dinâmica, BR) 0,25%; 0,008 ml de EDTA 0,02%; 39,792 ml de PBS; 0,2 ml de antibióticos (penicilina 0,5%, estreptomicina 0,5% e anfotericina B 0,5%), totalizando 40 ml de solução. Após a divisão dos enxertos, eles foram incubados em banho maria a 37°C sob agitação contínua.

Após 48 horas de incubação as amostras foram retiradas do banho maria e lavadas 3 vezes com PBS em cada amostra. Foram então colocados em solução de endonucleases, contendo DNAase I 50 U/μL (Thermo Scientific, Lituânia) e RNAase A 10 U/μL (Thermo Scientific, Lituânia), à base de PBS com adição de 0,5% de solução antibiótica, e deixadas sob agitação constante a 37°C por 3 horas.

No dia seguinte foram feitas lavagens em 3 horários nos vasos. Todas as vezes foram feitas 3 lavagens nas amostras, trocadas as soluções contendo PBS e antibiótico e as

amostras foram mantidas sob agitação constante e a 25°C nos intervalos. Após a última lavagem as amostras foram armazenadas a 4°C em solução com PBS e antibiótico.

3.3.2. DESCELULARIZAÇÃO POR MÉTODO ENZIMÁTICO

Para a descelularização por método enzimático foi utilizada uma solução de 0,04 ml de tripsina (Dinâmica, BR) 0,1%, 0,08 ml de EDTA 0,02% e 40 ml de PBS. A descelularização enzimática foi dividida em 3 potes e incubadas em banho maria a 37°C sob agitação contínua.

- pote TP 1: 2 segmentos de 0,5 cm de aorta abdominal, em 10 ml de solução.
- pote TP 2: 4 segmentos de 0,5 cm de aorta torácica, em 10 ml de solução.
- pote TP 3: segmentos de 0,5 cm de carótidas comuns, em 10 ml de solução.

Após 24 horas de incubação as amostras foram retiradas e lavadas 3 vezes com PBS. Após a lavagem, TP1, TP2 e TP3 foram colocados em uma solução de endonucleases à base de PBS e antibióticos, contendo DNAase I 50 U/μL (Thermo Scientific, Lituânia) e RNAase a 10 U/μL (Thermo Scientific, Lituânia), e mantidas sob agitação constante a 37°C. Após duas horas na solução de endonucleases, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e depois armazenadas em uma solução de PBS mais antibióticos a 4°C.

3.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a análise histológica as amostras foram fixadas em formalina 10% e seguiu-se a técnica histológica para fazer as lâminas em três colorações, hematoxilina e eosina, Pricosirius red e tricrômico de Masson. As amostras foram lavadas com água destilada, desidratadas com graduações de etanol, embebidas em parafinas, cortadas em seções de 5 – 8 μm e coradas.

A coloração H&E foi utilizada para avaliar a celularidade das amostras. O tricrômico de masson, para avaliar o tecido conjuntivo e, principalmente, as fibras musculares. O red Pricosirius, para a avaliação do colágeno nas amostras. Para esta coloração as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas com graduações alcoólicas, então embebidas em solução de Pricosirius red por uma hora e siruis red em ácido pícrico saturado, seguidas por duas lavagens com ácido acético 0,5%, sem corante de contraste. Nessa coloração, as fibras colágenas do tipo I são vistas com coloração laranja-amareladas e as fibras do tipo III de coloração esverdeada.

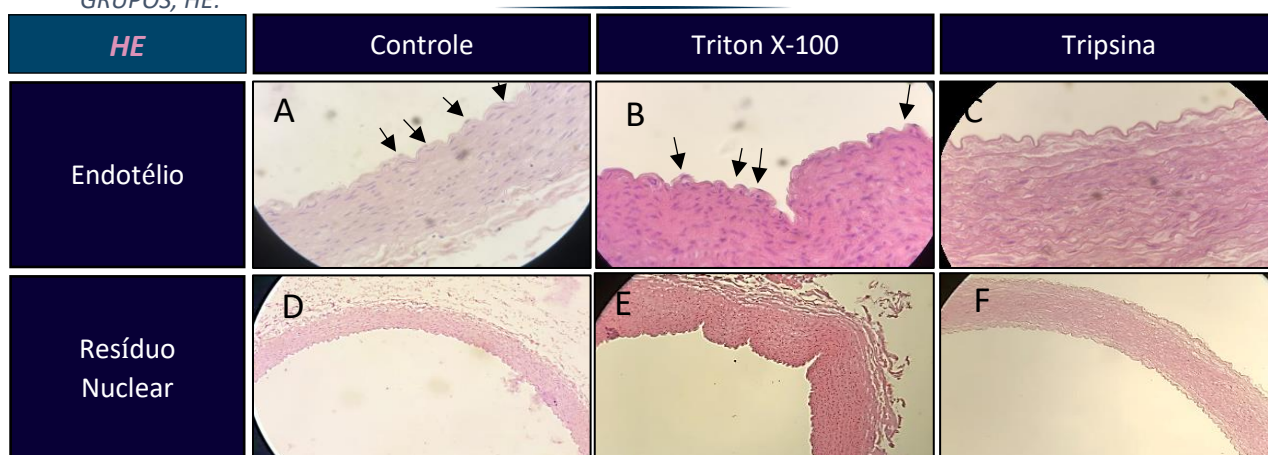
4. Resultados

No grupo controle observou-se presença de células endoteliais e de resíduos nucleares em todas as camadas arteriais, em toda a extensão de sua área e em todas as amostras (Fig. 1A). A matriz extracelular do grupo controle foi bem preservada, tanto a lâmina elástica, a lâmina média, com alta densidade de fibras colágenas e permanência do formato circular da artéria, quanto a lâmina externa.

No grupo em que se utilizou do detergente Triton-X, observou-se no H&E remanescentes nucleares e presença de algumas células endoteliais em menor número do que o controle, indicando que a descélularização completa não ocorreu ao se utilizar Triton-X 100 1% por 48h (Fig. 1 e 2). Ao analisar a integridade da matriz extracelular por H&E, revelou-se boa densidade de fibras colágenas na lâmina média, assim como da elástica e adventícia. As colorações de Tricrômico de Masson e Sirius Red mostraram a presença de lâminas arteriais. Observou-se, porém, que nestas amostras os vasos perderam seu formato circular e foram distorcidos (Fig. 2).

Nas peças descélularizadas por tripsina encontramos que a maior parte das células endoteliais foram removidas, permanecendo uma pequena quantidade em regiões isoladas (Fig. 1). Quanto aos resíduos nucleares, foram encontradas regiões totalmente descélularizadas, porém permaneceram resíduos concentrados em regiões específicas, principalmente na porção média da camada média. Isso pode ser mais visto em TP3 (Fig. 5), em que foram observados resíduos nucleares concentrados em quadrantes opostos, o superior direito e inferior esquerdo, porém remoção total nos outros quadrantes. Em TP2 (Fig. 3) foi o grupo em que foi observada uma melhor descélularização, com remanescentes apenas em uma camada que se restringiu à espessura de uma célula no meio da lâmina média. Em relação à matriz extracelular, observamos uma menor densidade de fibras colágenas em comparação com as amostras de Triton-X e o grupo controle. Houve, também, a presença de algumas fendas na estrutura, porém em pequena quantidade e não presente em todas as seções.

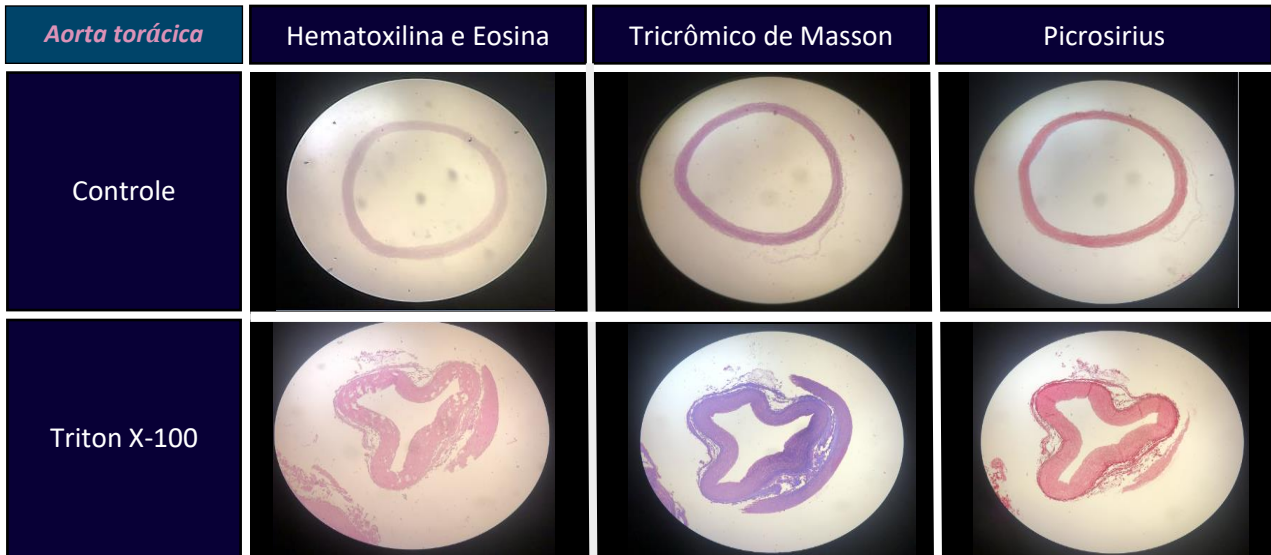
FIGURA 1 - COMPARAÇÃO DE REMANESCENTES ENDOTELIAIS E RESÍDUOS NUCLEARES NOS DIFERENTES GRUPOS, HE.



FONTE: O autor (2022)

LEGENDA: A) Endotélio do grupo controle B) Endotélio do grupo Triton X C) Endotélio do grupo tripsina D) Resíduos nucleares do controle E) Resíduos nucleares do grupo Triton X F) Resíduos nucleares do grupo tripsina

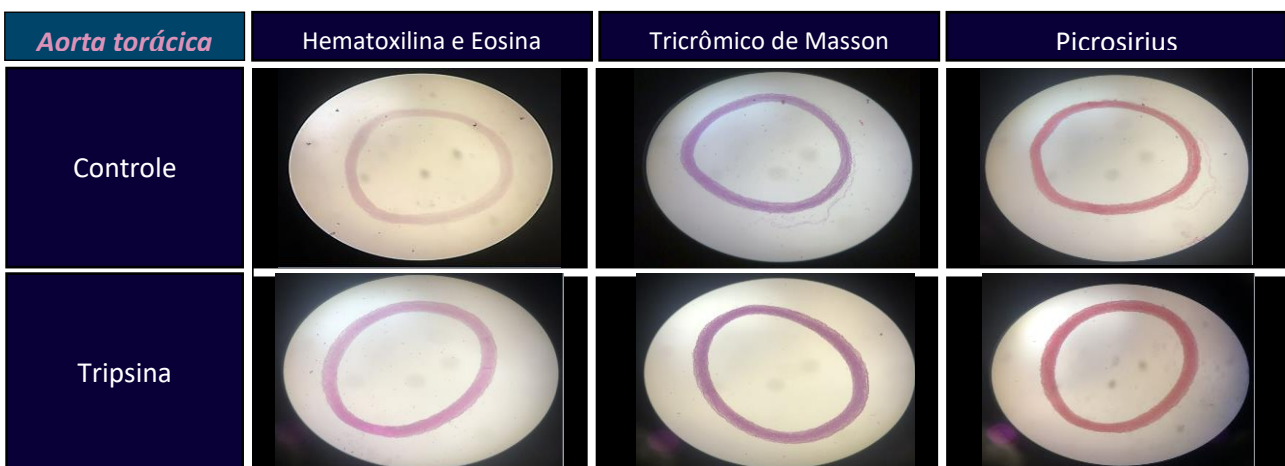
FIGURA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE CONTROLE E DESCELULARIZAÇÃO POR DETERGENTE NAS DIFERENTES COLORAÇÕES.



FONTE: O autor (2022)

LEGENDA: A descelularização se mostrou quase não ocorreu neste grupo. Observa-se a deformação no formato da artéria.

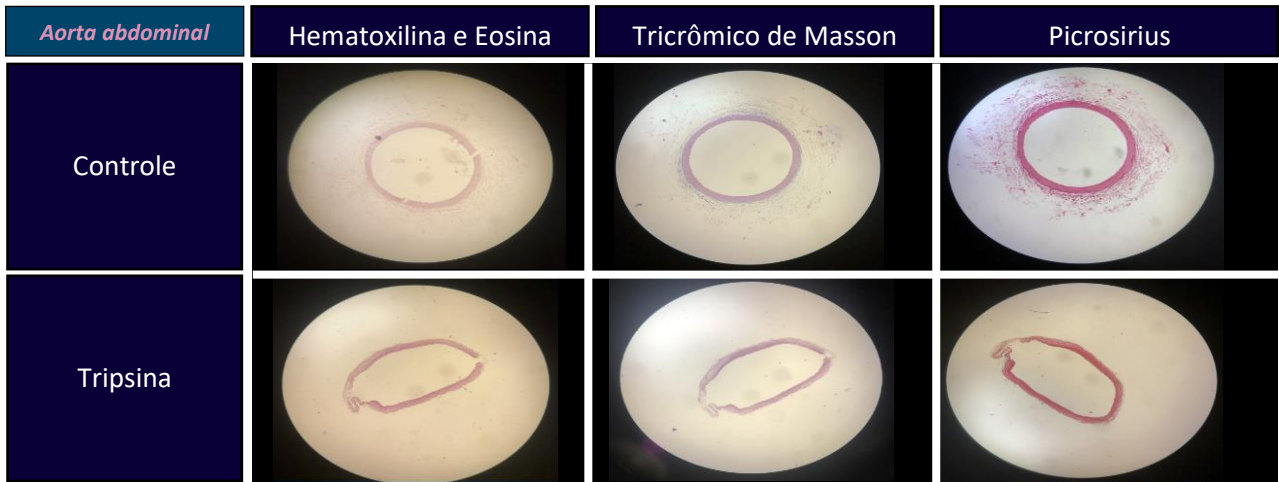
FIGURA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE CONTROLE E DESCELULARIZAÇÃO POR ENZIMA EM TP2 NAS DIFERENTES COLORAÇÕES.



FONTE: O autor (2022)

LEGENDA: TP2 do grupo descelularizado por tripsina. A descelularização foi quase completa e a artéria manteve seu formato e matriz extracelular em boa qualidade.

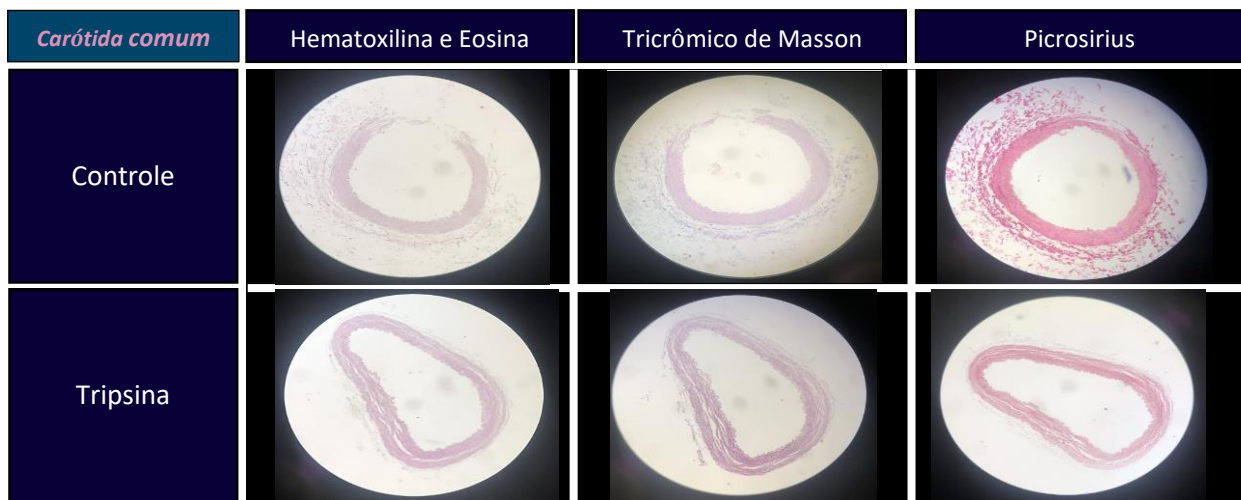
FIGURA 4 - COMPARAÇÃO ENTRE CONTROLE E DESCELULARIZAÇÃO POR ENZIMA EM TP3 NAS DIFERENTES COLORAÇÕES.



FONTE: O autor (2022)

LEGENDA: TP3 do grupo descelularizado por tripsina. Encontramos regiões não descelularizadas e fissuras na artéria

FIGURA 5 - COMPARAÇÃO ENTRE CONTROLE E DESCELULARIZAÇÃO POR ENZIMA EM TP1 NAS DIFERENTES COLORAÇÕES.



FONTE: O autor (2022)

LEGENDA: É possível ver regiões concentradas de resíduos nucleares e uma maior desintegração das fibras da matriz extracelular.

5. Discussão

O grupo de amostras que passaram pelo método de descclularização por detergentes mostrou uma grande quantidade de resíduos nucleares, mostrando que a utilização de Triton X-100 1% por 48h foi incapaz de realizar a descclularização. Nossos achados diferiram em certo grau da literatura, já que alguns autores obtiveram sucesso na descclularização, porém com diferentes métodos ou diferentes materiais a serem descclularizado. Olausson M et al, obteve sucesso na descclularização utilizando das mesmas concentrações de Triton X-100 que nós utilizamos, porém ele realizou 7 ciclos de descclularização em valvas(21). Além de que outros autores obtiveram resultados na descclularização em valvas com concentrações menores de Triton X-100 (22,23). Dessa forma, não está claro se a diferença no resultado é decorrente do maior tempo que o material passou pelo processo de descclularização ou pela diferença nas qualidades do material a ser descclularizado, já que as composições das valvas e de vasos são diferentes.

Em relação à preservação da matriz extracelular, encontramos boa densidade de fibras colágenas e sua integridade, assim como da lâmina elástica e adventícia e as colorações de tricrômico de Masson e Sirius Red mostraram a preservação das lâminas arteriais. Esses achados são condizentes com o que foi encontrado na literatura. Entretanto, o formato circular dos vasos foi perdido e se isso foi causado pelo processo de descclularização ou pela técnica histológica ainda deve ser investigado.

O grupo descclularizado por tripsina, por sua vez, obteve uma descclularização quase completa, em especial TP2, que apresentou apenas uma camada de uma célula de resíduos nucleares no meio da camada média. Os achados na literatura mostram que é possível a descclularização pelo método de tripsina, sendo que um deles utilizou metodologia quase idêntica (16) e outro manteve a amostra em incubação por 48h, porém resultou em danos à matriz extracelular (24). Os vasos com porções descclularizadas e porções com concentração de resíduos nucleares mostrou que um problema no método com tripsina é a penetração do agente no vaso. Assim, um método com perfusão pode ser mais eficaz do que a simples incubação com agitação.

A presença de fissuras na matriz pode ter sido causada por técnica histológica, apesar de que outros autores também obtiveram resultados com fissuras na matriz, indicando que talvez seja um problema com o método utilizado. A amostra de aorta abdominal, entretanto, não teve fissuras, indicando que vasos de maior diâmetro podem obter melhores resultados.

PERSPECTIVAS

O principal problema encontrado na descclularização por tripsina foi uma baixa perfusão do agente na artéria, dessa forma, um método de perfusão ativa deve ser testado para a descclularização do enxerto. Além disso, um número maior de amostras pode trazer resultados mais conclusivos quanto a integridade da matriz extracelular.

Para melhor avaliar a qualidade do enxerto, também, são necessários outros métodos de avaliação da integridade estrutural e reação inflamatória. Assim, em trabalhos futuros procuraremos avaliar a força biomecânica das amostras, através de

testes de força, e a reação inflamatória que elas causam, implantando os enxertos em ratos e verificando sua posterior fibrose.

6. Conclusão

Entre os dois métodos utilizados para a descelularização, o que obteve melhores resultados foi a descelularização por tripsina. Esse método mostrou a retirada quase total da celularidade em TP2, em comparação com o grupo descelularizado por Triton X-100, que quase não obteve diferenças quanto à celularidade em relação ao controle. Um método de perfusão utilizando tripsina pode vir a ser eficiente na descelularização total da amostra.

Quanto à matriz extracelular, ela ficou em melhor estado nos grupos descelularizado por método detergente, com melhor integridade, maior densidade de fibras colágenas e sem fissuras. Em comparação com o método enzimático, que produziu fissuras em um dos grupos de amostras. Apesar disso, o método enzimático não causou grandes danos à matriz extracelular.

Em relação à sua viabilidade como enxerto biológico, nenhum dos métodos utilizados poderia ser utilizado na criação de enxertos biológicos, já que nenhum deles conseguiu realizar uma descelularização completa da amostra. Entretanto, o método enzimático se mostrou mais promissor para esse fim, já que obteve melhores resultados em relação à descelularização. Pequenas alterações podem ser suficientes para obter uma descelularização total.

Referências

1. Lennon RP, Claussen KA, Kuersteiner KA. State of the Heart: An Overview of the Disease Burden of Cardiovascular Disease from an Epidemiologic Perspective. *Primary Care - Clinics in Office Practice* [Internet]. 2018;45(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.11.001>
2. Malakar AK, Choudhury D, Halder B, Paul P, Uddin A, Chakraborty S. A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):16812–23.
3. Mansur A de P, Favarato D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2012 ago [citado 2022 out 13];99(2):755–61. Available from: <http://www.scielo.br/j/abc/a/CLG9bTSVkjBDdG5CYsrN7By/?lang=pt>
4. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F. The tissue-engineered vascular graft - Past, present, and future. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016;22(1):68–100.
5. Ratchford E v., Evans NS. Carotid artery disease. *Vascular Medicine (United Kingdom)*. 2014;19(6):512–5.
6. Caliskan E, de Souza DR, Böning A, Liakopoulos OJ, Choi YH, Pepper J, et al. Saphenous vein grafts in contemporary coronary artery bypass graft surgery. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(3):155–69.
7. Golledge J. Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2019;16(4):225–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-018-0114-9>
8. Alexandre NML. Aplicação de enxertos vasculares artificiais de celulose bacteriana num modelo animal. PQDT - Global [Internet]. 2014;337. Available from: https://manchester.idm.oclc.org/login?url=https://search.proquest.com/docview/1914884685?accountid=12253%0Ahttp://manfe.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/44MAN/44MAN_services_page?genre=dissertations+%26+theses&atitle=&author=Alexandre%2C+Nuno+Miguel+Lour
9. Piterina A v, Cloonan AJ, Meaney CL, Davis LM, Callanan A, Walsh MT, et al. ECM-Based Materials in Cardiovascular Applications: Inherent Healing Potential and Augmentation of Native Regenerative Processes. *OPEN ACCESS Int J Mol Sci* [Internet]. 2009;10:4376. Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
10. SQUILLACE D. *Wo* 2007/070301 a2 (81). 2007;2007(June).

11. Thomaz JHC. Fundamentos da cirurgia vascular e angiologia. São Paulo: Byk; 1997. 646
12. Ullery BW, Hallett RL, Fleischmann D. Epidemiology and contemporary management of abdominal aortic aneurysms. *Abdominal Radiology* [Internet]. 2018;43(5):1032–43. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00261-017-1450-7>
13. Morley RL, Sharma A, Horsch AD, Hinchliffe RJ. Peripheral artery disease. *BMJ* (Online). 2018;360(February):1–8.
14. Ravi S, Chaikof EL. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regenerative Med* [Internet]. 2010 jan [citado 2022 out 16];5(1):107. Available from: </pmc/articles/PMC2822541/>
15. Eslami MH, Gangadharan SP, Belkin M, Donaldson MC, Whittemore AD, Conte MS. Monocyte adhesion to human vein grafts: A marker for occult intraoperative injury? *J Vasc Surg*. 2001;34(5):923–9.
16. Bader A, Steinhoff G, Haverich A. Tissue engineering of vascular grafts: Human cell seeding of decellularised porcine matrix. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2000;19(4):381–6.
17. Yuan H. Sci-Hub | Review: strategies in cell-free tissue-engineered vascular grafts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* | 10.1002/jbm.a.36825 [Internet]. *Journal of Biomedical Material Research*. 2019 [citado 2022 ago 24]. p. 426–45. Available from: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1002/jbm.a.36825>
18. Rosenberg N, Martinez A, Sawyer PN, Wesolowski SA, Postlethwait RW, Dillon ML. Tanned collagen arterial prosthesis of bovine carotid origin in man. Preliminary studies of enzyme-treated heterografts. *Ann Surg* [Internet]. 1966 [citado 2022 out 16];164(2):247–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5950359/>
19. Chen G, Kawazoe N. Decellularization Techniques for Preparation of Decellularized Extracellular Matrices in Tissue Engineering Applications. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2019;1–15.
20. Kuna VK, Xu B, Sumitran-Holgersson S. Decellularization and recellularization methodology for human saphenous veins. *Journal of Visualized Experiments*. 2018;2018(137):1–8.
21. Olausson M, Patil PB, Kuna VK, Chougule P, Hernandez N, Methe K, et al. Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: A proof-of-concept study. *The Lancet* [Internet]. 2012;380(9838):230–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60633-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60633-3)

22. Dijkman PE, Driessen-Mol A, Frese L, Hoerstrup SP, Baaijens FPT. Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts. *Biomaterials* [Internet]. 2012;33(18):4545–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.015>
23. Ye X, Zhao Q, Sun X, Li H. Enhancement of mesenchymal stem cell attachment to decellularized porcine aortic valve scaffold by in vitro coating with antibody against CD90: a preliminary study on antibody-modified tissue-engineered heart valve. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2009 jan 1 [citado 2022 out 13];15(1):1–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18759669/>
24. Liao J, Joyce EM, Sacks MS. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. *Biomaterials* [Internet]. 2008 mar [citado 2022 out 16];29(8):1065–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18096223/>