

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rafaella de Souza Salomão Zanette

**PRODUÇÃO DE MATRIZES BIOLÓGICAS A PARTIR DE
VALVAS CARDÍACAS DE SUÍNOS E RECELULARIZAÇÃO COM
CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTÁRIA HUMANA**

Juiz de Fora – MG

2016

RAFAELLA DE SOUZA SALOMÃO ZANETTE

**PRODUÇÃO DE MATRIZES BIOLÓGICAS A PARTIR DE
VALVAS CARDÍACAS DE SUÍNOS E RECELULARIZAÇÃO COM
CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTÁRIA HUMANA**

Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas na área de Genética e
Biotecnologia

Orientador: Professor Doutor Carlos Magno da Costa Maranduba

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando de Sá Silva

Juiz de Fora - MG

2016

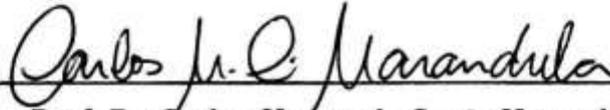
RAFAELLA DE SOUZA SALOMÃO ZANETTE

**Produção de matrizes biológicas a partir de valvas cardíacas de suínos e
recelularização com Células Tronco da Polpa Dentária humana**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 25 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



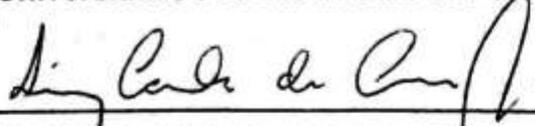
Prof. Dr. Fernando de Sá Silva

Universidade Federal de Juiz de Fora – G.V.



Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Luiz Carlos de Caires Júnior

Universidade de São Paulo

**Aos meus pais, Marcos e Giselle
Ao meu irmão Marcos Vinícius
À minha avó Eliane e Bisavó Gigi**

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação e seu corpo docente pelo aprendizado e oportunidade de realização deste projeto.

À Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de Juiz de Fora (PROPESQ/UFJF) pelo apoio financeiro, que permitiu a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao professor Dr. Carlos Maranduba por dedicar seu tempo e seus saberes a mim, e pela oportunidade e confiança para que eu desenvolvesse esse trabalho com sua orientação e amizade.

Ao professor Dr. Marcelo que esteve sempre disposto a me ajudar, não há palavras suficientes para agradecer.

À professora Dra. Michele por toda a disponibilidade, conhecimento e vontade em ajudar.

Aos professores Drs. Lyderson, José Marcello e Saulo por todos os conhecimentos e ideias compartilhados. A todos os outros professores que dedicaram um pouco do seu tempo para me ensinar um pouco.

Aos amigos do Laboratório pela parceria e cooperação que fazem o trabalho em grupo não apenas dar certo, mas ser divertido e prazeroso, em especial a Dani, Ju, Sirlei, Vinícius e Leo pela companhia, pela troca de ideias e pela amizade de vocês, essenciais para esta conquista.

Ao Genetec, por fazer parte desse grupo, pois ciência não se faz sozinho.

Aos integrantes do Laboratório de Análise de Glicoconjugados, em especial à ao Prof. Dr. Jair e a aluna Camila, por estarem sempre prontos a ajudar.

Aos integrantes do Laboratório de Imunologia, em especial o Erick, por disponibilizarem alguns equipamentos.

À minha amiga Izabela pela parceria de todas as horas e por sempre me apoiar.

Aos meus pais Marcos e Giselle por não medirem esforços para me permitir ir mais longe.

Ao meu irmão Marcos Vinícius pelo companheirismo.

A minha avó Eliane e minha bisavó Gigi por serem as detentoras do melhor colo do mundo.

A toda minha família, que está sempre comigo.

Ao meu namorado Rafael, amigo e companheiro, por me acalmar nos momentos de desespero. À sua família, em especial, à Marli, pelo carinho e por estar sempre de braços abertos para me receber em sua casa.

Aos presentes na banca, o meu sincero agradecimento.

À Deus, por colocar as coisas sempre nos lugares certos.

RESUMO

O coração é um órgão vital, que bombeia o sangue permitindo a sua circulação pelo corpo. A valva aórtica, e as suas estruturas de apoio ventriculares, formam a peça central do coração. Todas as câmaras do coração estão relacionadas diretamente à valva e seus folhetos são incorporados diretamente no esqueleto cardíaco. Falhas dos folhetos aórticos são as mais comuns entre as doenças relacionadas às valvas do coração, tendo como consequência o impacto negativo na vida do paciente, bem como nas despesas dos sistemas de saúde em todo o mundo. O desenvolvimento de materiais capazes de substituir com eficácia o tecido danificado da valva aórtica é de grande interesse na medicina regenerativa e engenharia de tecidos. As valvas mecânicas e biológicas têm sido amplamente estudadas, mas várias questões relacionadas com a integração ao hospedeiro ainda não foram resolvidas. Promissores protocolos para descelularização de tecidos de valva cardíaca têm sido investigados como uma alternativa para a preparação do material de substituição e para ser empregado como um substrato para a recelularização da matriz. No entanto, alguns protocolos de descelularização utilizados hoje em dia têm algumas limitações, uma vez que ainda não existe um método que permita a descelularização e ao mesmo tempo mantenha a estrutura da matriz extracelular para a posterior recelularização, evitando a rejeição após a implantação e futura substituição da prótese. Assim, o presente trabalho visa a obtenção de uma matriz biológica que satisfaça esses requisitos, por meio da descelularização dos folhetos aórticos de suínos e sua recelularização com células-tronco da polpa dentária humana. Foram testados três protocolos de descelularização, sendo que os protocolos que utilizaram tripsina foram reprodutíveis e forneceram matrizes com menor quantidade de DNA, quando comparados com o protocolo que utilizou apenas detergente e não foi reprodutível. As células-tronco podem ser isoladas de dentes decíduos (SHEDs) humanos e pesquisas apontam sua importância na medicina regenerativa visando à reconstrução de folhetos aórticos. Nesse trabalho, as SHEDs foram obtidas e caracterizadas fenotipicamente, sendo positivas para marcadores mesenquimais e embrionários e negativas para marcadores hematopoiéticos, além de apresentarem, *in vitro*, potencial de diferenciação osteogênica. Tais células foram então cultivadas em placas de petri com as matrizes descelularizadas, porém não houve sucesso na recelularização. Para tentar contornar esse problema, foi construído um biorreator a fim de aumentar a eficiência da recelularização do tecido, no entanto os resultados estão sendo testados. Vários pontos ainda devem ser abordados a fim de superar os obstáculos da técnica de descelularização do tecido para obter sucesso na recelularização.

Palavras-chave: Valva aórtica, folheto aórtico, matriz biológica, bioengenharia, células-tronco.

ABSTRACT

Heart is a vital organ that pumps blood allowing its circulation through the body. The aortic valve and their ventricular support structures form the centerpiece of the heart. All chambers of the heart are directly related to the valve, and its leaflets are directly incorporated into the heart skeleton. Amongst heart valves diseases, failures in the aortic leaflets are the most common ones, leading to negative impacts on patients' life, as well as increases on the costs for health systems worldwide. For regenerative medicine and tissue engineering, the development of materials capable of effectively replace damaged aortic valve tissue is of great interest. The mechanical and biological valves have been widely studied, but several issues related to integration to the host have not yet been resolved. Promising decellularization protocols for tissue heart valve have been investigated as an alternative for the preparation of replacement material and to serve as a substrate for matrix repopulation. However, some of the decellularization protocols used today have some limitations, since until now there is still no method which can achieve a complete decellularization while maintaining the structure of extracellular matrix for later repopulation, avoiding rejection after implantation and future replacement of the prosthesis. Thus, the present work aims at obtaining a biological matrix that satisfies such requirements through the decellularization of pigs aortic leaflets and its repopulation with stem cells isolated from human dental pulp. So far, we tested three decellularization protocols. The protocols using trypsin were shown reproducible and yielded a smaller amount of DNA, when compared to the protocol where only detergent was employed, which was also not reproducible. About the stem cells, they can be isolated from human deciduous teeth (SHEDs), with studies indicating its importance in regenerative medicine aimed at the reconstruction of aortic leaflets. In this work, SHEDs were obtained and phenotypically characterized, being positive for mesenchymal and embryonic markers and negative for hematopoietic markers, in addition to presenting *in vitro* osteogenic differentiation potential. The SHEDs were then cultured in Petri plates with the decellularized matrices, however there was no success in the matrix repopulation. In an attempt to overcome such problem, a bioreactor was built in order to increase the tissue repopulation efficiency, however the results are being tested. Several points still need to be addressed in order to overcome the obstacles of tissue decellularization technique and then achieve a successful recellularization.

Keywords: aortic valve, aortic leaflets, biological matrix, bioengineering, stem cells.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - O coração com as valvas cardíacas. Representação semi-esquemática da corrente sanguínea, cuja direção é regulada pelas valvas cardíacas (sangue oxigenado em vermelho; sangue venoso em azul). Fonte: München, 2009. 18
- Figura 2 - Corte ao nível das valvas do coração, visto de cima. Foram removidas as aurículas cardíacas e cortado o tronco pulmonar. O músculo cardíaco encontra-se em relaxamento e as duas valvas atrioventriculares estão abertas. Fonte: München, 2009. 19
- Figura 3 - A valva aórtica. a) Estrutura macroscópica da valva aórtica em sístole (à esquerda) e em diástole (à direita). b) Estrutura do tecido, mostrando baixa ampliação fotomicrografia de configuração dos folhetos em corte transversal em sístole, enfatizando as 3 camadas principais: ventricular (v), esponjosa (s), e fibrosa (f). A superfície de saída está no topo. Ampliação 100x; Coloração pentacromo de Movat (colágeno é amarelo; elastina é preto). c) Próteses mecânicas da valva aórtica. d) Diagrama esquemático representando as três camadas e mostrando as gotículas de lipídios encontradas no interior da camada esponjosa durante a dissecação das cúspides valvares. A camada ventricular foi levantada com uma pinça para mostrar as gotículas lipídicas. (Modificado, respectivamente de: a,b) Schoen, 2008;c) Zilla et al., 2008; d) Dunmore-Buyze et al., 1995). 20
- Figura 4 - Folhetos aórticos antes (à esquerda) e após descelularização (à direita). Escala em centímetros. 45
- Figura 5 - Corte histológico dos folhetos aórticos. Aumento de 400x. Coloração HE mostrando em (A) o tecido natural, controle e em (B) tecido descelularizado pelo protocolo 1 (C) tecido descelularizado pelo protocolo 2 e (D) tecido descelularizado pelo protocolo 3, observa-se restos celulares (seta). 46
- Figura 6 - Análise da integridade de DNA. (M) marcador 1 Kb *ladder* (Promega) colocar no método ; (C) controle; (P1) protocolo1; (P2) protocolo 2; (P3) protocolo 3. Gel de agarose 1%. 46
- Figura 7 - Corte histológico dos folhetos aórticos. Observa-se ausência de células nucleadas nos folhetos descelularizados. Aumento de 200x. Coloração HE mostrando em (A) o tecido natural controle e em (B) tecido descelularizado pelo protocolo 1 (C) tecido descelularizado pelo protocolo 2 e (D) tecido descelularizado pelo protocolo 3. 47
- Figura 8 - Avaliação dos Protocolos de descelularização quanto ao conteúdo de material genético (DNA). Marcadores de massa em nanogramas (1Kb). (C) controle; (P1) protocolo1; (P2) protocolo 2; (P3) protocolo 3. Gel de agarose 1%. 47

Figura 9 - Lâminas de eletroforese em gel de agarose em tampão PDA dos GAGs extraídos dos folhetos aórticos. (M) padrão – CS: condroitim sulfato, DS: dermatam sulfato, HS: heparam sulfato; (C1) controle concentrado 10 vezes, (C2) controle concentrado 5 vezes, (P1) Protocolo 1; (P2) Protocolo 2; (P3) Protocolo 3.....	48
Figura 10 - Morfologia fusiforme das células-tronco isoladas. A: aumento de 100x, 5 dias após processamento da polpa; B: aumento de 100x, 10 dias após processamento da polpa, células mais confluentes, a ponto de serem tripsinizadas; C: aumento de 100x, células após serem tripsinizadas com 4 dias de cultivo. Seta indica polpa.	49
Figura 11 - Caracterização das SHEDs. As SHEDs apresentaram-se positivas para marcadores mesenquimais e embrionários e negativas para marcadores hematopoiéticos (dados não mostrados). Foto do gel de agarose 1%.....	49
Figura 12 - Dia 8 da diferenciação osteogênica. A: aumento 100x, controle. B: aumento 100x, células se diferenciando.	50
Figura 13 - Coloração de <i>Von Kossa</i> para evidenciar a diferenciação osteogênica das células, dia 21 da diferenciação osteogênica. O núcleo (seta branca) é corado fortemente de vermelho e o citoplasma (seta preta) é corado fracamente em vermelho. A: aumento de 200x, células controle, destaque para a organização e disposição do citoesqueleto fusiforme. B: aumento de 200x, destaque para a organização do citoesqueleto.....	50
Figura 14 - Proliferação das células-tronco com a matriz biológica. A: aumento de 50x, três dias após início da recelularização; B: aumento de 50x, sete dias após início da recelularização. Seta branca indica matriz biológica.....	51
Figura 15 - Biorreator usando para recelularização dos folhetos processados.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> para a caracterização das células	44
---	----

LISTA DE ABRESVIATURAS E SIGLAS

CEP – Comitê de ética em pesquisa
CETAVLON – brometo de cetiltrimetilamônio
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
cm – centímetro
CO₂ – Dióxido de carbono
CS – Condroitim sulfato
CTA – Célula-tronco adulta
CTM – Célula-tronco mesenquimal
CTPDs– Células-Tronco da Polpa Dentária Humana
DMEM – “*Dulbecco's Modified Eagle Medium*” – Meio essencial mínimo de
Dulbecco
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTPs – Deoxinucleotídeo trifosfato
dNTPs – deoxinucleotídeo trifosfato
DS – Dermatam sulfato
EDTA – Ácido Etileno diamino Tetra-Acético
GAG – Glicosaminoglinano
GENETEC – Genética Humana e Terapia Celular
GlcA – Ácido D- Glucurônico
h – hora
HA – Ácido hialurônico
HCl – Ácido clorídrico
HE – hematoxilina-eosina
Hep – Heparina
HS – Heparina sulfato
IdoA – Ácido L- Idurônico
Kb – quilobase
kg – Kilogramas
KS – Keratam sulfato

M – Molar
mA – miliampere
MEC – Matriz Extracelular
mg – Microgramas
mg – Miligramas
MG – Minas Gerais
MgCl₂ – cloreto de magnésio
min – minutos
mL – mililitros
mm – milímetros
mM – milimolar
NaCl – cloreto de sódio
ng – Nanogramas
nm – nanômetro
n° – número
°C – Graus Celsius
p – peso
P.A. – Padrão Analítico
PAGE – “*polyacrylamide gel*” – Gel de Poliacrilamida
pb – pares de bases
PBS – Tampão Fosfato-Salino
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PDA - 1,3-diaminopropano
pH – Potencial Hidrogeniônico
RNA – Ácido ribonucleico
RT – Transcrição Reversa
RT-PCR – Reação Transcrição Reversa, seguida de PCR
SDC – Deoxicolato de Sódio
SDS – “*Sodiumdodecyl sulfat*e” – Dodecil Sulfato de Sódio
SFB – soro fetal bovino
SHED – “*Stem cells from human exfoliated deciduous teeth*” – Células-Tronco de Dentes Decíduos Exfoliados Humanos
TCA – ácido tricloroacético
TCLE – Termo de consentimento livre esclarecido

U – Unidades

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

V – volts

v – Volume

μg – microgramas

μl – Microlitros

μM – micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Anatomia do coração.....	17
1.2	A valva aórtica.....	19
1.3	Contexto clínico: doenças cardiovasculares e valvopatias	21
1.4	Próteses cardíacas	22
1.5	Matrizes Biológicas	23
1.6	Descelularização	24
1.7	Recelularização	28
1.8	Células-tronco de dentes decíduos humanos (SHED).....	29
1.9	Engenharia de tecidos de valva aórtica	31
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivos específicos.....	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Comitê de ética.....	34
3.2	Extração de válvulas cardíacas	34
3.3	Produção de matrizes biológicas descelularizadas	35
3.3.1	Protocolo 1.....	35
3.3.2	Protocolo 2.....	35
3.3.3	Protocolo 3.....	36
3.4	Caracterização das matrizes biológicas.....	36
3.4.1	Extração de DNA	36
3.4.2	Histologia	37
3.4.3	Extração de glicosaminoglicanos.....	38

3.4.3.1	Identificação dos glicosaminoglicanos – eletroforese em gel de agarose em tampão acetato 1,3-diaminopropano	39
3.5	Obtenção das células-tronco da polpa dentária humana	39
3.5.1	Isolamento das células-tronco	39
3.5.2	Cultivo celular	40
3.5.3	Diferenciação osteogênica <i>in vitro</i> das células-tronco	40
3.5.4	Caracterização molecular das células-tronco	41
3.6	Recelularização.....	43
4	RESULTADOS	45
4.1	Avaliação do conteúdo de DNA de acordo com diferentes protocolos.....	45
4.2	Avaliação de GAGs.....	48
4.3	Obtenção das células-tronco de polpa dentária e sua caracterização	49
4.4	Recelularização dos folhetos descelularizados com as SHEDs	51
5	DISCUSSÃO.....	53
6	CONCLUSÕES.....	56
7	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia do coração

O coração é um órgão muscular oco que funciona como uma bomba contrátil-propulsora, responsável por bombear o sangue por todo o corpo transportando, assim, oxigênio e nutrientes necessários às células (Figura 1). Ele é constituído por quatro câmaras: dois átrios e dois ventrículos. As câmaras superiores (átrios direito e esquerdo) encontram-se separadas pelo septo interarterial e as câmaras inferiores (ventrículos direito e esquerdo), são separadas pelo septo interventricular e o septo átrio-ventricular separa os átrios dos ventrículos. Os átrios funcionam como câmaras receptoras do sangue vindo do corpo, enquanto os ventrículos funcionam como câmaras bombeadoras (WHITAKER, 2014).

Na metade direita do coração circula somente sangue venoso (rico em dióxido de carbono) e na metade esquerda, somente o sangue arterial (rico em oxigênio). O sangue venoso chega ao coração pelas veias cavas superior e inferior que desembocam no átrio direito e saem do ventrículo direito pelo tronco pulmonar que bifurca-se em artérias pulmonares direita e esquerda para os respectivos pulmões. O sangue arterial chega dos pulmões ao átrio esquerdo pelas veias pulmonares e sai do ventrículo esquerdo pela artéria aorta para todo o corpo (MAHADEVAN, 2008).

A circulação do sangue é controlada pelas valvas (Figura 2) que se abrem permitindo a passagem do sangue e fecham-se para evitar o seu refluxo, conforme as alterações de pressão quando ocorre a sístole (contração) e a diástole (relaxamento) do coração (DANGELO e FATTINI, 2002).

As valvas atrioventriculares estão localizadas entre um átrio e um ventrículo e são formadas por uma lâmina descontínua de tecido conjuntivo denso, apresentando subdivisões incompletas, as quais recebem o nome de folhetos, cúspides ou válvulas. A valva atrioventricular direita, por possuir três folhetos, recebe a denominação de valva tricúspide e permite a passagem do sangue do átrio direito para o ventrículo direito. A valva atrioventricular esquerda apresenta dois folhetos e chama-se valva bicúspide ou mitral, a qual permite a passagem do sangue do átrio

esquerdo para o ventrículo esquerdo (BALACHANDRAN, SUCOSKY e YOGANATHAN, 2011).

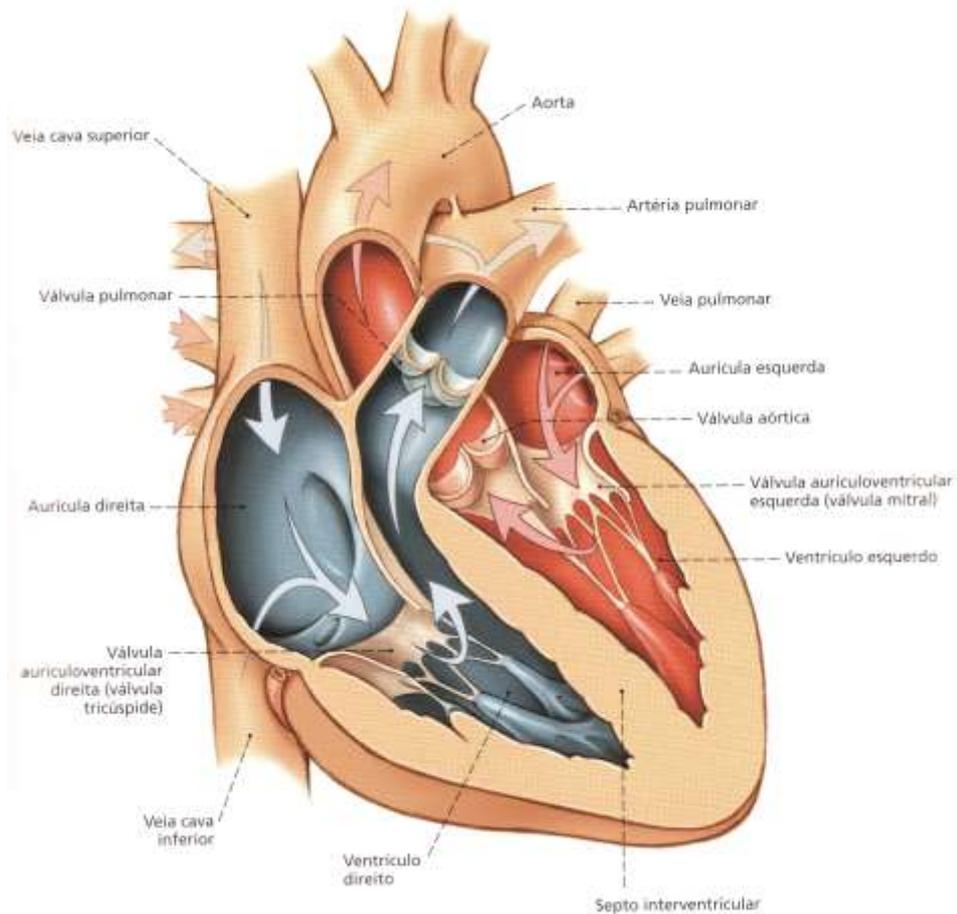


Figura 1 - O coração com as valvas cardíacas. Representação semi-esquemática da corrente sanguínea, cuja direção é regulada pelas valvas cardíacas (sangue oxigenado em vermelho; sangue venoso em azul). Fonte: München, 2009.

As valvas do tronco pulmonar e a aórtica estão situadas, respectivamente, nos orifícios de saída do tronco pulmonar e da artéria aorta. Cada uma dessas valvas é constituída por três folhetos semilunares, que são lâminas de tecido conjuntivo revestidas de endotélio, com o fundo voltado para o ventrículo e a porção aberta voltada para a luz da artéria, impedindo, assim, o retorno do sangue aos ventrículos (DANGELO e FATTINI, 2002).

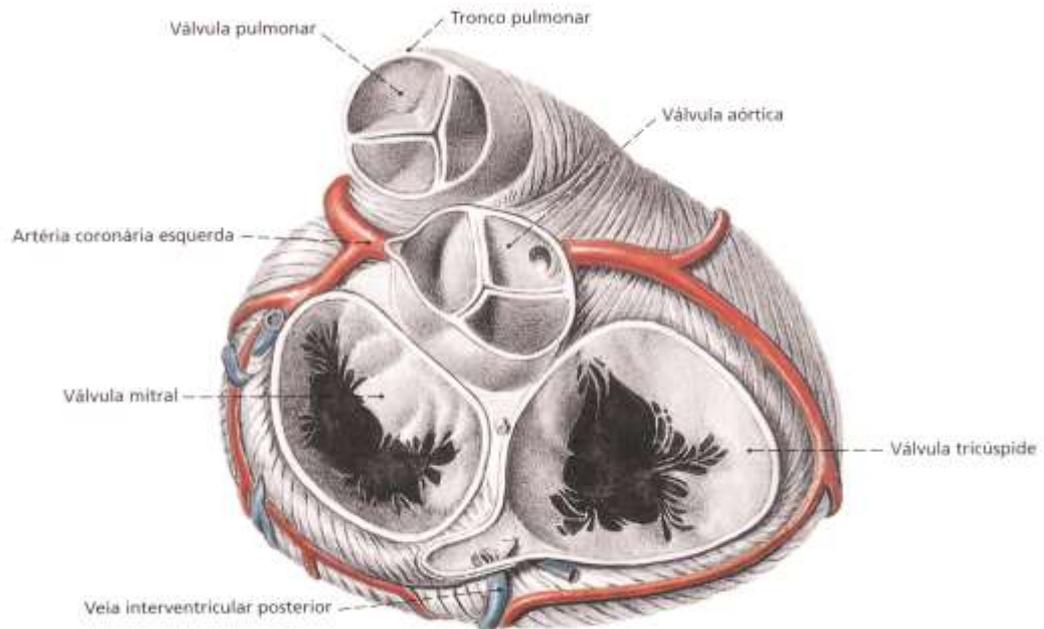


Figura 2 - Corte ao nível das valvas do coração, visto de cima. Foram removidas as aurículas cardíacas e cortado o tronco pulmonar. O músculo cardíaco encontra-se em relaxamento e as duas valvas atrioventriculares estão abertas. Fonte: München, 2009.

1.2 A valva aórtica

A valva aórtica está situada na raiz da artéria aorta e regula o fluxo de sangue entre o ventrículo esquerdo e tal artéria (YACOUB et al., 1999). A valva aórtica é composta de três lâminas semilunares, também chamadas de folhetos ou válvulas, que abrem e fecham de forma sincronizada durante cada ciclo cardíaco (Figura 3a). Os folhetos são ligados a um anel fibroso que se une à extremidade distal da via de saída do ventrículo esquerdo. Uma porção do anel está ligada ao músculo cardíaco, enquanto que a outra metade é contínua com o folheto fibroso da valva mitral. Os três folhetos da valva, assim como a parede da aorta, ao qual estão ligados são compostos de materiais reforçados com fibras e denominados como coronária esquerda, coronária direita e não-coronária, cada um de acordo com sua posição anatômica (BUCHANAN e SACKS, 2014; ANDERSON, 2015).

Os folhetos aórticos são compostos de três camadas de tecidos morfológicamente distintas: a fibrosa, a ventricular e a esponjosa (Figura 3b, 3d) (SCHOEN, 2008). A fibrosa está localizada no lado da artéria aórtica e é composta por folhas de colágeno no sentido central com poucas fibras de elastina. A

ventricular é a mais fina e cobre a superfície ventricular do folheto, e tem um número consideravelmente maior de elastina do que a camada fibrosa, mas ambos os componentes são organizados com menor orientação das fibras do que na fibrosa quando totalmente relaxada. Entre a fibrosa e a ventricular está a camada esponjosa, que permite movimentos localizados (BUTCHER, SIMMONS e WARNOCK, 2008).

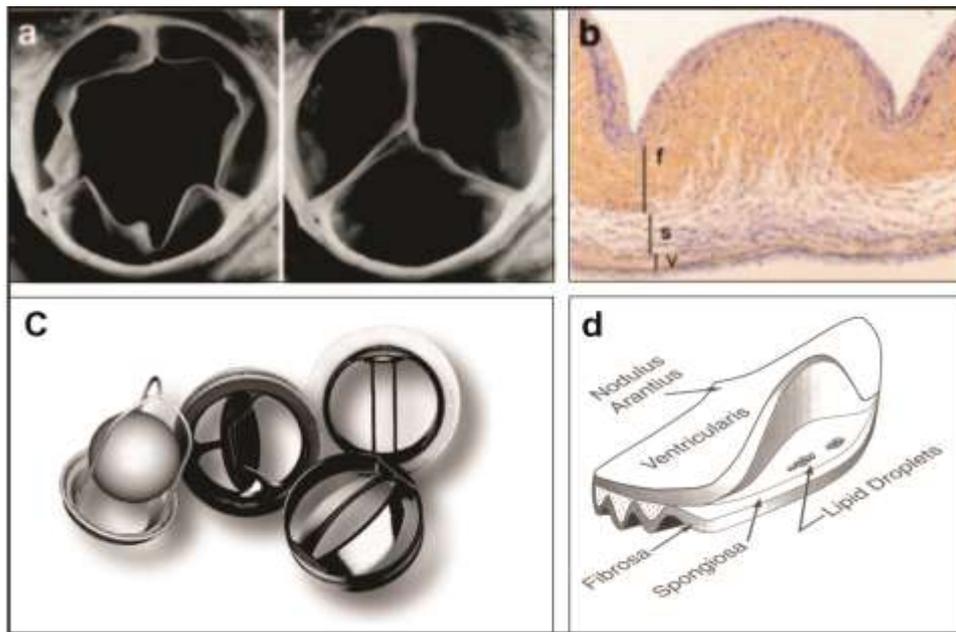


Figura 3 - A valva aórtica. a) Estrutura macroscópica da valva aórtica em sístole (à esquerda) e em diástole (à direita). b) Estrutura do tecido, mostrando baixa ampliação fotomicrografia de configuração dos folhetos em corte transversal em sístole, enfatizando as 3 camadas principais: ventricular (v), esponjosa (s), e fibrosa (f). A superfície de saída está no topo. Ampliação 100x; Coloração pentacromo de Movat (colágeno é amarelo; elastina é preto). c) Próteses mecânicas da valva aórtica. d) Diagrama esquemático representando as três camadas e mostrando as gotículas de lipídios encontradas no interior da camada esponjosa durante a dissecação das cúspides valvares. A camada ventricular foi levantada com uma pinça para mostrar as gotículas lipídicas. (Modificado, respectivamente de: a,b) Schoen, 2008;c) Zilla et al., 2008; d) Dunmore-Buyze et al., 1995).

Dois tipos de células estão presentes na valva aórtica humana: células endoteliais que abrangem as células superficiais e intersticiais com propriedades variáveis de fibroblastos, células de músculo liso e miofibroblastos no interior (DELLA ROCCA et al., 2000; RABKIN et al., 2001; MENDELSON e SCHOEN, 2006). Já as células isoladas dos folhetos da valva aórtica suína são caracterizadas como fibroblastos e células de músculo liso (BAIRATI e DEBIASI, 1981; MESSIER et al., 1994). Porém a origem do fenótipo (SCHENKE-LAYLAND et al., 2004) e a

distribuição espacial dessas células nos três tecidos do folheto aórtico (ventricular, esponjoso e fibroso) (BERTIPAGLIA et al., 2003) ainda são pouco conhecidas. É importante a identificação correta dessas células para sua futura utilização na terapia celular.

1.3 Contexto clínico: doenças cardiovasculares e valvopatias

Disfunções nas valvas cardíacas podem gerar complicações graves, como insuficiência cardíaca e mortalidade, tornando necessária a reconstrução cirúrgica ou a sua substituição. Falhas da valva do coração, na maioria das vezes, resultam de alterações estruturais e funcionais em resposta às condições patológicas nas quais uma ou mais valvas do coração tornam-se insuficientes, não mantendo o fluxo unidirecional do sangue. Esta condição é mais prevalente no folheto aórtico do coração, que gera um grande número de morbidade e mortalidade (BRODY e PANDIT, 2007).

A substituição da valva é o tratamento mais comum dentre as doenças cardíacas em todo o mundo, sendo necessária em casos de folhetos calcificados degenerados ou quando o reparo não é possível (DUJARDIN et al., 1999; OTTO et al., 1999; WEBER et al., 2014). Nos países em desenvolvimento, onde a maioria dos potenciais destinatários da prótese de válvula reside, tem menor acesso a essas cirurgias ao comparar com os países desenvolvidos devido ao seu alto custo (ZILLA et al., 2008).

A Associação Americana do Coração relatou, em 2010, a morte de 21.386 pacientes com doenças relacionadas a valvas cardíacas, dessas, 13.752 foram devido à doença da válvula aórtica. A taxa de mortalidade por patologias em valvas do coração nos EUA aumentou em 2014, atingindo 22.777 mortes, sendo 15.276 dos óbitos relacionados à doença da válvula aórtica (LLOYD-JONES et al., 2009; GO et al., 2014).

Além disso, como a doença cardíaca congênita ocorre em cerca de 1% dos nascimentos e mais de um terço dessas anormalidades envolvem as valvas aórtica e pulmonar, há uma necessidade significativa de troca valvar em crianças e adolescentes (JAIN et al., 2010).

Nesses contextos, percebe-se uma considerável necessidade de desenvolver substitutos de folhetos. Diversos tipos de materiais de substituição de valvas têm sido desenvolvidos para o uso, dando prioridade para o desenvolvimento de próteses de valvas mecânicas e biológicas.

1.4 Próteses cardíacas

Técnicas de substituição da valva cardíaca começaram a ser pesquisadas e utilizadas a partir da década de 50 (NORTH et al., 1999; MORONI e MIRABELLA, 2014), e mais de 80 modelos de valvas tem sido usados, porém ainda apresentam muitos problemas inerentes, como a instabilidade das matrizes poliméricas biodegradáveis, a transferência de doenças infecto-contagiosas relacionadas com animais, e os padrões de rejeição xenogênica (CEBOTARI et al., 2002).

As próteses de valvas cardíacas disponíveis podem ser classificadas em dois tipos: as valvas bioprotéticas ou biológicas, feitas a partir de qualquer tecido animal e as valvas mecânicas feitas a partir de material não biológico (Figura 3a, 3c) (SCHENKE-LAYLAND et al., 2004; MORONI e MIRABELLA, 2014). O desenvolvimento dessas próteses tem aumentado a sobrevida e qualidade de vida de pacientes com disfunção valvular (SPOON et al., 2013). No entanto, todas as classes de substitutos estão associadas com limitações e inconvenientes graves (CEBOTARI et al., 2002; MAGANTI et al., 2010; YU et al., 2013). As desvantagens do uso das valvas cardíacas mecânicas incluem a necessidade de terapia de anticoagulantes durante toda a vida do paciente, que leva ao risco de hemorragia (SCHMIDT e BAIER, 2000), risco aumentado de infecções (MENDELSON e SCHOEN, 2006), e tromboembolismo causado por anormalidades da superfície e de fluxo não-fisiológicos (MOMTAHAN et al., 2011). Além disso, as próteses mecânicas de valvas cardíacas disponíveis não tem o potencial para crescimento, o que limita a sua utilização em crianças (SCHENKE-LAYLAND et al., 2004; STAMM et al., 2004). Apesar destas limitações a prótese mecânica tem sua durabilidade como vantagem (YU et al., 2013).

As valvas biológicas apresentam como desvantagem a degeneração prematura (MAGANTI et al., 2010), problemas imunogênicos (ERDBRÜGGER et al., 2006; OTA et al., 2007; WEYMANN, et al., 2013) e calcificação (BERTIPAGLIA et

al., 2003; CIGLIANO et al., 2012). Entretanto, apresentam menor risco de tromboembolismo e não requerem procedimento de substituição quando transplantadas em pacientes ainda novos, pois possuem a capacidade de crescer junto com o receptor (GEROSA et al., 1991; DELLA ROCCA et al., 2000).

1.5 Matrizes Biológicas

Próteses biológicas compostas de Matriz Extracelular (MEC) são comumente utilizadas para uma variedade de aplicações cirúrgicas reconstrutivas e servem como estratégias na medicina regenerativa para substituição de tecidos e órgãos (CRAPO et al., 2011).

A MEC representa os produtos de secreção de células residentes do tecido de cada órgão e está em um estado dinâmico de reciprocidade com essas células em resposta a alterações do microambiente (HUTTER et al., 2000; DEQUACH et al., 2011). Além disso, fornece sinais que influenciam a proliferação e quimiotaxia das células (NELSON e BISSELL, 2006; BARKAN et al., 2010; VOROTNIKOVA et al., 2010), a diferenciação celular (STERN et al., 2009; SELLARO et al., 2010; DEQUACH et al., 2011) e induz respostas de remodelação do tecido hospedeiro (PAREKH et al., 2009).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são críticos para a função de vários tecidos conectivos macios, incluindo as valvas cardíacas, os quais fornecem propriedades do material tais como visco-elasticidade e resistência à compressão e tensão (PATNAIK et al., 2013). Outras características biológicas importantes dos glicosaminoglicanos incluem a ligação de fatores de crescimento, inibição de proteases e envolvimento na adesão, migração, proliferação e diferenciação de células (TAYLOR e GALLO, 2006; SOMERS et al., 2012).

Os GAGs podem ser divididos em 4 classes gerais: (1) ácido hialurônico (HA), (2) o condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS); (3) queratam sulfato (KS), e (4) o heparim sulfato (HS) e heparina (Hep). Eles podem estar modificados estruturalmente: (1) adição de O-sulfatos em várias hidroxilas, (2) 5- epimerização de alguns resíduos do ácido glucurônico (GlcA) para formar os resíduos de ácido idurônico (IdoA) (DS, Hep / HS), e (3) remoção de resíduos acetil a partir de algumas hexosaminas e substituindo-os por N-sulfato (Hep/HS). Estas diferenças na estrutura dos GAG formam distintas

cadeias de proteoglicano e fornecerão papéis importantes em uma grande variedade de processos biológicos (CALABRO et al, 2001; VOLPI, 2007). Dentre esses, os encontrados em válvulas cardíacas são CS e HS (GRANDE-ALLEN et al., 2005; FLANAGAN et al., 2006)

1.6 Descelularização

Sabe-se que o material celular residual atenua ou anula totalmente as vantagens de remodelação do tecido construtivo de materiais de matrizes biológicas *in vivo* (BROWN et al., 2009). Por isso, os métodos de processamento dos tecidos, incluindo a descelularização, constituem fatores determinantes para o sucesso clínico (BURCH et al., 2010).

A descelularização de tecidos baseia-se em protocolos para obter uma ideal prótese biológica de matriz extracelular com aplicações na engenharia de tecidos, por exemplo, para a regeneração do tecido da valva aórtica (GRAUSS et al., 2005; CIGLIANO et al., 2012; PATNAIK et al., 2013). O resultado esperado é a tentativa de maximizar a remoção dos resíduos celulares e nucleares, preservando a composição de colágeno, elastina, glicosaminoglicanos e fibronectina, a atividade biológica e a integridade mecânica da MEC, proporcionando, assim, uma matriz biomecanicamente suficiente, menos imunogênica e que permita a recelularização (GILBERT et al., 2006; YU et al., 2013), composta essencialmente de componentes da matriz extracelular (SCHMIDT e BAIER, 2000).

Outras características desejáveis que precisam ser retidas nas matrizes descelularizadas são moléculas bioativas e proteínas importantes para mediar os comportamentos celulares (BADYLAK et al., 2000; BADYLAK, 2002). A descelularização reduz com eficácia a calcificação e a atividade imunogênica o que capacita às células hospedeiras nativas se proliferarem (SCHMIDT e BAIER, 2000; SONG e OTT, 2011).

A extração dos lipídios durante o processo de preparação de materiais bioprotéticos ou a prevenção do uso de válvulas com grandes concentrações de lipídeos é uma estratégia adequada para ter sucesso no enxerto das biopróteses, pois essas válvulas biológicas quando enxertadas podem causar calcificações no coração. Dunmore-Buyze et al. (1995) mostram que os lipídios podem atuar como

sítio de formação da calcificação, já que há semelhança na distribuição da calcificação e das gotas lipídicas dentro da camada esponjosa da válvula aórtica.

Matrizes biológicas derivadas de tecidos e órgãos descelularizados têm sido utilizadas com sucesso tanto em estudos pré-clínicos como em aplicações clínicas para a substituição das valvas aórticas (GILBERT et al., 2006). As valvas descelularizadas além de apresentarem baixa imunogenicidade e alta resistência à calcificação apresentam capacidade de serem recelularizadas (OTA et al., 2007). Zehr et al. (2005) mostraram que pacientes submetidos à procedimentos de homoenxertos de valvas aórticas, mesmo após um ano, não apresentaram anticorpos contra o tecido recebido, confirmando a baixa imunogenicidade.

A descelularização de valvas cardíacas biológicas é uma opção promissora para diminuir as respostas imunológicas e inflamatórias que desencadeiam a degeneração e a perda de implantes nos enxertos de animais e humanos (ASSMANN et al., 2013). A tentativa de remoção dos antígenos e, então, o controle da antigenicidade pode ser alcançada utilizando protocolos de descelularização em valvas cardíacas (O'BRIEN et al., 1999; STOCK e VACANTI, 2001, YU et al., 2013). Resultados experimentais e clínicos com a mínima atividade imunológica utilizando o processo de descelularização foram obtidos com veia cava suína (WELLS et al., 2003), valvas pulmonares (O'BRIEN et al., 1999) e aórticas suínas, válvulas pulmonares de ovinos (ELKINS et al., 2001a) e, posteriormente, veia (MADDEN et al., 2002) femoral humana e válvula pulmonar de humanos (ELKINS et al., 2001b).

Foi comprovado, por pesquisa realizada em tecidos valvares de ratos, que a quantidade de células inflamatórias resultantes da enxertia dos arcabouços acelulares foi inferior ao encontrado em enxerto de válvulas que ainda continham células (MEYER et al., 2005).

As técnicas de descelularização de cada tecido e órgão irão depender de muitos fatores, incluindo o tipo de célula, a densidade, o teor de lipídios e a espessura do tecido (CRAPO et al., 2011), para assim obter um equilíbrio entre a remoção do conteúdo celular e a preservação de características estruturais, mecânicas e bioquímicas favoráveis.

Os principais agentes utilizados em protocolos eficazes de descelularização podem ser classificados nos três grupos seguintes:

(1) agentes químicos, que incluem ácidos e bases, soluções hipotônicas e hipertônicas, detergentes iônicos e não-iônicos, como por exemplo, Triton X-100, Deoxicolato de Sódio (SDC) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS);

(2) agentes biológicos, que incluem enzimas, como tripsina, DNase e RNase, e agentes quelantes;

(3) agentes físicos, incluindo temperatura e aplicação de força; e radiações ultravioleta e gama (OTA et al., 2004; GILBERT et al., 2006; SOMERS et al., 2012; SPOON et al., 2013; MORONI e MIRABELLA, 2014).

Os métodos que utilizam enzimas em concentrações elevadas são os mais agressivos para MEC, devido à proteólise com tripsina para as proteínas estruturais que apresentam resíduos com cadeia lateral carregada positivamente (GRAUSS et al., 2003; BADER et al., 2000). Por exemplo, um tratamento de 0,5% de tripsina perturbou gravemente a rede de elastina em folhetos da valva aórtica, o que resultou num tecido com morfologia "inchada" devido à falta de constrição de uma rede de elastina saudável (LIAO et al., 2008).

Uma alternativa é utilizar a tripsina em baixa concentração (por exemplo, 0,05% ou 0,01%) juntamente a os outros detergentes tais como o SDS (WANG et al., 2012) ou Triton X-100 (SHI et al., 2007); esta combinação tem sido altamente eficaz para remover o conteúdo celular e, então, permitir a recelularização.

YU et al. (2013) compararam dois protocolos de descelularização de folhetos da valva aórtica de suínos. Um grupo de folhetos da valva foi tratado com os detergentes Triton X-100 e deoxicolato de sódio e em outro grupo utilizaram detergente e enzima (deoxicolato de sódio e Tripsina, EDTA), e demonstraram que o protocolo que utilizou detergentes em combinação com digestão enzimática de fato removeu as células, porém restos celulares ainda foram encontrados e houve pequena modificação na estrutura da matriz, o que não ocorreu quanto utilizou apenas o protocolo de detergentes em baixas concentrações. Meyer et al. (2006) também comprovaram isso ao comparar três diferentes protocolos de descelularização em valvas aórticas de ratos.

Protocolos de descelularização que utilizam SDS também podem gerar danos na MEC, devido à sua natureza corrosiva, uma vez que fornece cargas negativas à matriz extracelular e desfaz as interações entre proteínas. O uso de SDS em altas concentrações é geralmente seguido por alguma lavagem ou desintoxicação por produtos químicos, como o Triton X-100 e ácido peracético (GILBERT et al., 2012).

Sendo assim, houve relatos demonstrando as limitações do tratamento com SDS, tais como a remoção de fatores de crescimento da MEC (REING et al., 2010), calcificação (JORGE-HERRERO et al., 1994) e retenção do excesso de SDS na MEC (KNIGHT et al., 2008), além da remoção incompleta de material celular e nuclear (ARAI et al., 2009). Entretanto, Kim et al. (2002), trataram os folhetos aórtico de suínos com NaCl-SDS e mostraram por coloração HE uma considerável remoção de células e por microscopia de transmissão mostraram matriz isenta de células com arquitetura de colágeno bem preservada, obtendo os melhores resultados utilizando SDS em termos da eficácia da descelularização e em resposta ao cultivo de células endoteliais.

O Triton X-100 é um detergente neutro, solúvel em água, biodegradável, altamente eficaz na remoção de células (GRAUSS et al., 2003) e cria ambiente que permite o crescimento celular (REING et al., 2010). Na maior parte dos casos, o Triton X-100 remove os componentes celulares, deixando a MEC intacta mantendo a arquitetura vascular. No entanto, alguns estudos tem relatado resultados variáveis com algum grau de dano na MEC como a remoção dos GAGs (BADER et al., 2000) e, prejudicando assim, a contração da matriz (LIAO et al., 2008).

A perda de GAGs em matrizes biológicas produzidas a partir de válvulas aórticas suínas pode ser uma importante causa da falha desse tipo de prótese, uma vez que estes GAGs são cruciais no desenvolvimento e função da válvula cardíaca (SOMERS et al., 2012).

Muitas aplicações bem sucedidas têm mostrado que o método de descelularização mais eficaz e eficiente inclui uma combinação de agentes de tratamento, bem como os meios físicos. Além disso, vários trabalhos relatam que as combinações de vários agentes de descelularização (por exemplo, SDS, tripsina, EDTA), juntamente com meios de agitação, maximizam a descelularização de vários tecidos (KOIZUMI et al., 2007; SHORTT et al., 2008).

Entre os doadores mais comuns da valva aórtica para descelularização estão os suínos, bovinos, roedores, e cadáveres humanos (SPOON et al., 2013). As dificuldades de obtenção e manutenção de homoenxertos têm levado os pesquisadores a adotar os folhetos heterólogos como o substituto biológico de escolha para a substituição da valva aórtica (FANTINI et al., 1998). Válvas aórticas suínas são mais utilizadas na construção das biopróteses devido à sua considerável

disponibilidade em diversos tamanhos e, também à sua semelhança anatômica às valvas aórticas humanas (SAMOUILLAN et al., 1999).

O uso de matrizes descelularizadas oriundas de suínos combinadas com específicas células humanas proporciona um fornecimento ilimitado de órgãos para transplantes. As duas etapas desse processo são a descelularização do órgão ou tecido suíno, preservando a matriz extracelular e a recelularização com células humanas (MONTAHAM et al., 2014).

As matrizes devem fornecer suporte inicial para as células cultivadas, acomodar as células nos espaços apropriados, proporcionar ambientes físicos e biológicos para a adesão, migração, proliferação e diferenciação, para obter tecidos e órgãos funcionais (HOSHIBA et al., 2010).

1.7 Recelularização

Os biomateriais descelularizados podem ser recelularizados com vários tipos de células (KIM, PARK e LEE, 2002; DA COSTA et al., 2010). O processo de recelularização envolve a seleção e a proliferação de uma população de células apropriada, que fornecem nutrientes, fatores de crescimento, gases e troca de resíduos, a fim de gerar tecidos funcionais. A quantidade e o tipo de células que necessitam ser cultivadas no tecido a ser reconstruído são os desafios da recelularização (PATNAIK et al., 2013). Muitos tipos celulares provenientes de fontes autólogas e alogênicas tem sido propostos para o uso na recelularização em válvulas descelularizadas, podendo haver a necessidade de fornecer co-culturas de vários tipos de células.

As células que foram especificamente consideradas para engenharia de todo o coração incluem as células-tronco embrionárias, mioblastos esqueléticos, células-tronco adultas cardíacas, células-tronco derivadas de tecido adiposo, células mononucleares do sangue periférico, células hematopoiéticas derivadas da medula óssea e as células-tronco mesenquimais. Mais especificamente, para a engenharia da válvula aórtica tem sido utilizadas as células vasculares (SODIAN et al., 2000; SODIAN e HOERSTRUP, 2000), fibroblastos (ZÜND et al., 1998), fibroblastos com células endoteliais (SHINOKA et al., 1995; ZÜND et al., 1998; STEINHOFF et al.,

2000), e miofibroblastos com células endoteliais (ZÜND et al., 1997; HOERSTRUP et al., 2000; STEINHOF et al., 2000).

As matrizes dos folhetos da valva aórtica descelularizadas com detergentes podem ser recelularizadas utilizando células intersticiais da válvula aórtica com potencial de diferenciação, as quais originam quatro diferentes tipos de populações de células mesenquimais (fibroblastos, miofibroblastos, células musculares lisas e células endoteliais) no aloenxerto (BERTIPAGLIA et al., 2003).

Utilizando uma proteína biofuncional, a fibronectina, na superfície de canais aórticos descelularizados de ratos (Assmann et al. 2013), mostraram, *in vivo*, que esse revestimento melhorou a capacidade de adesão das células e a biocompatibilidade dos enxertos descelularizados, resultando em uma acelerada endotelização indicando a viabilidade e o potencial dessa estratégia para a melhoria das atuais biopróteses utilizadas clinicamente.

1.8 Células-tronco de dentes decíduos humanos (SHED)

As células-tronco são células não especializadas, capazes de tornarem-se células especializadas, apresentam capacidade de autorrenovação e potencial para diferenciar-se em múltiplas linhagens celulares (PARKER et al. 2004; KERKIS et al., 2006). Ou seja, quando uma célula-tronco se divide, cada nova célula tem o potencial de permanecer como célula-tronco ou tornar-se outro tipo celular com novas funções, por um processo chamado de divisão assimétrica (CAPLAN, 1991; ALHADLAQ e MAO, 2004; BIANCO et al., 2006; KIESSLING et al., 2003; FIONA et al., 2000).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são um tipo de células-tronco adultas (CTA) e podem ser isoladas da medula óssea (CAPLAN, 1991), tecido adiposo (AGGARWAL et al., 2005), músculo esquelético (DZIOBEK et al., 2000), sinóvia (OYOSHI et al., 2006), baço, timo (MAUS et al., 2001), pulmão, sangue fetal (VON WULFFEN et al., 2007), líquido amniótico (LAI et al., 2010) e polpa dentária decídua (GRONTHOS et al., 2000). Vários estudos têm demonstrado os grandes potenciais do uso de CTM para engenharia tecidual (BIANCO, ROBEY E SIMMONS, 2008; PROCKOP et al., 2010). Entre as muitas características vantajosas das CTM está o

fato de estas células poderem ser isoladas a partir de vários tecidos e possuírem potencial para serem expandidas em cultura e diferenciarem de multilinhagens (SANTOS et al., 2011).

Vários tipos de células-tronco têm sido isolados da dentição humana que incluem, Células-Tronco da Polpa Dentária Humana (GRONTHOS et al., 2000), Células-Tronco do Ligamento Periodontal (SEO et al., 2004), Células-Tronco da Papila Apical (HUANG et al., 2009), Células Progenitoras do Germe Dental (IKEDA et al., 2008) e Células-Tronco de Dentes Decíduos Esfoliados Humanos (do Inglês, *Stem cells from human exfoliated deciduous teeth – SHED*) (MIURA et al., 2003).

As SHED foram identificadas como sendo uma população de células autorrenováveis, altamente proliferativas e capazes de se diferenciar em uma variedade de tipos de células, incluindo células neuronais, adipócitos e odontoblastos (MIURA et al. 2003; TIRINO et al. 2011). Além disso, demonstram propriedades de células-tronco típicas as quais incluem clonogenicidade, extensiva proliferação celular e multipotência, e se destacam por possuírem mais eficiência em determinadas características quando comparadas com células-troncos isoladas de medula óssea, como maior potencial imunossupressor (YAMAZA et al., 2010). Estudos mais aprofundados de uma população mais restrita de CTPD humanas demonstraram uma rápida expansão e proliferação *in vitro* e a expressão de alguns marcadores de células-tronco mesenquimais, tais como o STRO-1 e CD146 (MIURA et al., 2003).

O fato das SHED serem isoladas de dentes decíduos e de alguns trabalhos mostrarem que estas células expressam Nestina (molécula presente em células da linhagem neuronal e em células originadas da crista neuronal embrionária) e Oct-4 (marcador embrionário) acredita-se que as SHED possuem a facilidade de diferenciarem-se para células das linhagens mesenquimal e ectodermal (CHAI et al., 2000, HUANG et al., 2009, MIURA et al., 2003, YAMAZA et al., 2010). Além disso, trabalhos tem mostrado a capacidade imunomoduladora das células-tronco da polpa dentária (PIERDOMENICO et al., 2005; SILVA, et al., 2014). Essas células também se destacam por um fato importante, pois desenvolvem tecidos que podem conter células-tronco distintas dos tecidos maduros (SONOYAMA et at., 2008; HUANG et al., 2009).

A obtenção de células-tronco oriundas de dentes torna-se um atrativo para utilização em terapia celular, por não serem de órgãos vitais, possuírem fácil acesso

e por ser um tecido que normalmente seria descartado. A extração do tecido da polpa do dente é altamente eficiente, o local de coleta é fácil e as células possuem ampla capacidade de diferenciação e interatividade com biomateriais, tornando ideal para reconstrução de tecidos (YOU-YOUNG et al., 2007; D'AQUINO et al., 2008).

As suas limitações estão no risco de contaminação durante a coleta e a restrita quantidade de células inicialmente disponível para terapia (GRONTHOS et al., 2002; YAMAZA et al., 2010), por conseguinte, eliminaria os problemas éticos que aumentam no que diz respeito à sua utilização em medicina regenerativa e engenharia tecidual (PATEL, SHAH E SRIVASTAVA, 2013). Dessa forma, possuem vantagens que as tornam atraentes do ponto de vista da engenharia de tecidos, visando à reconstrução de folhetos aórticos.

1.9 Engenharia de tecidos de valva aórtica

A engenharia de tecidos começou a crescer durante os meados da década de 1980 para atender as altas demandas de tecidos regenerados em aplicações clínicas (LE et al., 2013). Os desafios encontrados nas pesquisas são os seguintes: (1) o crescimento de células (muitas vezes usando células-tronco) com os fenótipos certos e organizações em matrizes adequadas; (2) a entrega e manutenção de oxigênio e nutrientes adequados em construções de tecido; (3) determinar ambientes de engenharia ideais, como biorreatores ou matrizes biológicas, meios de crescimento, simulações físicas, para determinadas construções; (4) a integração funcional de tecido flexível, durável no receptor; e (5) a obtenção da matriz funcional não imunogênica e não degradável.

A abordagem interdisciplinar da engenharia de tecidos cardiovascular pode oferecer uma opção atraente para superar essas limitações e desenvolver válvulas cardíacas viáveis e eficientes. A engenharia tecidual ainda enfrenta desafios, como a identificação e otimização de matrizes que devem ser biodegradáveis, não-imunogênicas e capazes de fornecer suportes estruturais, mecânicos e biológicos para a adesão celular, proliferação e diferenciação (PATNAIK et al., 2013). Para desenvolver plenamente essa tecnologia, há uma necessidade de aperfeiçoar os processos de descelularização de forma confiável e segura para produzir as valvas acelulares e, posteriormente, recelularizá-las com células humanas para futuros

transplantes na terapia da doença cardíaca valvar (SCHENKE-LAYLAND et al., 2003; SONG e OTT, 2011). Por fim, os órgãos devem ser caracterizados para certificar-se de que eles são seguros e cumprem todos os requisitos de desempenho (MONTAHAM et al., 2014).

Como exemplo, na aplicação da engenharia de tecido da valva aórtica, o modelo da matriz deve manter a morfologia anatômica e a arquitetura das fibras da valva aórtica do coração, ser capaz de efetuar suas características e funções no orifício aórtico (LIAO, et al., 2008), além de possuir durabilidade ilimitada e não necessitar de terapia de anticoagulação pós-implantação (HOERSTRUP et al., 2000; SODIAN et al., 2000; STAMM et al., 2004).

É nesse contexto de limitações, associadas às técnicas de enxertia disponíveis na atualidade, que a descelularização e a recelularização teciduais tornam-se uma opção promissora pela possibilidade de obtenção de matrizes que visam ter funcionalidade semelhante aos enxertos autólogos, sem as inconveniências atreladas a estes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de uma matriz biológica por meio da descelularização das válvulas cardíacas de suínos e promover a sua recelularização com células-tronco da polpa dentária humana.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver protocolos para a descelularização de valvas aórticas;
- Avaliar a eficiência na remoção celular de diferentes protocolos de descelularização;
- Avaliar a preservação da estrutura da matriz quanto à caracterização dos glicosanimoglicanos;
- Isolar células-tronco a partir da polpa dentária de humanos;
- Avaliar o cultivo das células coletadas para sua expansão *in vitro* e congelamento;
- Caracterização molecular da linhagem obtida quanto à expressão de marcadores de células-tronco embrionárias, mesenquimais e hematopoiéticas;
- Avaliar o potencial de diferenciação osteogênica das células obtidas;
- Recelularizar as matrizes biológicas produzidas com células-tronco.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

Esse projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFJF) sob protocolo nº 32/2014.

As linhagens de células-tronco da polpa dentária de dentes decíduos foram obtidas de crianças saudáveis após aprovação pelo Comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEP/UFJF Parecer CAAE nº 27681214.7.0000.5147) e se encontram estocadas no Biobanco Genética Humana e Terapia Celular (GENETEC; Parecer 22/2015 - Processo nº 25000.113045/2014-88) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.2 Extração de válvulas cardíacas

Inicialmente, os corações suínos foram obtidos de um açougue localizado na cidade de Juiz de Fora. Entretanto, dado ao fato dos corações virem cortados, o que danificava as válvulas, estabelecemos então colaboração direta com a Fripai Distribuidora de Carnes Ltda, cidade Juiz de Fora - MG, que por certo período nos passou a fornecer os corações para retirada das válvulas.

Os corações suínos de animais com 4-6 meses de idade, pesando, cada um aproximadamente 80 kg foram obtidos e as amostras foram transportadas refrigeradas a 4° C para o laboratório para remoção dos folhetos. No laboratório, os três folhetos de cada valva aórtica, foram extraídos desde a raiz da artéria aorta e lavados em água destilada com 1% (p/v) de penicilina (GIBCO).

Folhetos não descelularizados foram utilizados como grupo controle e estocados, separadamente, a -20° C.

Antes do início dos tratamentos de descelularização, os folhetos foram colocados em 20 mL de solução estéril de água destilada com 100 U/mL de antibiótico (estreptomicina e penicilina) (GIBCO) por 72 h, agitando gentilmente a 4° C, para serem lavados. A solução foi trocada a cada 24 horas.

3.3 Produção de matrizes biológicas descelularizadas

Para produção das matrizes biológicas, foram testados três protocolos de descelularização diferentes. Todos os passos dos três protocolos foram realizados em capela de fluxo laminar com as soluções autoclavadas, em volume final de 20 mL para cada folheto.

3.3.1 Protocolo 1

Os folhetos foram tratados individualmente com solução de 0,02% (v/v) de Tripsina-EDTA (GIBCO) por 24 h a 37° C, agitando gentilmente. Posteriormente, com solução de 2% (v/v) Triton 100-X (Sigma) por 24 horas a 4° C, agitando gentilmente. Por último, em solução de 2% (p/v) deoxicolato de sódio (SDC) (Sigma) por 24 h a 4° C, agitando gentilmente. Entre cada tratamento, os folhetos ficaram 24h em água destilada a 4° C, agitando gentilmente. Após o ultimo tratamento os folhetos foram estocados em solução de PSB 1x, a 4° C, com 1% (p/v) de penicilina para posteriores análises.

3.3.2 Protocolo 2

Os quatro folhetos foram tratados, individualmente, com solução de 0,02% (v/v) de Tripsina- EDTA por 24 h a 37° C, agitando gentilmente. Posteriormente, com solução de 2% (v/v) Triton 100-X por 24 h a 4° C, agitando gentilmente. Por último, com solução de 2% (p/v) SDS (J. T. Baker) por 24 h a 4° C, agitando gentilmente. Entre cada tratamento, os folhetos ficaram 24 h em água destilada a 4° C, agitando gentilmente. Após o ultimo tratamento os folhetos foram estocados em solução de PSB 1x, a 4° C com 1% (p/v) de penicilina, para posteriores análises.

3.3.3 Protocolo 3

Os quatro folhetos foram tratados, individualmente, com solução de 2% (v/v) de Triton 100-X por 24 h a 4° C, agitando gentilmente. Posteriormente, com solução de 2% (p/v) SDC, por 24 h a 4° C, agitando gentilmente. Em seguida, os folhetos passaram novamente por cada tratamento. Entre cada tratamento, os folhetos ficaram 24 h em água destilada a 4° C, agitando gentilmente. Após o último tratamento os folhetos foram estocadas em solução de PSB 1x, a 4° C, para posteriores análises.

3.4 Caracterização das matrizes biológicas

3.4.1 Extração de DNA

Foi feita a extração de DNA dos folhetos descelularizados e do controle utilizando o método de Sambrook e Russel (2001) com pequenas modificações. Foram macerados em nitrogênio líquido 50 mg de tecido utilizando almofariz e pistilo. Imediatamente após a maceração, foram adicionados 500 µl de solução de lise contendo 10 mM de Tris-HCl, 0,1M de EDTA e 0,5% de SDS, pH 8,0, durante 1 hora a 37° C. Posteriormente, foram digeridos com proteinase K (10 mg/mL) (Sigma) a 55° C por 3 horas.

Para a remoção das proteínas, foi adicionado um volume de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (na proporção de 25:24:1 v/v, respectivamente), centrifugados a 12000 x g por 5 minutos. Essa etapa foi repetida duas vezes. Em seguida, foi adicionado um volume de clorofórmio/álcool isoamílico (na proporção de 24:1 v/v, respectivamente), também, centrifugados a 12000 x g por 5 minutos.

O DNA foi precipitado adicionando 0,2 volume de acetato de amônio 7,5 M e um volume de isopropanol gelado incubando no freezer -80° C por 5 minutos, imediatamente as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos.

Em seguida, o DNA lavado com 700 µl de etanol 70% gelado, centrifugado a 12000 x g por 5 minutos e depois lavado duas vezes com 700 µl de etanol 95% durante 5 minutos.

As amostras ficaram *overnight*, em temperatura ambiente, para secagem e em seguida, ressuspensas em 50 µl de água ultrapura mantidos a 4° C por pelo menos 2 h para ressuspensão completa do DNA. Por fim, o DNA foi estocado em freezer -20° C.

A qualidade e a quantidade do DNA também foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando o marcador de massa lambda (Promega). A eletroforese foi realizada em corrente constante de 100 mA por aproximadamente 50 minutos.

3.4.2 Histologia

3.4.2.1 Preparação do tecido e confecção de lâminas

Um folheto aórtico descelularizado de cada protocolo de descelularização e um de controle negativo foram cortados em dois pedaços, de aproximadamente um quarto de tamanho de cada folheto. Para preparação do tecido, as amostras foram fixadas em 10% de solução de formaldeído (formalina) tamponado à temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, foram desidratadas com etanol (P.A.) por três incubações de 30 minutos cada à 60° C e limpas em xileno (P.A.) por duas incubações de 30 minutos cada à 60° C. Os tecidos foram colocados dentro de cassetes e embebidos com parafina líquida por 24 h a 60° C. Após o processamento dos tecidos, as amostras foram colocadas em um molde com parafina líquida, que foi arrefecida até solidificar.

Para confecção de lâminas, os blocos montados de parafina com o tecido foram seccionados em um micrótomo RM2125 RT (Leica Microsystems) em cortes com espessura de cinco micrômetros. As seções cortadas foram colocadas em lâminas de microscópio e, então, armazenadas em temperatura ambiente até serem coradas.

3.4.2.2 Coloração Hematoxilina-Eosina

As lâminas confeccionadas foram lavadas em xileno (3 vezes, 5 minutos cada) e álcoois (75%, 95% e 100% durante 2 minutos cada), em seguida, lavadas em água durante 2 minutos antes da imersão em hematoxilina durante 10 minutos. Posteriormente, foram lavadas em água por 2 minutos e coradas com eosina durante 3 minutos. Em seguida, as lâminas passaram por uma série de álcoois (75%: 30 segundos, de 95%: 1 minuto, 100%: 2 minutos) e depois em xileno (duas vezes, cada uma durante 2 minutos). O agente de montagem resinoso Bálsamo do Canadá foi aplicado em cima dos cortes nas lâminas para colocar as lamínulas e, então, as lâminas ficaram em temperatura ambiente por 24 h até secar. As lâminas foram visualizadas em microscopia de luz transmitida.

3.4.3 Extração de glicosaminoglicanos

A extração e identificação de GAGs foi realizada no Laboratório de Análise de Glicoconjugados em colaboração com o Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar do Departamento de Bioquímica da UFJF e a mestrandia Camila Santos Malafaia.

Para extração de glicosaminoglicanos, os folhetos aórticos descelularizados, bem como, os de controle foram picotados e pesados, depois submetidos à proteólise com papaína (1 mg/mL em tampão fosfato-cisteína 0,05 M, pH 6,5) por 18 horas a 60° C. Em seguida, os produtos de digestão foram centrifugados (2.000 x g/15 min) e com o sobrenadante foi realizado a precipitação de ácido nucleicos e proteínas com ácido tricloroacético (TCA) 10%, na presença de NaCl 1 M. Após 15 minutos em banho de gelo centrifugou-se as amostras novamente. Ao sobrenadante adicionou-se, lentamente e sob agitação, 2,5 volumes de etanol (P.A.) para precipitação de GAG. Decorrido 18 horas a -20°C as amostras foram novamente submetidas à centrifugação o precipitado foi seco em estufa a 60°C (WIJK, 2012).

3.4.3.1 Identificação dos glicosaminoglicanos – eletroforese em gel de agarose em tampão acetato 1,3-diaminopropano

Alíquotas (5 µl, 1 mg/mL) de GAG extraídos dos tecidos foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,5%), tampão 1,3-diaminopropano (PDA) 0,05 M, pH 9,0 (DIETRICH, C. P. e DIETRICH, 1976). Uma mistura padrão de GAG (5 µl), contendo CS, DS e HS, na concentração de 1 mg/mL cada, foi aplicada ao gel como controle. Em seguida, os compostos foram submetidos à corrida eletroforética horizontal, realizada em cuba refrigerada com gelo, submetida a uma diferença de potencial de 100 a 110 V por aproximadamente uma hora. O corante vermelho de cresol foi utilizado como indicador da distância percorrida pelos GAGs, pois migra próximo ao CS. Após a eletroforese, os GAGs foram fixados no gel por solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 0,1%, por 2 horas. Em seguida, o gel foi seco em corrente de ar quente e os GAG corados com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1%: etanol 50% por 20 minutos. O excesso de corante foi removido com solução de ácido acético 1%: etanol 50% e os GAGs identificados de acordo com a mistura padrão.

3.5 Obtenção das células-tronco da polpa dentária humana

3.5.1 Isolamento das células-tronco

As células-tronco foram obtidas de dentes decíduos esfoliados humanos extraídos de um doador como amostras de descarte biológico de uma criança de 6 anos de idade (após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE; sendo a identidade do doador mantida em sigilo).

O processamento da polpa dentária foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Gronthos et al. (2000) e cultivada em placa de petri de 35 mm (Corning) usando meio basal constituído de meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM-F12) (Invitrogen), suplementado com 10% (v/v) soro fetal bovino (SFB) (Sigma), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina

(GIBCO), 2 mM L-glutamina (GIBCO) e 0,01 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen).

A cultura foi mantida a 37° C a uma atmosfera umidificada contendo 95% de ar e 5% CO₂, até atingir confluência máxima de 80%, quando ocorria o repique ou congelamento em nitrogênio líquido utilizando o meio de congelamento constituído por SFB e 10% (v/v) de DMSO (Sigma) em nitrogênio líquido (-196° C). O acompanhamento do crescimento celular e sua morfologia foram feitos por microscopia de luz transmitida (Nikon TS100F).

Após a confluência da população de células aderentes, a cultura foi tripsinizada e uma parte das células foi separada para criopreservação. Essa linhagem isolada encontra-se estocada no Biobanco GENETEC/UFJF.

3.5.2 Cultivo celular

As células da polpa dentária decídua foram cultivadas em garrafas de 25 cm² em condições de meio de cultivo previamente descritas, e incubadas em estufas com 5% CO₂ e temperatura de 37° C, atmosfera umidificada. Após atingirem 80-90% de confluência, as células foram lavadas com solução salina estéril e submetidas a uma solução de 0,25% tripsina – 1 mM EDTA (Sigma) por cerca de 3 minutos a 37° C, para que as ligações das células com a matriz extracelular fossem desfeitas. A tripsina foi inativada utilizando SFB. Após a tripsinização as células ressuspensas em 1 mL de meio completo foram contadas em câmara de Neubauer. Esse processo se repete algumas vezes durante o cultivo e a expansão. As células foram utilizadas para a expansão de novas subculturas (passagens), criopreservação de alíquotas reservas, em ensaios de diferenciação, caracterização molecular e recelularização das matrizes biológicas produzidas.

3.5.3 Diferenciação osteogênica *in vitro* das células-tronco

Uma densidade inicial de 3x10³ células (Passagem P7) foram semeadas (D0) em placas de 6-poços (Corning) e cultivadas por 24 horas com meio de basal de cultivo celular e incubadas em estufas com 5% CO₂ e temperatura de 37° C para

aderirem ao fundo da placa. No dia seguinte (D1), o meio basal foi substituído pelo meio de indução osteogênica contendo DMEM-*Low Glucose* (LGF), soluções de 10^{-7} M de dexametasona (Sigma), 50 μ M de 2-fosfato ácido ascórbico (Sigma), 2 mM de β -glicerolfosfato (Sigma) e suplementado com 10% (v/v) SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 0,01 mM de aminoácidos não essenciais. Durante o experimento foi mantido um grupo controle negativo cultivado em meio contendo DMEM-*Low Glucose*, 50 μ M 2-fosfato ácido ascórbico, 2 mM β -glicerolfosfato e suplementado com 10% (v/v) SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 2 mM L-glutamina e 0,01 mM de aminoácidos não essenciais. O β -glicerolfosfato foi adicionado somente no dia 10 (D10) do tratamento e a cultura foi mantida por 21 dias, trocando-se o meio a cada 3 dias, como descrito por Zuk et al. (2002). Durante a diferenciação a placa de cultura foi fotografada em dias aleatórios para ilustrar o andamento do protocolo. Para demonstrar a diferenciação osteogênica, as culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 24 horas e foram coradas com a técnica de *von Kossa*, específica para diferenciação osteogênica, como descrita a seguir.

As placas foram lavadas com água destilada e coradas com nitrato de prata 1% (p/v), sendo deixadas sob luz ultravioleta por 45 minutos. Em seguida foram lavadas novamente com água destilada, tratadas com tiosulfato de sódio 3% (p/v) por 5 minutos e lavadas com água destilada mais uma vez. As culturas foram então coradas com a solução de *van Gieson* (1% (p/v) de fucsina ácida e ácido pícrico saturado em água destilada), lavadas em álcool e então fotografadas após 24 h com o auxílio do microscópio de fase invertido (Nikon TS100F).

3.5.4 Caracterização molecular das células-tronco

3.5.4.1 Extração de RNA total

As células na passagem quatro foram coletadas das placas de cultura, utilizando-se solução de tripsina. As células foram centrifugadas a 1500 x g por 5 minutos e o *pellet* obtido foi ressuscitado em 1 mL de meio de cultura basal. As células foram contadas em câmara de Neubauer e alíquota contendo 5×10^{-6} células

foi lisada com 1 mL TRIzol (Thermo Fisher Scientific). O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4° C. Essa solução foi coletada e transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-proteicos. Então foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio, por mL de TRIzol utilizado, homogeneizado vigorosamente e incubado novamente, por três minutos a temperatura ambiente. Após essa segunda incubação, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4° C.

Após a centrifugação do material, a fase aquosa foi descartada. O RNA foi precipitado com 0,5 mL de isopropanol (por mL de Trizol utilizado inicialmente), por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida o material foi novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos à 4° C. O *pellet* de RNA formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4° C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* de RNA foi seco em temperatura ambiente por 5 minutos. O RNA total foi dissolvido em água destilada e livre de DNase e RNase (Gibco), incubado por 10 minutos a 60° C (para inativação de qualquer possível resíduo de RNase) e, então, armazenado à -80° C.

3.5.4.2 Verificação da integridade do RNA

A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. A eletroforese foi realizada em corrente constante de 100 mA por aproximadamente 50 minutos. A amostra que se mostrou íntegra foi utilizada como substrato para a transcrição reversa.

3.5.4.3 Transcrição reversa do RNA (RT)

A transcrição reversa é um processo que converte as moléculas de RNA em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). A transcrição reversa do cDNA foi realizada com oligonucleotídeos aleatórios (IDT), utilizando-se a enzima M-MLV-RT

(Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Os cDNAs obtidos foram utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.5.4.4 Reação em cadeia da polimerase

A PCR foi utilizada para caracterização fenotípica das células isoladas. Para a PCR, 1 µl do cDNA obtido foram incubados com 5 µl de tampão 5x (Go Taq Flexi Buffer, Promega), 2 µl de MgCl₂ 25 mM (Promega), 1 µl de dNTPs (10mM), 1 µl de cada um dos *primers* F e R a 10 µM para os respectivos marcadores (conforme Tabela 1), 0,2 µl de Taq polimerase (5 U/µl, Promega) e água ultrapura (q.s.p. 25 µl). O ciclo consistiu de uma desnaturação inicial de 95° C, por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95° C, por 30 segundos; pareamento a 60° C, por 30 segundos e extensão a 72° C, por 30 segundos. Após o ciclo, ocorreu uma extensão final a 72° C, por 5 minutos. O produto da PCR foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%. A eletroforese foi realizada em corrente constante de 100 mA por aproximadamente 50 minutos, analisando-se as bandas esperadas nas alturas indicadas (Tabela 1).

3.6 Recelularização

As células-tronco da polpa dentária isoladas nesse projeto de pesquisa foram cultivadas na presença da matriz biológica descelularizada para avaliar sua biocompatibilidade com a matriz *in vitro*. Para tanto, foram utilizados separadamente quatro folhetos descelularizados utilizando o Protocolo 1 de descelularização. Um folheto foi colocado em uma placa de petri 35 mm tratada com poliestireno e um em outra placa de vidro 35 mm não tratada, os outros dois folhetos foram colocados separadamente no biorreator, construído em colaboração com o Dr. José Paulo Rodrigues Furtado de Mendonça, professor do Departamento de Física, do Instituto de Ciências Exatas da UFJF. Todos os procedimentos foram realizados em meio de cultivo de manutenção, previamente descritos no item 3.5.1.

Tabela 1 - Sequência dos *primers* para a caracterização das células

Marcador	Primer F	Primer R	Amplicon	TM* (°C)
Embrionário				
NANOG	CTACCCAGCCTT TACTCTTCCTAC	CTCTCCACAGTTA TAGAAGGGACTG	217pb	60
OCT4	ACTTCACTGCACT GTACTCCTCAG	AGGTTCTCTTTCC CTAGCTCCTC	158pb	60
Mesenquimal				
Nestin	GACCACTCCAGTT TAGAGGCTAAG	GAATCTCCTCTCC CAGAGACTTC	244pb	60
CD105	TGCCACTGGACAC AGGATAA	CCTTCGAGACCTG GCTAGTG	205pb	62
Hematopoiético				
CD31	CTAGGAAAGAAGG ACACAGAGACAG	GTGCACAGAGGT CTTGAAATACAG	194 pb	60
CD34	AACACCTAGTACC CTTGGAAGTACC	AACACTGTGCTGA TTACAGAGGTC	177pb	60
CD45	GGACACAGAAGTA TTTGTGACAGG	GAGAAGTTGTGGT CTCTGAGAAGTC	176pb	60
Controle Interno				
GAPDH	GAAGGTGAAGGTC GGAGTC	GAAGATGGTGAT GGGATTTC	226 pb	58
Beta-actina	ATTAAGGAGAAGC TGTGCTACGTC	GATGGAGTTGAA GGTAGTTTCGTG	213pb	60

*TM: temperatura para anelamento dos *primers*.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do conteúdo de DNA de acordo com diferentes protocolos

Macroscopicamente, as matrizes produzidas permaneceram iguais aos folhetos controles (tecido natural) (Figura 4). Inicialmente, pelos cortes histológicos feitos, as matrizes produzidas também não mostraram diferenças na estrutura do tecido (Figura 5). Os três protocolos reduziram a quantidade de DNA da matriz quando comparados com o controle. Porém, os protocolos 1 e 2 mostraram maior eficiência na descelularização, uma vez que não observou-se células nucleadas nos cortes histológicos feitos e o conteúdo de DNA encontrado foi menor do que o protocolo 3, que apresentou algumas células nucleadas no corte histológico, o que foi comprovado pelo gel de agarose 1% (Figura 6).

A repetição da avaliação do conteúdo do DNA em experimentos posteriores revelaram (Figuras 7 e 8) níveis de material genético baixos ou ausentes, o que nos leva ao questionamento da eficiência do Protocolo 3, sugerindo nova investigação das amostras descelularizadas empregando esse protocolo.



Figura 4 - Folhetos aórticos antes (à esquerda) e após descelularização (à direita). Escala em centímetros.

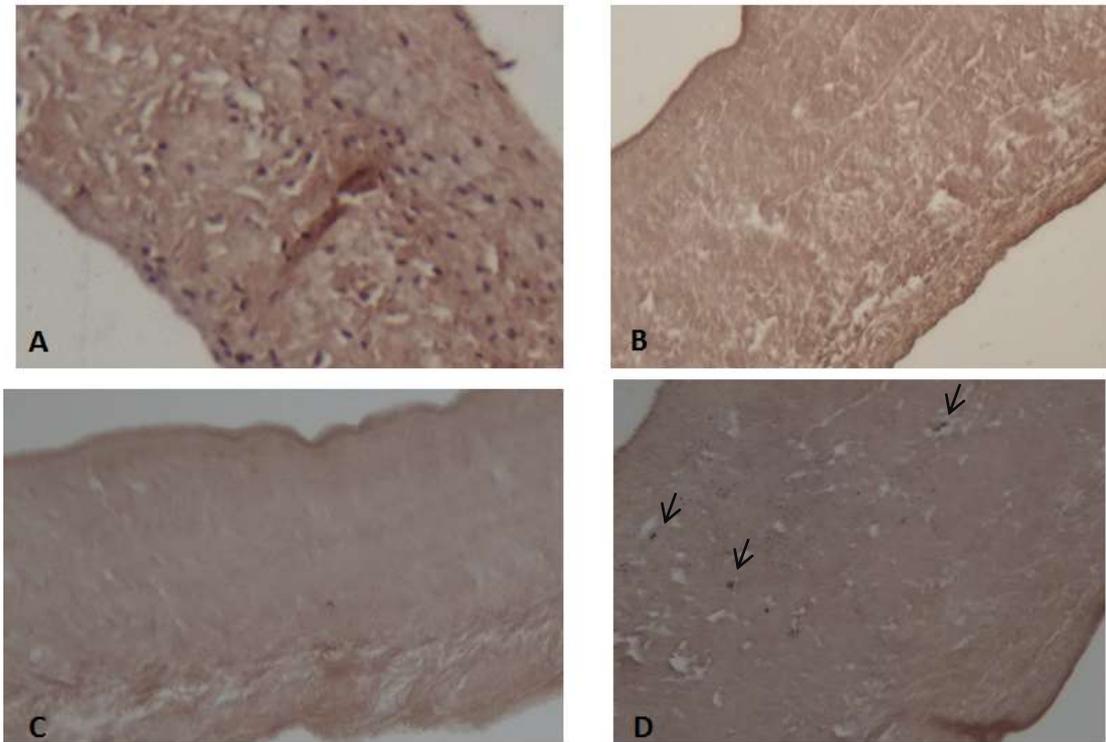


Figura 5 - Corte histológico dos folhetos aórticos. Aumento de 400x. Coloração HE mostrando em (A) o tecido natural, controle e em (B) tecido descelularizado pelo protocolo 1 (C) tecido descelularizado pelo protocolo 2 e (D) tecido descelularizado pelo protocolo 3, observa-se restos celulares (seta).

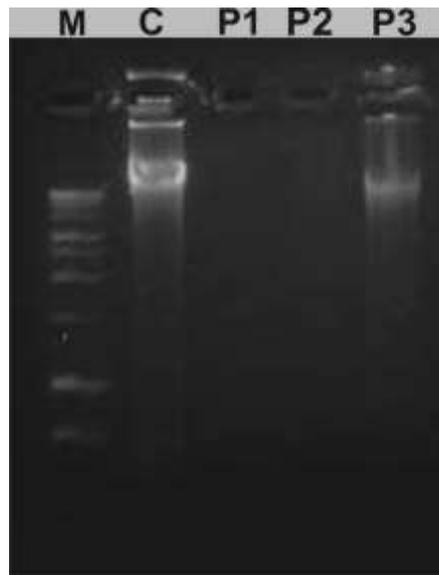


Figura 6 - Análise da integridade de DNA. (M) marcador 1 Kb *ladder* (Promega) colocar no método ; (C) controle; (P1) protocolo1; (P2) protocolo 2; (P3) protocolo 3. Gel de agarose 1%.

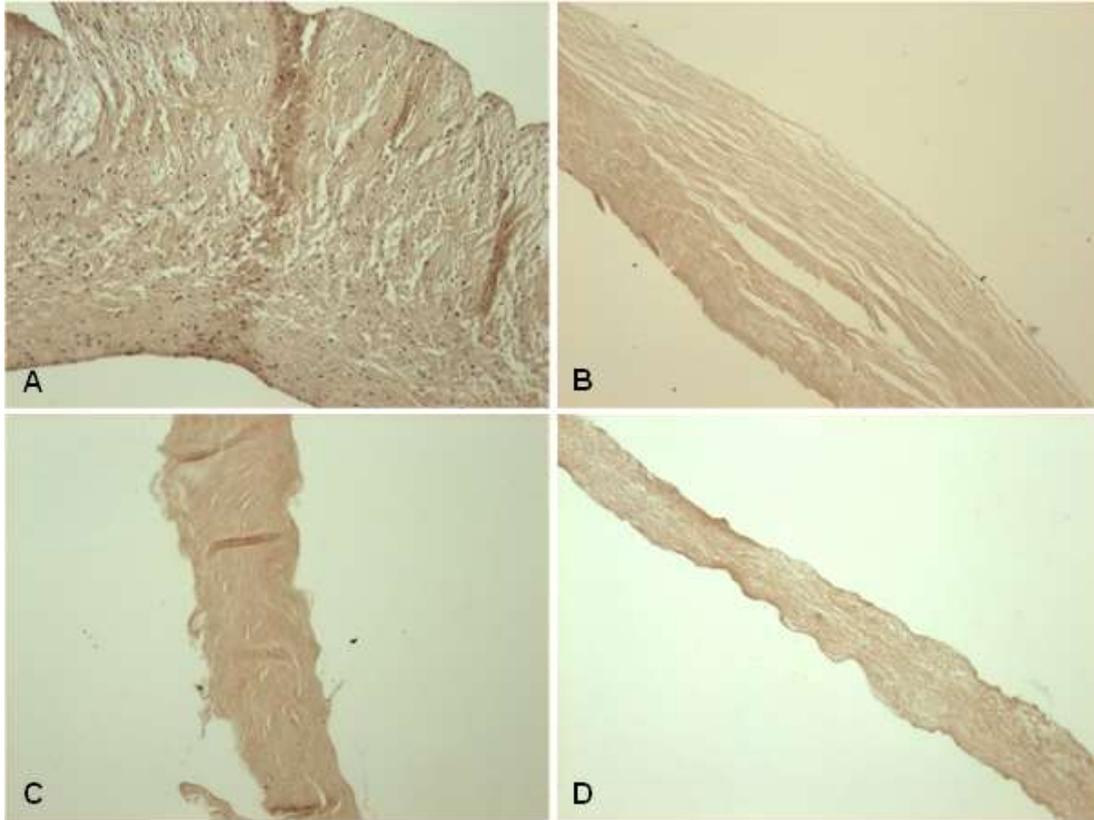


Figura 7 - Corte histológico dos folhetos aórticos. Observa-se ausência de células nucleadas nos folhetos descelularizados. Aumento de 200x. Coloração HE mostrando em (A) o tecido natural controle e em (B) tecido descelularizado pelo protocolo 1 (C) tecido descelularizado pelo protocolo 2 e (D) tecido descelularizado pelo protocolo 3.

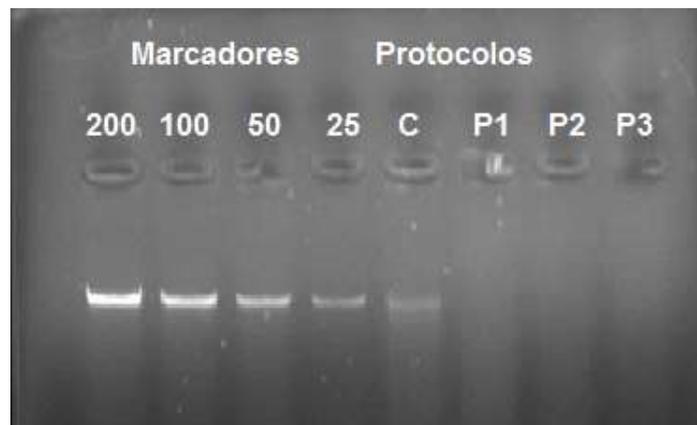


Figura 8 - Avaliação dos Protocolos de descelularização quanto ao conteúdo de material genético (DNA). Marcadores de massa em nanogramas (1Kb). (C) controle; (P1) protocolo1; (P2) protocolo 2; (P3) protocolo 3. Gel de agarose 1%.

4.2 Avaliação de GAGs

O método de eletroforese em gel de agarose utilizado nesse trabalho para a avaliação de glicosaminoglicanos, desenvolvido por Dietrich e Dietrich (1976), é utilizado para a separação de diferentes GAGs, baseando-se na interação da diamina presente no tampão e a carga negativa dos compostos. Neste método, GAGs mais sulfatados (contendo maior densidade de cargas negativas), como HS, têm maior interação com a diamina do tampão e migram menos. Já CS e DS, por apresentarem menor densidade de carga, migram mais. A diferença na migração entre estes dois se deve principalmente à conformação espacial do ácido urônico (GlcA para CS e IdoA para DS).

Após a eletroforese, os GAGs presentes no gel são corados por azul de toluidina, um corante que se complexa com os grupamentos sulfato destes compostos produzindo metacromasia, corando-os em roxo. Na Figura 9 podem-se notar bandas que migram de forma semelhante aos padrões de CS metacromáticas nos folhetos controles analisados e pela intensidade da coloração da banda pode-se indicar que o principal GAG extraído das válvulas controle migra na altura do padrão de CS. Pequenas quantidades de GAG que migram semelhante ao DS, também foram encontradas nos controles, observado como uma banda menos intensa do que a de CS na Figura 9. Nas amostras tratadas com os três protocolos de descélularização, observou-se um arrasto. O padrão de arrasto normalmente é visto quando se faz extração de proteoglicanos, entretanto, como a extração feita foi de GAGs, os tratamentos alterou as matrizes produzidas, o que pode ter alterado a interação da diamina presente no tampão e a carga negativa dos compostos, uma vez que o detergente preso no PG das matrizes, impediu sua quebra durante a extração dos GAGs, observando, então, o arraste nas bandas P1, P2 e P3.

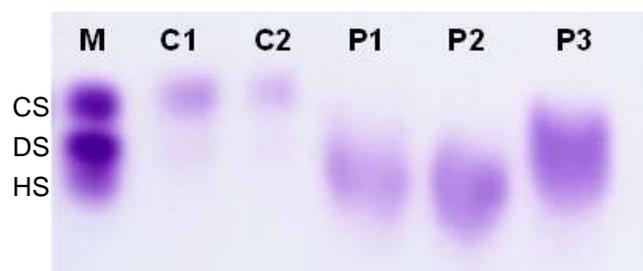


Figura 9 - Lâminas de eletroforese em gel de agarose em tampão PDA dos GAGs extraídos dos folhetos aórticos. (M) padrão – CS: condroitim sulfato, DS: dermatam sulfato, HS: heparam sulfato; (C1) controle concentrado 10 vezes, (C2) controle concentrado 5 vezes, (P1) Protocolo 1; (P2) Protocolo 2; (P3) Protocolo 3.

4.3 Obtenção das células-tronco de polpa dentária e sua caracterização

As células isoladas apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos, como mostrado na Figura 10, proliferaram-se aderidas às placas e eram constituídas de uma população homogênea de células.

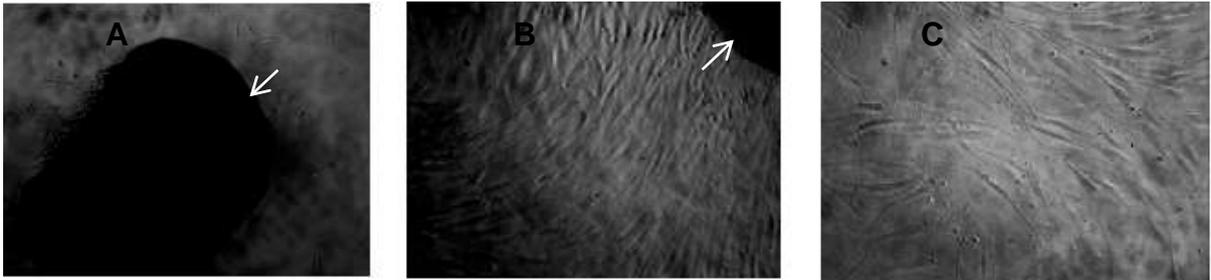


Figura 10 - Morfologia fusiforme das células-tronco isoladas. A: aumento de 100x, 5 dias após processamento da polpa; B: aumento de 100x, 10 dias após processamento da polpa, células mais confluentes, a ponto de serem tripsinizadas; C: aumento de 100x, células após serem tripsinizadas com 4 dias de cultivo. Seta indica polpa.

As células foram caracterizadas fenotipicamente e apresentaram marcações positivas para moléculas mesenquimais como CD90, CD105 e Nestin e embrionárias: OCT4 e NANOG e não apresentaram marcação para moléculas da linhagem hematopoiéticas: CD31, CD34 e CD45 (dados não mostrados) (Figura 11).

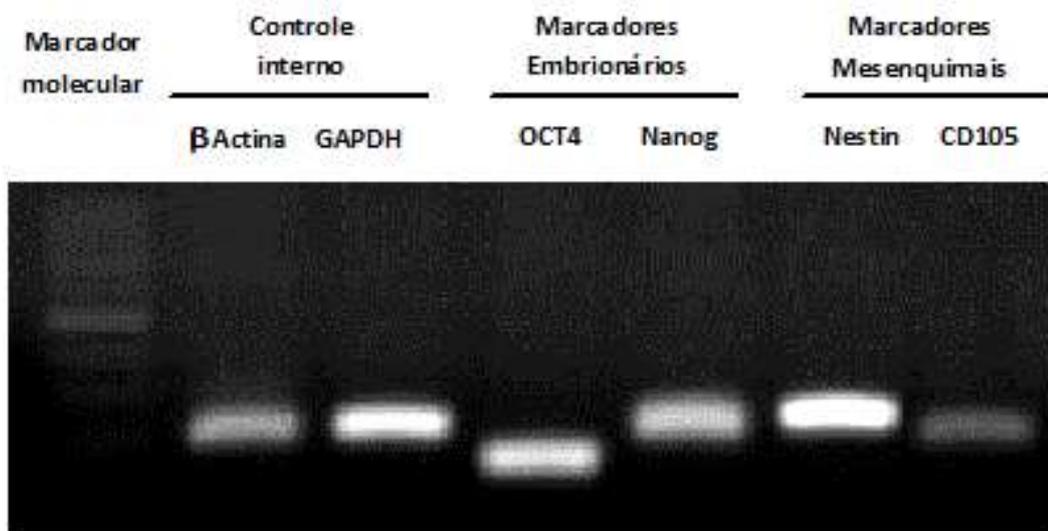


Figura 11 - Caracterização das SHEDs. As SHEDs apresentaram-se positivas para marcadores mesenquimais e embrionários e negativas para marcadores hematopoiéticos (dados não mostrados). Foto do gel de agarose 1%.

As SHED foram caracterizadas em relação a sua pluripotência avaliando sua capacidade de diferenciar-se em células tecido-específico funcionais. Utilizando agentes indutores de diferenciação osteogênica, as células-tronco foram capazes de diferenciarem em osteoblastos, mostrando a capacidade de mineralização da matriz e presença de células osteóides pela coloração de *von Kossa*. Culturas controle também foram coradas para confirmar os resultados (Figuras 12 e 13).

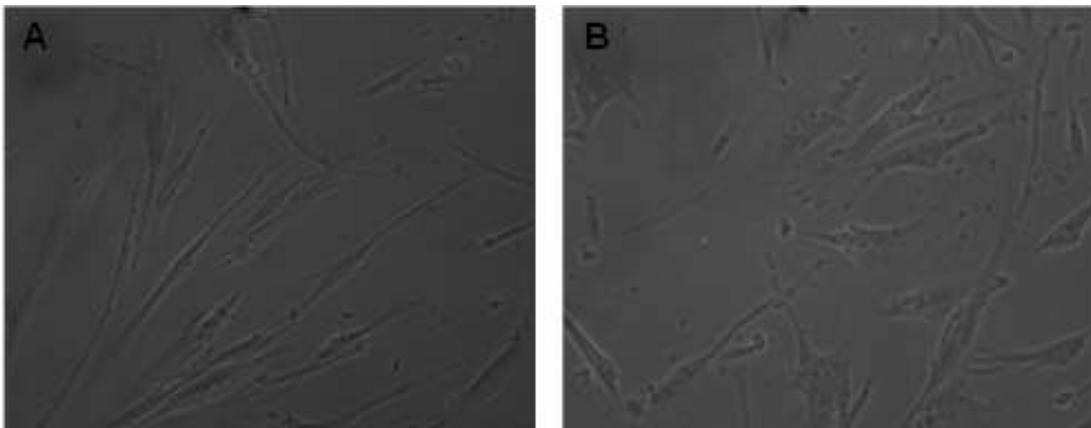


Figura 12 - Dia 8 da diferenciação osteogênica. A: aumento 100x, controle. B: aumento 100x, células se diferenciando.

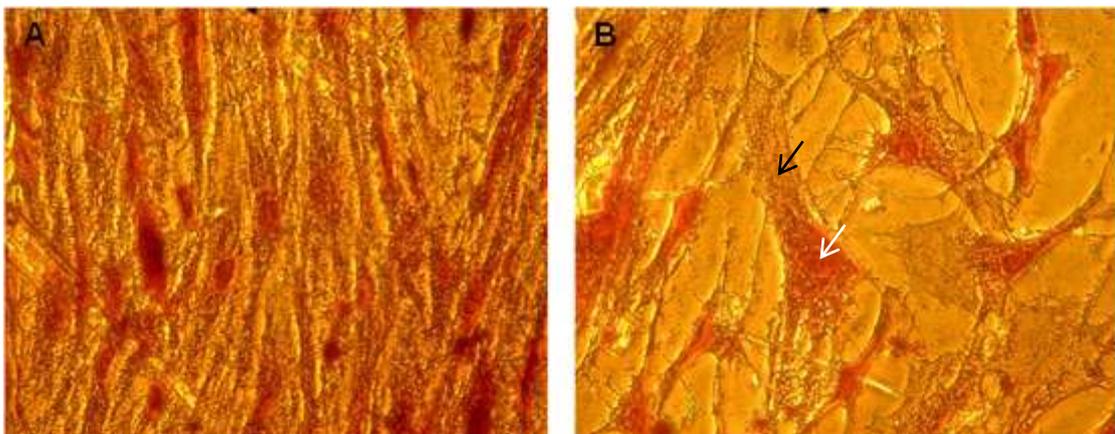


Figura 13 - Coloração de *Von Kossa* para evidenciar a diferenciação osteogênica das células, dia 21 da diferenciação osteogênica. O núcleo (seta branca) é corado fortemente de vermelho e o citoplasma (seta preta) é corado fracamente em vermelho. A: aumento de 200x, células controle, destaque para a organização e disposição do citoesqueleto fusiforme. B: aumento de 200x, destaque para a organização do citoesqueleto.

4.4 Recelularização dos folhetos descelularizados com as SHEDs

Em placas de petri tratada com poliestireno (35 mm) e de vidro não tratada (35 mm) as células eram capazes de se proliferar, porém a eficiência da recelularização foi baixa em função das células proliferarem-se no fundo das placas, não repopulando o tecido (Figura 14).

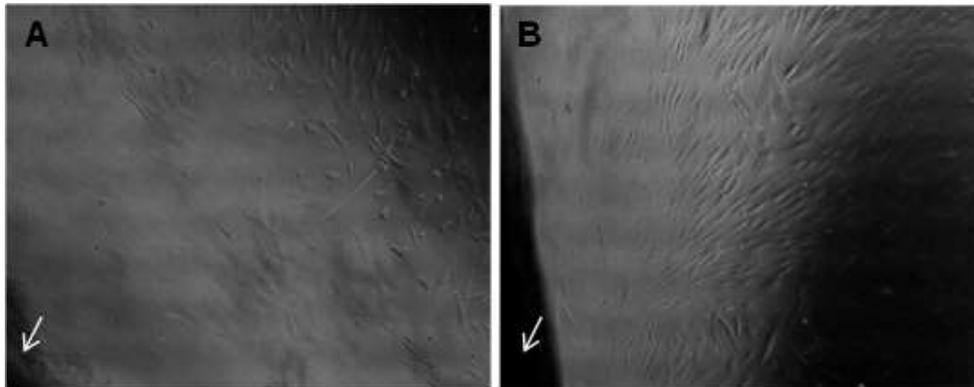


Figura 14 - Proliferação das células-tronco com a matriz biológica. A: aumento de 50x, três dias após início da recelularização; B: aumento de 50x, sete dias após início da recelularização. Seta branca indica matriz biológica.

Tentando contornar o problema, testamos a recelularização usando um biorreator com velocidade controlada, mantendo as células-tronco proliferando em suspensão, juntamente com o tecido descelularizado dentro de seringas, como mostrado na Figura 15.



Figura 15 - Biorreator usando para recelularização dos folhetos processados.

5 DISCUSSÃO

Tratamentos com tripsina já foram relatados como um método eficaz de descclularização de válvulas cardíacas humanas (CEBOTARI et al., 2002) e de suínos (SHI, DONG e SUN, 2007). No presente trabalho, os protocolos 1 e 2 que possuem uma etapa de tratamento com Tripsina 0,02%, demonstraram reprodutibilidade nos resultados de descclularização dos folhetos aórticos de acordo com Crapo et al. (2011), pois o conteúdo de DNA foi menor que 50 ng/mg (Figuras 6 e 8).

A descclularização com detergentes iônicos e não-iônicos solubiliza a membrana celular e dissocia o DNA de proteínas, portanto são eficazes na remoção do material celular do tecido (CRAPO et al., 2011). Bertipaglia et al. (2003) conseguiram descclularizar folhetos da valva aórtica de suínos utilizando detergentes não-iônico (Triton x-100) e iônico (SDC) e uma endonuclease recombinante que degrada DNA e RNA (Benzonase). No entanto, a realização do protocolo 3, além de não se mostrar reprodutivo, utilizando somente esses detergentes apresentou no primeiro momento uma maior quantidade de DNA do que os outros dois protocolos que utilizaram tripsina. Porém houve uma diminuição da quantidade de DNA quando comparado ao controle (Figura 6 e 7).

Nos primeiros experimentos realizados, a baixa eficácia do protocolo 3 pode ser explicada pela ausência da Benzonase ou nucleases. Assim, a utilização de enzimas que degradam DNA e RNA pode ser crucial para diminuir a quantidade de material nuclear da matriz descclularizada. Entretanto, em função da não reprodutividade dos resultados com esse protocolo em eventos independentes, gera uma discussão no sentido de tentar entender quais fatores poderiam estar afetando a eficiência de descclularização.

De acordo com Vyavahare et. al. (1999), o dano induzido por fadiga ao colágeno do tipo I e a perda de GAGs são os principais fatores que contribuem para a degeneração da bioprótese de válvula cardíaca. Assim, idade, peso e sexo podem ser variantes que alteram a eficiência dos protocolos de descclularização.

Nesse trabalho, apesar de tentar obter uma padronização do tamanho dos folhetos extraídos, devido à dificuldade de obtenção, o protocolo 3 pode ter se

mostrado não reprodutível, pois nas análises que ainda observou-se conteúdo de DNA e células nucleadas, os folhetos pareceram ser maiores e mais fibrosos do que os folhetos tratados posteriormente e não apresentaram conteúdo de DNA e células nucleadas.

Protocolos de descélularização com tripsina podem resultar em uma grande ruptura e perda de componentes da MEC (SOMERS et al., 2012), sendo assim, avaliações da integridade da matriz feitas para confirmar se os protocolos foram eficientes.

Protocolos de descélularização pode provocar a remoção das proteínas da MEC e de DNA (CHEN et al., 2004; DU et al., 2010) e alteração de GAG em relação digestão enzimática pode contribuir significativamente para a degeneração e falha estrutural matriz biológica da válvula do coração (SIMIONESCU, LOVEKAMP e VYAVAHARE, 2003). De acordo com a avaliação dos glicosaminoglicanos, os três protocolos testados alteraram a matriz extracelular, uma vez que houve um arraste nas bandas dos tecidos tratados, o que não ocorreu com o controle (Figura 9). A ocorrência dos arrastes pode ser devido à presença dos sabões utilizados para descélularização ainda retidos na matriz, o que pode ter alterado a carga elétrica do tecido e prejudicou a interação das amostras com o tampão utilizado na eletroforese.

Kim et al. (2002) ao utilizarem NaCl para produção de matrizes a partir de folhetos aórtico de suínos obteve melhores resultados na descélularização e posterior recélularização. Assim, uma alternativa para retirar todo o sabão das matrizes produzidas, seria sucessivas lavagens com sal. E para confirmar a integridade da matriz e comprovar os resultados obtidos pela eletroforese em gel de agarose em tampão acetato 1,3-diaminopropano, colorações histológicas de Pentacromo de Movat necessitam ser realizadas.

Uma vez obtidas as matrizes descélularizadas, avaliamos a recélularização dos tecidos tratados pelo protocolo 1, o qual se mostrou mais eficiente de todos, utilizando as células-tronco isoladas de dentes decíduos.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com células-tronco da polpa de dentes decíduos, mostrando que as mesmas apresentam atividade imunomoduladora (Silva et al., 2014) e podem ser usadas como modelo *in vitro* para estudo de doenças humanas (Nascimento et al., 2015).

As SHED utilizadas na recélularização dos folhetos aórticos descélularizados foram isoladas e caracterizadas para sucesso da recélularização. Avaliamos as

marcações das células e observamos que as mesmas apresentam características embrionárias (Oct4 e Nanog), mesenquimais (Nestin e CD105) e negativo para marcadores hematopoiéticos (CD31, CD34 e CD45). Sua plasticidade foi testada induzindo as mesmas para a formação de tecido ósseo, *in vitro*. Observamos que as SHED isoladas apresentaram potencial de diferenciação óssea com capacidade de mineralização da matriz. Esses resultados comprovam que as células isoladas por nosso grupo, a partir da polpa de dentes decíduos esfoliados, são células-tronco, com marcações semelhantes às células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea com características embrionárias e apresentam plasticidade para originar diferentes tecidos *in vitro*. Dessa forma, essas células, junto com as evidências na literatura, apresentam-se como ferramenta para estudos relacionados à terapia celular e regeneração tecidual.

A recelularização dos folhetos descelularizados em placa de cultivo não foi bem sucedido, talvez pelo aparato não ser adequado ao experimento e também pela possível presença de sabão ainda retido na matriz. Contornamos o problema com a construção de um biorreator, o qual impede a adesão das células à superfície do plástico (seringa), mantendo-as sempre em suspensão, forçando seu crescimento e proliferação no tecido descelularizado. Estamos no momento realizando experimentos a fim de investigar a eficiência da recelularização do tecido, com novas análises histológicas, imunohistoquímicas e da avaliação do conteúdo de DNA do tecido recelularizado.

6 CONCLUSÕES

Os protocolos 1 e 2 mostraram eficiência e reprodutibilidade, porém as análises mostram alteração da matriz extracelular quanto a avaliação de GAGs. Por outro lado, o protocolo 3, além de alterar a MEC, não mostrou reprodutibilidade.

As células isoladas são células-tronco mesenquimais com características embrionárias e apresentam potencial terapêutico, e essas células serão usadas para recellularizar as matrizes, empregando o protocolo 1, o qual se mostrou mais eficiente. Contudo, cuidados devem ser observados quanto à presença de reagentes ainda presos na matriz e avaliar as matrizes com corantes específicos (Pentacromo de Movat).

7 REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, **105 (4)**: 1815-1822.
- ALHADLAQ, A.; AND MAO, J. J. 2004. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. **Stem Cells and development**, **13 (4)**: 436–448.
- ALMEIDA, P. N.; SOUZA, G. T.; DE SOUZA, C. M.; ZANETTE, R. S.; MARANDUBA, C. P.; RETTORE, J. V.; SANTOS M. O.; DO CARMO, A. M.; MARANDUBA, C. M.; DE SILVA F. S. 2015. Proposing the use of dental pulp stem cells as a suitable biological model of neurofibromatosis type 1. **Child's Nervous System**, **31 (1)**: 7-13.
- ANDERSON, R. H. 2000. Anatomy: Clinical anatomy of the aortic root. **Journal Heart**, **2000 (84)**: 670–673.
- ARAI, S.; ORTON, E. C. 2009. Immunoblot detection of soluble protein antigens from sodium dodecyl sulfate- and sodium deoxycholate-treated candidate bioscaffold tissues. **The Journal of Heart Valve Disease**, **18 (4)**: 439–443.
- ASSMANN, A.; DELFS, C.; MUNAKATA, H.; SCHIFFER, F.; HORSTKÖTTER, K.; HUYNH, K.; BARTH M.; STOLDT, V. R.; KAMIYA, H.; BOEKEN, U.; LICHTENBERG, A.; AKHYARI, P. 2013. Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating. **Biomaterials**, **34 (25)**: 6015-6026.
- BADER, A.; STEINHOFF, G.; STROBL, K.; SCHILLING, T.; BRANDES, G.; MERTSCHING, H.; TSIKAS, D.; FROELICH, J.; HAVERICH, A. 2000. Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix. **Transplantation**, **70 (1)**: 7–14.
- BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. 2002. **Cell & Developmental Biology**, **13**: 377–383.
- BADYLAK, S.; MEURLING, S.; CHEN, M.; SPIEVACK, A.; SIMMONS-BYRD, A. 2000. Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model. **Journal of Pediatric Surgery**, **35 (7)**: 1097-1103.
- BAIRATI, A.; DEBIASI, S. 1981. Presence of a smooth muscle system in aortic valve leaflets. **Anatomy And Embryology**, **161 (3)**: 329-340.
- BALACHANDRAN, K.; SUCOSKY, P.; YOGANATHAN, A. P. 2011. Hemodynamics and mechanobiology of aortic valve inflammation and calcification. **International Journal of Inflammation**, **2011**: 1-15.

- BARKAN, D.; GREEN, J.; CHAMBERS, A. 2010. Extracellular matrix: A gate keeper in the transition from dormancy to metastatic growth. **European Journal of Cancer**, **46 (7)**:1181-1188.
- BERTIPAGLIA, B.; ORTOLANI, F.; PETRELLI, L.; GEROSA, G.; SPINA, M.; PAULETTO, P.; CASAROTTO, D.; MARCHINI, M.; SARTORE, S. 2003. Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells: The VESALIO Project. **The Annals Of Thoracic Surgery**, **75 (4)**: 1274-1282.
- BIANCO, P.; KUZNETSOV, S. A.; RIMINUCCI, M.; GEHRON ROBEY P. Postnatal skeletal stem cells. **Methods Enzymol**, **419**: 117–148, 2006.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, **2 (4)**: 313-319.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, **72**: 248-54.
- BRODY, S.; PANDIT, A. 2007. Approaches to heart valve tissue engineering scaffold design. **Journal of Biomedical Materials**, **83B (1)**: 16-43.
- BROWN, B. N.; VALENTIN, J. E.; STEWART-AKERS, A. M.; MCCABE, G. P.; BADYLAK, S. F. 2009. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. **Biomaterials**, **30(8)**: 1482-1491.
- BUCHANAN, R. M.; SACKS, M. S. 2014. Interlayer micromechanics of the aortic heart valve leaflet. **Biomech Model Mechanobiol**, **2014 (13)**: 813–826.
- BURCH, P. T.; KAZA, A. K.; LAMBERT, L. M.; HOLUBKOV, R.; SHADDY, R. E.; HAWKINS, J. A. 2010. Clinical performance of decellularized cryopreserved valve allografts compared with standard allografts in the right ventricular outflow tract. **The Annals of Thoracic Surgery**, **90(4)**: 1301-1306.
- BUTCHER, J. T.; SIMMONS, C. A.; WARNOCK, J. N. 2008. Review: Mechanobiology of the aortic heart valve. **Journal Heart Valve Disease**, **17 (1)**: 62-73.
- CALABRO, A.; MIDURA, R.; WANG, A.; WEST, L.; PLAAS, A.; HASCALL, V. C. 2001. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of glycosaminoglycans. **Osteoarthritis and Cartilage**, **9**: S16- S22.
- CAPLAN, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic**, **9 (5)**: 641-650.
- CEBOTARI, S.; MERTSCHING, H.; KALLENBACH, K.; KOSTIN, S.; REPIN, O.; BATRINAC, A.; KLECZKA, C.; CIUBOTARU A.; HAVERICH, A. 2002. Construction

of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. **Circulation**, **106 (suppl I)**: I-63-I-68.

CHAI, Y.; JIANG, X.; ITO, Y.; BRINGAS, P. JR.; HAN, J.; ROWITCH, D. H.; SORIANO, P.; MCMAHON, A. P.; SUCOV, H. M. 2000. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. **Development**, **127 (8)**: 1671-1679.

CHEN, R. N.; HO, H. O.; TSAI, Y. T.; SHEU, M. T. 2004. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. **Biomaterials**, **25 (13)**: 2679-2686.

CIGLIANO, A.; GANDAGLIA, A.; LEPEDDA, A. J.; ZINELLU, E.; NASO, F.; GASTALDELLO, A.; AGUIARI, P.; DE MURO, P.; GEROSA, G.; SPINA, M.; FORMATO, M. 2012. Fine structure of glycosaminoglycans from fresh and decellularized porcine cardiac valves and pericardium. **Biochemistry Research International**, **2012 (2012)**: 1-10.

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

DA COSTA, F. D. A.; COSTA, A. C. B. A.; PRESTES, R.; DOMANSKI, A. C.; BALBI, E. M.; FERREIRA, A. D. A.; LOPES, S. V. 2010. The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts. **The Annals Of Thoracic Surgery**, **90 (6)**: 1854-1860.

DANGELO, J.G.; FATTINI, C. A. Anatomia humana básica. 2ed. São Paulo: **Atheneu**, 2002.

D'AQUINO, R.; PAPACCIO, G.; LAINO, G.; GRAZIANO, A. 2008. Dental pulp stem cells: A promising tool for bone regeneration. **Stem Cell Reviews**, **4 (1)**: 21-26.

DELLA ROCCA, F.; SARTORE, S.; GUIDOLIN, D.; BERTIPLAGLIA, B.; GEROSA, G.; CASAROTTO, D.; PAULETTO, P. 2000. Cell composition of the human pulmonary valve: a comparative study with the aortic valve: The VESALIO Project. **The Annals of Thoracic Surgery**, **70 (5)**: 1594-1600.

DEQUACH, J. A.; YUAN, S. H.; GOLDSTEIN, L. S. B.; CHRISTMAN, K. L. 2011. Decellularized porcine brain matrix for cell culture and tissue engineering scaffolds. **Tissue Engineering: Part A**, **17, (21 - 22)**: 2583- 2592.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. 1976. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical biochemistry**, **70 (2)**: 645- 647.

DU, L.; WU, X.; PANG, K.; YANG, Y. 2010. Histological evaluation and biomechanical characterization of an acellular porcine cornea scaffold. **British Journal of Ophthalmology**, **95 (3)**: 410-414.

DUJARDIN, K. S.; ENRIQUEZ-SARANO, M.; SCHAFF, H. V.; BAILEY, K. R.; SEWARD, J. B.; TAJIK, A. J. 1999. Mortality and morbidity of aortic regurgitation in clinical practice: a long-term follow-up study. **Circulation**, **99 (14)**: 1851-1857.

DUNMORE-BUYZE, J.; BOUGHNER, D. R.; MACRIS, N.; VESELY, I. 1995. A comparison of macroscopic lipid content within porcine pulmonary and aortic valves: implications for bioprosthetic valves. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, **110 (6)**: 1756-1761.

DZIOONEK, A.; FUCHS, A.; SCHMIDT, P.; CREMER, S.; ZYSK, M.; MILTENYI, S.; BUCK, D. W.; SCHMITZ, J. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. **The Journal of Immunology**, **165 (11)**: 6037-6046.

ELKINS, R. C.; GOLDSTEIN, S.; HEWITT, C. W.; WALSH, S. P.; DAWSON, P. E.; OLLERENSHAW, J. D.; BLACK, K. S.; CLARKE, D. R.; O'BRIEN, M. F. 2001a. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. **Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery**, **13 (4 Suppl 1)**: 87-92.

ELKINS, R. C.; LANE, M. M.; CAPPS, S. B.; MCCUE, C.; DAWSON, P. E. 2001b. Humoral immune response to allograft valve tissue pretreated with an antigen reduction process. **Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery**, **13 (4 Suppl 1)**: 82-86.

ERDBRÜGGER, W.; KONERTZ, W.; DOHMEN, P. M.; POSNER, S.; ELLERBROK, H.; BRODDE, OTTO-ERICH, ROBENEK, H.; MODERSOHN, D.; PRUSS, A.; HOLINSKI, S.; STEIN-KONERTZ, M.; PAULI, G. 2006. Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential in vivo. **Tissue Engineering**, **12 (8)**: 2059-2068.

FANTINI, F. A.; VRANDECIC, M. O.; GONTIJO FILHO, B.; OLIVEIRA, O. C.; MARTINS JR., I. C.; MARINHO, A. A.; OLIVEIRA, M. H.; OLIVEIRA, C.; SILVA, G. A. P. 1998. Biopróteses aórticas porcinas, modelo convencional e sem suporte ("stentless"): estudo comparativo. **Revista Brasileira De Cirurgia Cardiovascular** **13 (3)**: 221-228.

FIONA, M. W. AND BRIGID, L. M. H. 2000. Out of eden: stem cells and their niches. **Science: Stem Cell Research and Ethics**, **287 (5457)**: 1427-1430.

FLANAGAN, T. C.; WILKINS, B.; BLACK, A.; JOCKENHOEVEL, S.; SMITH, T. J.; PANDIT, A. S. 2006. A collagen-glycosaminoglycan co-culture model for heart valve tissue engineering applications. **Biomaterials**, **27 (10)**: 2233-2246.

GEROSA, G.; MCKAY, R.; ROSS, D. N. 1999. Replacement of the aortic valve or root with a pulmonary autograft in children. **The Annals of Thoracic Surgery**, **51 (3)**: 424-429.

GILBERT, T. W. 2012. Strategies for tissue and organ decellularization. **Journal of cellular biochemistry**, **113 (7)**: 2217-2222.

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. 2006. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, **27 (2006)**: 3675–3683.

GO, A. S.; MOZAFFARIAN, D.; ROGER, V. L.; BENJAMIN, E. J.; BERRY, J. D.; BORDEN, W. B.; BRAVATA, D. M.; DAI, S.; FORD, E. S.; FOX, C. S.; FRANCO, S.; FULLERTON, H. J.; GILLESPIE, C.; HAILPERN, S. M.; HEIT, J. A.; HOWARD, V. J.; HUFFMAN, M. D.; KISSELA, B. M.; KITTNER, S. J.; LACKLAND, D. T.; LICHTMAN, J. H.; LISABETH, L. D.; MAGID, D.; MARCUS, G. M.; MARELLI, A.; MATCHAR, D. B.; MCGUIRE, D. K.; MOHLER, E. R.; MOY, C. S.; MUSSOLINO, M. E.; NICHOL, G.; PAYNTER, N. P.; SCHREINER, P. J.; SORLIE, P. D.; STEIN, J.; TURAN, T. N.; VIRANI, S. S.; WONG, N. D.; WOO, D.; TURNER, M. B. 2014. Heart disease and stroke statistics - 2014 update: A report from the American Heart Association. **Circulation**, **129 (3)**: 399-410.

GRANDE-ALLEN, K. J.; CALABRO, A.; GUPTA, V.; WIGHT, T. N.; HASCALL, V. C.; VESELY, I. 2004. Glycosaminoglycans and proteoglycans in normal mitral valve leaflets and chordae: association with regions of tensile and compressive loading. **Glycobiology**, **14 (7)**: 621-633.

GRAUSS, R. W.; HAZEKAMP, M. G.; OPPENHUIZEN, F.; VAN MUNSTEREN, C. J.; GITTENBERGER-DE GROOT, DERUITER, A. C.; M. C. 2005. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, **27**: 566-571.

GRAUSS, R. W.; HAZEKAMP, M. G.; VAN VLIET, S.; GITTENBERGER-DE GROOT, A. C.; DERUITER, M. C. 2003. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. **Journal Thoracic Cardiovascular Surgery**, **126 (6)**: 2003-2010.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, **97 (25)**: 13625-13630.

HOERSTRUP, S. P.; SODIAN, R.; DAEBRITZ, S.; WANG, J.; BACHA, E. A.; MARTIN, D. P.; MORAN, A. M.; GULESERIAN, K. J.; SPERLING, J. S.; KAUSHAL, S.; VACANTI, J. P.; SCHOEN, F. J.; MAYER, J. E. 2000. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. **Circulation**, **102 (suppl 3)**: 44-49.

HOSHIBA, T.; LU, H.; KAWAZOE, N.; CHEN, G. 2010. Decellularized matrices for tissue engineering. **Expert Opinion Biological Therapeutics**, **10 (12)**: 1717-1728.

HUANG, G.T. J.; GRONTHOS, S. E. SHI, S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine. **Journal of Dental Research**, **88 (9)**: 792-806.

HUTTER, H.; VOGEL, B. E.; PLENEFISCH, J. D.; NORRIS, C. R.; PROENCA, R. B.; SPIETH, J.; GUO, C.; MASTWAL, S.; ZHU, X.; SCHEEL, J.; HEDGECOCK, E. M. 2000. Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. **Science's Compass**, **287 (5455)**: 989-994.

- IKEDA, E.; YAGI, K.; KOJIMA, M.; YAGYUU, T.; OHSHIMA, A.; SOBAJIMA, S.; TADOKORO, M.; KATSUBE, Y.; ISODA, K.; KONDOH, M.; KAWASE, M.; GO, M. J.; ADACHI, H.; YOKOTA, Y.; KIRITA, T.; OHGUSHI, H. 2008. Multipotent cells from the human third molar: Feasibility of cell-based therapy for liver disease. **Differentiation**, **76 (5)**: 495–505.
- JAIN, R.; RENTSCHLER, S.; EPSTEIN, J. A. 2010. Notch and cardiac outflow tract development. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, **1188 (1)**: 184-190.
- JO, Y. Y.; LEE, H. J.; KOOK, S. Y.; CHOUNG, H. W.; PARK, J. Y.; CHUNG, J. H.; CHOUNG, Y. H.; KIM, E. S.; YANG, H. C.; CHOUNG, P. H. 2010. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. **Tissue Engineering**, **13 (04)**: 767-773.
- JORGE-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ, P.; DE LA TONE, N.; ESCUDERO, C.; GARCÍA-PÁEZ, J. M.; BUJÁN, J.; CASTILLO-OLIVARES, J. L. 1994. Inhibition of the calcification of porcine valve tissue by selective lipid removal. **Biomaterials**, **15 (10)**: 815-820.
- KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; GOMES MASSIRONI, S. M.; PEREIRA, L. V.; CAPLAN, A. I.; CERRUTI, H. F. 2006. Isolation and characterization of sub-population of dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other key embryonic stem cells markers. **Cells Tissues Organs**, **184 (3-4)**: 105-16.
- KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; GOMES MASSIRONI, S. M.; PEREIRA, L. V.; CAPLAN, A. I.; CERRUTI, H. F. 2006. Isolation and characterization of sub-population of dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other key embryonic stem cells markers. **Cells Tissues Organs**, **184 (3-4)**: 105-16.
- KIESSLING, A. A. E ANDERSON, S. C. Human Embryonic Stem Cells. **2003. An Introduction to the Science and Therapeutic Potential. USA: Jones and Bartlett Publishers, Inc 2003: 164.**
- KIM, W.G.; PARK, J.K.; LEE, W.Y. 2002. Tissue-engineered heart valve leaflets: An effective method of obtaining acellularized valve xenografts. **Journal Artificial Organs**, **25 (8)**: 791-797.
- KNIGHT, R. L.; WILCOX, H. E.; KOROSSIS, S. A.; FISHER, J.; INGHAM, E. 2008. The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal Of Engineering In Medicine**, **222 (1)**: 129-143.
- KOIZUMI, N.; RIGBY, H.; FULLWOOD, N.; KAWASAKI, S.; TANIOKA, H.; KOIZUMI, K.; KOCIOK, N.; JOUSSEN, A.; KINOSHITA, S. 2007. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, **245 (1)**: 123-134.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227 (5259)**: 680-685.

LAI, H. Y.; YANG, M. J.; WEN, K. C.; CHAO, K. C.; SHIH, C. C.; LEE, O. K. 2010. Mesenchymal stem cells negatively regulate dendritic lineage commitment of umbilical-cord-blood-derived hematopoietic stem cells: an unappreciated mechanism as immunomodulators. **Tissue Engineering: Part A**, **16 (9)**: 2987-2997.

LE, X.; POINERN, G. E. J.; ALI, N.; BERRY, C. M.; FAWCETT, D. 2013. Engineering a biocompatible scaffold with either micrometre or nanometre scale surface topography for promoting protein adsorption and cellular response. **International Journal of Biomaterials**, **2013**: 1-16.

LIAO, J.; JOYCE, E. M.; SACKS, M. S. 2008. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. **Biomaterials**, **29 (2008)**: 1065-1074.

LLOYD-JONES, D.; ADAMS, R. J.; BROWN, T. M.; CARNETHON, M.; DAI, S.; DE SIMONE, G.; FERGUSON, T. B.; FORD, E.; FURIE, K.; GILLESPIE, C.; GO, A.; GREENLUND, K.; HAASE, N.; HAILPERN, S.; HO, P. M.; HOWARD, V.; KISSELA, B.; KITTNER, S.; LACKLAND, D.; LISABETH, L.; MARELLI, A.; MCDERMOTT, M. M.; MEIGS, J.; MOZAFFARIAN, D.; MUSSOLINO, M.; NICHOL, G.; ROGER, V. L.; ROSAMOND, W.; SACCO, R.; SORLIE, P.; STAFFORD, R.; THOM, T.; WASSERTHIEL-SMOLLER, S.; WONG, N. D.; WYLIE-ROSETT, J. 2009. Heart disease and stroke statistics-2010 update: A Report from the American Heart Association. **Circulation**, **121 (7)**: e46-e215.

MADDEN, R.; LIPKOWITZ, G.; BENEDETTO, B.; KURBANOV, A.; MILLER, M.; BOW, L. 2002. Decellularized cadaver vein allografts used for hemodialysis access do not cause allosensitization or preclude kidney transplantation. **American Journal Of Kidney Diseases**, **40 (6)**: 1240-1243.

MAGANTI, K.; RIGOLIN, V. H.; SARANO, M. E.; BONOW, R. O. 2010. Valvular heart disease: diagnosis and management. **Mayo Clinic Proceedings**, **85 (5)**: 483-500.

MAHADEVAN, V. 2008. Anatomy of the heart. **Cardiothoracic I**, **26 (12)**: 473-476.

MAUS, U.; HEROLD, S.; MUTH, H.; MAUS, R.; ERMERT, L.; ERMERT, M.; WEISSMANN, N.; ROSSEAU, S.; SEEGER, W.; GRIMMINGER, F.; LOHMEYER, J. 2001. Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but up regulate CD14. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, **280 (1)**: 58-68.

MENDELSON, K.; SCHOEN, F. J. 2006. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress and challenges. **Annals of Biomedical Engineering**, **34 (12)**: 1799-1819.

MESSIER, R. H.; BASS, B. L.; ALY, H. M.; JONES, J. L.; DOMKOWSKI, P. W.; WALLACE, R. B.; HOPKINS, R. A. 1994. Dual structural and functional phenotypes

of the porcine aortic valve interstitial population: characteristics of the leaflet myofibroblast. **Journal Of Surgical Research**, **57 (1)**: 1-21.

MEYER, S. R.; CHIU, B.; CHURCHILL, T. A.; ZHU, L.; LAKEY, J. R. T.; ROSS, D. B. 2006. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A 79A (2)**: 254-262.

MEYER, S. R.; NAGENDRAN, J.; DESAI, L. S.; RAYAT, G. R.; CHURCHILL, T.A.; ANDERSON, C.C.; RAJOTTE, R. V.; LAKEY, J. R. T.; ROSS, D. B. 2005. Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, **130 (2)**: 469-476.

MIURA. M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. 2003. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **100 (10)**: 5807–5812.

MOMTAHAN, N.; SUKAVANESHVAR, S.; ROEDER, B.; COOK, A. 2014. Strategies and processes to decellularize and recellularize hearts to generate functional organs and reduce the risk of thrombosis. **Tissue Engineering Part B: Reviews**. **21 (1)**:115-132.

MORONI, F. AND MIRABELLA, T. 2006. Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering. **American Journal of Stem Cells**, **3 (1)**:1-20.

MÜNCHEN, GERMANY: h.f.ullmann (uma impressão de Tandem Verlag GmbH), 2009. Atlas de anatomia. Título original: Atlas der anatomie. **Elsevier**. p 439.

NELSON, C. M.; BISSELL, M. J. 2006. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, **22 (1)**: 287-309.

NORTH, R.; SADLER, L.; STEWART, A.; MCCOWAN, L.; KERR, A.; WHITE, H. 1999. Long-term survival and valve-related complications in young women with cardiac valve replacements. **Circulation**, **99 (20)**: 2669-2676.

O'BRIEN, M. F.; GOLDSTEIN, S.; WALSH, S.; BLACK, K. S.; ELKINS, R.; CLARKE, D. 1999. The synergraft valve: a new acellular (nonglutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. **Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery**, **11 (4 Suppl 1)**: 194-200.

OTA, T.; TAKETANI, S.; IWAI, S.; MIYAGAWA, S.; FURUTA, M.; HARA, M.; UCHIMURA, E.; OKITA, Y.; SAWA, Y. 2007. Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation. **The Society of Thoracic Surgeons**, **83**: 1501–1507.

OTTO, C. M.; LIND, B. K.; KITZMAN, D. W.; GERSH, B. J.; SISCOVICK, D. S. 1999. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. **New England Journal of Medicine**, **341 (3)**: 142-147.

- OYOSHI, M. K.; BARTHEL, R.; TSITSIKOVET, E. N. 2006. TRAF1 regulates recruitment of lymphocytes and, to a lesser extent, neutrophils, myeloid dendritic cells and monocytes to the lung airways following lipopolysaccharide inhalation. **Immunology**, **120 (3)**: 303-314.
- PAREKH, A.; MANTLE, B.; BANKS, J.; SWARTS, J. D.; BADYLAK, S. F.; DOHAR, J. E.; HEBDA, P. A. 2009. Repair of the tympanic membrane with urinary bladder matrix. **The Laryngoscope**, **119(6)**: 1206-1213.
- PARKER, G. C.; ANASTASSOVA-KRISTEVA, M.; BROXMEYER, H. E.; DODGE, W. H.; EISENBERG, L. M.; GEHLING, U. M.; GUENIN, L. M.; HUSS, R.; MOLDOVAN, N. I.; RAO, M.; SROUR, E. F.; YODER, M. C. 2004. Stem cells: shibboleths of development. **Stem Cells and Development**, **13 (6)**: 579-584.
- PATEL, D. M.; SHAH, J.; SRIVASTAVA, A. S. 2013. Therapeutic potential of Mesenchyme stem cells in regenerative medicine. **Stem Cells International**, **2013**:1-15.
- PATNAIK, S. S.; WANG, B.; WEED, B.; WERTHEIM, J. A.; LIAO, J. 2013. Tissue regeneration: where nano-structure meets biology. Capítulo 3. 2^o Edição. **World Scientific Company**, Editora: Qing Liu, p. 77-124.
- PIERDOMENICO, L.; BONSI, L.; CALVITTI, M.; RONDELLI, D.; ARPINATI, M.; CHIRUMBOLO, G.; BECCHETTI, E.; MARCHIONNI, C.; ALVIANO, F.; FOSSATI, V.; STAFFOLANI, N.; FRANCHINA, M.; GROSSI, A.; BAGNARA, G. P. 2005. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, **80(6)**:836-842.
- PROCKOP, D. J.; KOTA, D. J.; BAZHANOV, N.; REGER, R. L. 2010. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, **14 (9)**: 2190-2199.
- RABKIN, E.; AIKAWA, M.; STONE, J. R.; FUKUMOTO, Y.; LIBBY, P.; SCHOEN, F. J. 2001. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. **Circulation**, **104 (21)**: 2525-2532.
- REING, J. E.; BROWN, B. N.; DALY, K. A.; FREUND, J. M.; GILBERT, T. W.; HSIONG, S. X.; HUBER, A.; KULLAS, K. E.; TOTTEY, S.; WOLF, M. T. 2010. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, **31 (33)**: 8626-8633.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3^o edição. Vol. 3. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York.
- SAMOUILLAN, V.; DANDURAND-LODS, J.; LAMURE, A.; MAUREL, E.; LACABANNE, C.; GEROSA, G.; VENTURINI, A.; CASAROTTO, D.; GHERARDINI, L.; SPINA, M. 1999. Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve bioprostheses. **Journal of Biomedical Materials Research**, **46 (4)**: 531-538.

SANTOS, J. L.; PANDITA, D.; RODRIGUES, J.; PÊGO, A. P.; GRANJA, P. L.; TOMÁS, H. 2011. Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. **Current Gene Therapy**, **11 (1)**: 46-57.

SCHENKE-LAYLAND, K.; RIEMANN, I.; OPITZ, F.; KÖNIG, K.; HALBHUBER, K. J.; STOCK, U. A. 2004. Comparative study of cellular and extracellular matrix composition of native and tissue engineered heart valves. **Matrix Biology**, **23 (2)**: 113-125.

SCHENKE-LAYLAND, K.; VASILEVSKI, O.; OPITZ, F.; KOONIG, K.; RIEMANN, I.; HALBHUBER, K. J.; WAHLERS, T.; STOCK, U. A. 2003. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. **Journal of Structural Biology**, **143 (2003)**: 201-208.

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

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

SCHOEN, F. J. 2011. Heart valve tissue engineering: quo vadis? **Current Opinion in Biotechnology**, **22**: 698-705.

SELLARO, T. L.; RANADE, A.; FAULK, D. M.; MCCABE, G. P.; DORKO, K.; BADYLAK, S. F.; STROM, S. C. 2010. Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liver-derived extracellular matrix gels. **Tissue Engineering Part A**, **16 (3)**: 1075-1082.

SEO, B. M.; MIURA, M.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M.; BATOULI, S.; BRAHIM, J. 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, **364 (9429)**: 149-155.

SHI, J.; DONG, N.; SUN, Z. 2007. Immobilization of RGD peptides onto decellularized valve scaffolds to promote cell adhesion. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater**, **22 (4)**: 686-690.

SHINOKA, T.; BREUER, C. K.; TANEL, R. E.; ZUND, G.; MIURA, T.; MA, P. X.; LANGER, R.; VACANTI, J. P.; MAYER JR, J. E. 1995. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. **The Annals of Thoracic Surgery**, **60**: 513-516.

SHORTT, A. J.; SECKER, G. A.; RAJAN, M. S.; MELIGONIS, G.; DART, J. K.; TUFT, S. J.; DANIELS, J. T. 2008. Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells. **Ophthalmology**, **115 (11)**: 1989-1997.

SILVA, F. S.; RAMOS, R. N.; ALMEIDA, D. C.; BASSI, E. J.; GONZALES, R. P.; MIYAGI, S. P. H.; MARANDUBA, C. P.; SANT'ANNA, O. A. B. E.; MARQUES, M. M.; BARBUTO, J. A. M.; CAMARA, N. O. S.; MARANDUBA, C. M. C. 2014.

Mesenchymal stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) induce immune modulatory profile in monocyte-derived dendritic cells. **Plos One, 9 (5):** e98050.

SIMIONESCU, D. T.; LOVEKAMP, J. J.; VYAVAHARE, N. R. 2003. Glycosaminoglycan-degrading enzymes in porcine aortic heart valves: implications for bioprosthetic heart valve degeneration. **The Journal of Heart Valve Disease, 12 (2):** 217-225.

SODIAN, R.; HOERSTRUP, S. P.; SPERLING, J. S.; DAEBRITZ, S. H.; MARTIN, D. P.; SCHOEN, F. J.; VACANTI, J. P. AND MAYER JR, J. E. 2000. Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences. **The Annals of Thoracic Surgery, 70 (1):** 140-144.

SODIAN, R.; HOERSTRUP, S. P.; SPERLING, J. S.; DAEBRITZ, S.; MARTIN, D. P.; MORAN, A. M.; KIM, B. S.; SCHOEN, F. J.; VACANTI, J. P.; MAYER, J. E. 2000. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart Valves. **Circulation, 102 (suppl 3):** 22-29.

SOMERS, P.; SOMER, F.; CORNELISSEN, M.; THIERENS, H.; VAN NOOTEN, G. 2012. Decellularization of heart valve matrices: search for the ideal balance. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 40:** 151-162.

SONG, J.J.; OTT, H.C. 2011. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. **Trends in Molecular Medicine, 17 (8):** 424-432.

SONOYAMA, W.; LIU, Y.; YAMAZA, T.; TUAN, R. S.; WANG, S.; SHI, S. 2008. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: A pilot study. **Journal of Endodontics, 34 (2):** 166-171.

SPOON, D. B.; TEFFT, B. J.; LERMAN, A.; SIMARI, R. D. 2013. Challenges of biological valve development. **Interventional Cardiology, 5 (3):** 319-334.

STAMM, C.; KHOSRAVI, A.; GRABOW, N.; SCHMOHL, K.; TRECKMANN, N.; DRECHSEL, A.; NAN, M.; SCHMITZ, K. P.; HAUBOLD, A.; STEINHOFF, G. 2004. Biomatrix/Polymer composite material for heart valve tissue engineering. **The Annals of Thoracic Surgery, 78 (6):** 2084-2093.

STEINHOFF, G.; STOCK, U.; KARIM, N.; MERTSCHING, H.; TIMKE, A.; MELISS, R. R.; PETHIG, K.; HAVERICH, A.; BADER, A. 2000. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic cellular matrix conduits in vivo restoration of valve tissue. **Circulation, 102 (suppl 3):** 50-55.

STERN, M. M.; MYERS, R. L.; HAMMAM, N.; STERN, K. A.; EBERLI, D.; KRITCHEVSKY, S. B.; SOKER, S.; VAN DYKE, M. 2009. The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo. **Biomaterials, 30 (12):** 2393-2399.

STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. 2001. Tissue engineering: current state and prospects. **Annual Review of Medicine**, **52 (1)**: 443-451.

TAYLOR, K. R.; GALLO, R. L. 2006. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. **The FASEB Journal**, **20 (1)**: 9-22.

TIRINO, V.; PAINO, F.; D'AQUINO, R.; DESIDERIO, V.; DE ROSA, A.; PAPACCIO, G. 2011. Methods for the Identification, characterization and Banking of Human DPSCs: Current Strategies and Perspectives. **Stem Cell Review**, **7 (3)**: 608-615.

VAN WIJK, X. M.; VALLEN, M. J.; VAN DE WESTERLO, E. M.; OOSTERHOF, A.; HAO, W.; VERSTEEG, E. M.; RABEN, J.; WISMANS, R. G.; SMETSERS, T. F.; DIJKMAN, H. B.; SCHALKWIJK, J.; VAN KUPPEVELT, T. H. 2012. Extraction and structural analysis of glycosaminoglycans from formalin-fixed, paraffin - embedded tissues. **Glycobiology**, **22 (12)**: 1666-1672.

VOLPI, N. 2007. Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates. **Journal of pharmaceutical sciences**, **96, (12)**: 3168- 3180.

VON WULFFEN, W.; STEINMUELLER, M.; HEROLD, S.; MARSH, L. M.; BULAU, P.; SEEGER, W.; WELTE, T.; LOHMEYER, J.; MAUS, U. A. 2007. Lung dendritic cells elicited by Fms-like tyrosin 3-kinase ligand amplify the lung inflammatory response to lipopolysaccharide. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, **176 (9)**: 892-901.

VOROTNIKOVA, E.; MCINTOSH, D.; DEWILDE, A.; ZHANG, J.; REING, J.E.; ZHANG, L. CORDERO, K.; BEDELBAEVA, K.; GOUREVITCH, D.; HEBER-KAT, E.; BADYLAK, S. F.; BRAUNHUT, S. J. 2010. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. **Matrix Biology**, **29 (8)**: 690-700.

VYAVAHARE, N.; OGLE, M.; SCHOEN, F. J.; ZAND, R.; GLOECKNER, D. C.; SACKS, M.; LEVY, R. J. 1999. Mechanisms of bioprosthetic heart valve failure: fatigue causes collagen denaturation and glycosaminoglycan loss. **Journal of Biomedical Materials Research**, **46 (1)**: 44-50.

WANG, B.; TEDDER, M. E.; PEREZ, C. E.; WANG, G.; DE JONGH CURRY, A. L.; TO, F.; ELDER, S. H.; WILLIAMS, L. N.; SIMIONESCU, D. T.; LIAO, J. 2012. Structural and biomechanical characterizations of porcine myocardial extracellular matrix. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, **23 (8)**: 1835-1847.

WEBER, M.; HETA, E.; MOREIRA, R.; GESCHE, V. N.; SCHERMER, T.; FRESE, J.; JOCKENHOEVEL, S.; MELA, P. 2014 Tissue-Engineered Fibrin-Based Heart Valve with a Tubular Leaflet Design. **Tissue Engineering Part C: Methods**, **20 (4)**: 265-275.

WELLS, W.; MALAS, M.; BAKER, C. J.; QUARDT, S. M.; BARR, M. L. 2003. Depopulated vena caval homograft: a new venous conduit. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, **126 (2)**: 498-503.

- WEYMANN, A.; SCHMACK, B.; OKADA, T.; SOÓS, P.; ISTÓK, R.; RADOVITS, T.; STRAUB, B.; BARNUCZ, E.; LOGANATHAN, S.; PÄTZOLD, I.; CHAIMOW, N.; SCHIES, C.; KORKMAZ, S.; TOCHTERMANN, U.; KARCK, M.; SZABÓ, G. 2013. Reendothelialization of human heart valve neoscaffolds using umbilical cord-derived endothelial cells. **Circulation Journal**, **77**: 207-216.
- WHITAKER, R. H. 2014. Anatomy of the heart. **Medicine**, **42 (8)**: 406-408.
- YACOUB, M. H.; KILNER, P. J.; BIRKS, E. J.; MISFELD, M. 1999. The aortic outflow and root: A tale of dynamism and crosstalk. **Annals of Thoracic Surgery**, **68 (3, Suppl)**: S37-S43.
- YAMAZA, T.; KENTARO, A.; CHEN, C.; LIU, Y.; SHI, Y.; GRONTHOS, S.; WANG, S.; SHI, S. 2010. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Stem Cell Therapy Research**, **1 (5)**: 1-10.
- YU, B.-T.; LI, W.-T.; SONG, B.-Q.; WU, Y.-L. 2013. Comparative study of the Triton X-100-sodium deoxycholate method and detergent enzymatic digestion method for decellularization of porcine aortic valves. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, **17**: 2179-2184.
- ZEHR, K. J.; YAGUBYAN, M.; CONNOLLY, H. M.; NELSON, S. M.; SCHAFF, H. V. 2005. Aortic root replacement with a novel decellularized cryopreserved aortic homograft: Postoperative immunoreactivity and early results. **The Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery**, **130 (4)**: 1010-1015.
- ZILLA, P.; BRINK, J.; HUMAN, P.; BEZUIDENHOUT, D. 2008. Prosthetic heart valves: Catering for the few. **Biomaterials**, **29 (4)**: 385-406.
- ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, **13 (12)**: 4279-4295.
- ZÜND, G.; BREUER, C. K.; SHINOKA, T.; MA, P. X.; LANGER, R.; MAYER, J. E.; VACANTI, J. P. 1997. The in vitro construction of a tissue engineered bioprosthetic heart valve. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, **11 (3)**: 493-497.
- ZÜND, G.; HOERSTRUP, S. P.; SCHOEBERLEIN, A.; LCHAT, M.; UHLSCHMID, G.; VOGT, P. R.; TURINA, M. 1998. Tissue engineering: A new approach in cardiovascular surgery; seeding of human fibroblasts followed by human endothelial cells on resorbable mesh. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, **13 (2)**: 160-164.