



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

WESLEY ROGÉRIO NEGRI

**MEMBRANA AMNIÓTICA COMO FONTE DE BIOMATERIAL:  
DOS MÉTODOS EMPREGADOS ÀS APLICAÇÕES *IN VIVO***

---

Londrina  
2023

WESLEY ROGÉRIO NEGRI

**MEMBRANA AMNIÓTICA COMO FONTE DE BIOMATERIAL:  
DOS MÉTODOS EMPREGADOS ÀS APLICAÇÕES *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron.

Londrina  
2023

WESLEY R. NEGRI

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

N391m Negri, Wesley Rogério.  
Membrana amniótica como fonte de biomaterial : dos métodos empregados às aplicações in vivo / Wesley Rogério Negri. - Londrina, 2023.  
59 f. : il.

Orientador: Phelipe Oliveira Favaron.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2023.  
Inclui bibliografia.

1. Biomateriais - Tese. 2. Medicina Regenerativa - Tese. 3. Bioengenharia - Tese. 4. Citologia - Tese. I. Oliveira Favaron, Phelipe. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 574.6:61

WESLEY ROGÉRIO NEGRI

**MEMBRANA AMNIÓTICA COMO FONTE DE BIOMATERIAL:  
DOS MÉTODOS EMPREGADOS ÀS APLICAÇÕES *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Phelipe Oliveira  
Favaron  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Guilherme Schiess Cardoso  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 15 de junho de 2023.

## DEDICATÓRIA

*Dedico...*

*Com todo amor aos meus pais Marzio e  
Sidnéia, pelo amor, incentivo e confiança.*

WESLEY R. NEGRI

*Aos meus Avós,  
Pelo suporte e sabedoria  
compartilhada.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular e a CAPES pela oportunidade oferecida e apoio financeiro

A todos os professores do Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, que contribuíram com seus conhecimentos para a minha formação acadêmica.

Ao meu orientador, professor Phelipe Oliveira Favaron, pela paciência e compreensão, assim como os conhecimentos compartilhados.

À Banca Examinadora, meu muito obrigado pelas valiosas contribuições, que colaboraram para a melhoria desse trabalho.

À coordenação do programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pela compreensão e oportunidade.

Aos técnicos de laboratório, Carlos e Melyssa pela disponibilidade e ajuda

NEGRI, Wesley Rogério. **Membrana amniótica como fonte de biomaterial: dos métodos empregados às aplicações *in vivo***. 2023. 59 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

## RESUMO

O transplante de órgãos é uma técnica que pode salvar vidas e reduzir a severidade de várias doenças; entretanto, a disponibilidade de órgãos para transplantes é muito inferior à demanda dos pacientes, especialmente na medicina humana. Este é um problema que já existe há várias décadas, mas que se tornou pior devido a pandemia de COVID-19, com bancos de órgãos em grave déficit. Com isso em vista, são necessárias cada vez mais alternativas à doação de órgãos. Uma delas é a produção de materiais biológicos semissintéticos por meio do método de descclularização principalmente de estruturas frequentemente descartadas, tais como placentas e membranas amnióticas. Este trabalho visa à revisão de artigos salientando a descclularização de membranas amnióticas e outros órgãos através da aplicação em vários métodos de descclularização. Espera-se que após a revisão, tenha-se uma maior compreensão sobre os métodos eficazes e suas aplicações atuais na medicina regenerativa humana ou veterinária.

**Palavras-chave:** Âmnion; Scaffold; Bioengenharia; Descclularização; Biomateriais.

NEGRI, Wesley, Rogério. **Amniotic membrane as a source of biomaterial:** from the methods employed to *in vivo* applications. 2023. 59 p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

## **ABSTRACT**

Organ transplantation is a technique that can save lives and reduce the severity of various diseases. However, the availability of organs for transplantation is much lower than patient demand, especially for human medicine. This is a problem that has existed for several decades, but which has become worse due to the COVID-19 pandemic, with organ banks in serious deficit. With this in mind, more and more alternatives to organ donation are needed. One of them is the production of semi-synthetic biological materials through the method of decellularization, in particular frequently discarded structures, such as placentas and amniotic membranes. This research aimed to review articles emphasizing the decellularization of amniotic membranes and other organs through the application of various methods of decellularization. It is expected that after the review, there will be a greater understanding of effective methods and their current applications in human or veterinary regenerative medicine.

**Key-words:** Amnion; Scaffold; Bioengineering; Decellularization; Biomaterials.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Número absoluto de transplantes realizados em território nacional nos últimos 10 anos ..... 19
- Figura 2** – Esquema de produção de scaffolds através da descelularização. O órgão descelularizado gera um arcabouço de matriz extracelular que pode ser recelularizado com células do receptor ..... 21
- Figura 3** – Esquema da estrutura das membranas fetais ..... 27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Metodologia de pesquisa e filtragem para a produção do artigo de revisão.....	30
<b>Tabela 2</b> – Órgãos comumente utilizados em processos de descelularização .....	38
<b>Tabela 3</b> – Métodos utilizados em descelularizações de membranas amnióticas.....	39
<b>Tabela 4</b> – Agentes descelularizantes e concentrações que promoveram desnudamento insatisfatório .....	41

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Transplantes de órgãos</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Transplantes de tecidos na medicina veterinária</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Produção de scaffolds biológicos</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>Métodos de decelularização</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5</b>	<b>Matriz extracelular</b> .....	<b>24</b>
<b>2.6</b>	<b>Membrana Amniótica</b> .....	<b>25</b>
<b>2.7</b>	<b>Aplicação na medicina veterinária</b> .....	<b>27</b>
<b>2.8</b>	<b>Medicina Translacional</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO FINAL</b> .....	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>

## 1. Introdução

O corpo humano representa uma das máquinas mais complexas e elegantes da natureza. A funcionalidade uníssona dos órgãos que compõem o organismo mantém os indivíduos da espécie vivos. Entretanto, quando um órgão falha, seja por doenças ou por lesões traumáticas, todo o funcionamento adequado (homeostase) fica comprometido. Para reverter situações em que o órgão está danificado, além da capacidade de reparo, a medicina moderna conta com transplantes de órgãos, na maioria das vezes, alogênicos. Durante as décadas de 1950 e 1960, o mundo assistiu os primeiros transplantes bem sucedidos. Em 1954, ocorreu o primeiro transplante de rins entre dois gêmeos idênticos, em 1963, James Hardy realizou o primeiro transplante de pulmão; em 1966, o primeiro transplante de fígado e em 1967, Christiaan Bernard transplantou com sucesso um coração (RANA et al, 2015).

Há, entretanto, algumas condições e critérios que precisam ser seguidos antes que um órgão possa ser transplantado. Além da viabilidade do mesmo, o receptor do órgão deve ser compatível com o seu doador. Caso não o seja, haverá rejeição. A rejeição é caracterizada pela atividade das células T do receptor que reconhecem os antígenos do órgão transplantado. O reconhecimento gera células de memória que levam a rejeição aguda do órgão, e possivelmente à perda do transplante (ZHUANG et al, 2016). Além disso, a diferença entre quantidade de pessoas que esperam órgãos para transplante e doadores dispostos a atender a demanda é bastante desigual, com a fila de pacientes podendo chegar a 100,000 pessoas (HRSA, 2016). Para evitar obstáculos dessa natureza, há algumas alternativas que vêm sendo empenhadas na área de transplantes, como a terapia com células tronco e a produção de órgãos semissintéticos.

Além de terapias celulares, células tronco podem ser utilizadas para a pesquisa e fabricação de tecidos e órgãos semissintéticos. Uma das vertentes de estudo sobre o assunto é a descclularização de órgãos para a produção de *scaffolds* biológicos, arcabouços de proteínas, os quais são obtidos a partir da matriz extracelular (CRAPO et al., 2011). Os *scaffolds* em conjunto com moléculas sinalizadoras são responsáveis por dar suporte bioquímico e estrutural para a confecção do novo tecido celular. Para a criação de um *scaffold* a partir de um órgão, é necessário a descclularização do mesmo, removendo inclusive traços de materiais genéticos (BADYLAK et al, 2015). Isso pode ser atingido utilizando-se técnicas físicas, químicas ou enzimáticas para a remoção de células. Dentre essas, os métodos químicos e enzimáticos representam os meios mais utilizados para a descclularização adequada e bem sucedida. A metodologia química geralmente se baseia no uso de detergentes para a remoção celular. Os detergentes mais populares para esse propósito, atualmente, são o Triton X (Triton X-100, Triton X-200) e o dodecil sulfato de sódio (SDS) (MENDIBIL et al, 2020).

É ideal que se conservem as propriedades mecânicas do órgão e a matriz extracelular,

pois esta dará suporte físico e biológico para a formação do novo tecido funcional por meio do processo de recelularização (GILPIN & YANG, 2017). A recelularização desses *scaffolds* pode se dar por meio da utilização de células de tecido específico ou de células tronco embrionárias, por exemplo (HILLEBRANDT et al, 2019). Atualmente, há interesse cada vez maior nos processos de descclularização e na exploração desta linha de estudo na medicina regenerativa translacional.

Vários órgãos e tecidos já foram descclularizados com sucesso e estão descritos na literatura. Para citar alguns, ossos desmineralizados e descclularizados (BRACEY et al, 2018); implantes alogênicos e xenogênicos de tecido adiposo descclularizado para regeneração foram usados com sucesso em testes pré-clínicos e clínicos (HEMMRICH & von HEIMBURG, 2006; GIRANDON et al, 2011; ONNELLY et al, 2020); produção de pulmões bioartificiais pela recelularização da MEC pulmonar e de outros tecidos relacionados ao sistema respiratório com células endoteliais e epiteliais e implantação desses órgãos *in vivo* (GIRALDO-GOMES et al, 2016; ERSHADI et al, 2018). O fígado com sua MEC preservada após a descclularização demonstram boa biocompatibilidade e neovascularização quando implantados *in vivo* (MAZZA et al, 2015; 2017). Alguns estudos demonstraram também a capacidade de *scaffolds* derivados de tecido nervoso promoverem crescimento e regeneração de conexões de nervos periféricos em ratos (BAIGUERA et al, 2014; HEIKKINEN et al, 2014). Além dos estudos preliminares ilustrados anteriormente, há um grande número de *scaffolds* comerciais que são amplamente utilizados na medicina regenerativa, sendo os mais comuns fragmentos de tecidos descclularizados usados para a implantação e formação tecidual (BADYLAK et al, 2009; FOLLI et al, 2018).

A escolha do órgão que será descclularizado também é um ponto relevante, inclusive por conta da obtenção de tais amostras. Recentemente, atenção especial vem sendo dada à produção de *scaffolds* por meio do método de descclularização de estruturas frequentemente descartadas, tais como a placenta e as membranas extraembrionárias, por exemplo, a membrana amniótica (FAVARON et al., 2019; BRIGIDO et al., 2018; ANUNCIÇÃO et al., 2017; LEONEL et al., 2017).

Morfologicamente, o âmnio é uma membrana fina, delgada e avascular, possuindo propriedades anti-inflamatórias, propriedades imunomodulatórias e alta taxa de proliferação (FAVARON et al., 2015). A obtenção de diferentes linhagens de células tronco a partir da membrana amniótica já é bastante conhecida (BORGHESI et al., 2019), inclusive suas células tem sido empregadas no tratamento de diferentes lesões e doenças, como para o tratamento de células tumorais (BORGHESI et al., 2020). Muitos estudos na área de engenharia tecidual e biomateriais foram feitos usando as membranas fetais como sujeitos experimentais. O primeiro uso das membranas fetais foi em um enxerto de pele realizado por Davis, em 1910. Após isso, essas membranas foram usadas para vários propósitos clínicos como cicatrização, curativos para

queimaduras, reconstrução de tecidos de bexiga, tímpano, artérias, vagina e muitos outros (FERNANDES et al ,2005). A membrana amniótica é especialmente usada para a produção de *scaffolds*, uma vez que sua MEC nativa é ideal para a proliferação celular e redução de inflamações.

Nos últimos anos, a Medicina Veterinária tem avançado muito no que diz respeito ao diagnóstico e tratamento de doenças, inclusive empregando novos tratamentos relacionados à Medicina Regenerativa. Além disso, num contexto de Medicina Translacional, os modelos animais tem representado um papel fundamental e crescente para os avanços de tratamentos inovadores.

Assim, o objetivo dessa dissertação é produzir um artigo de revisão que sumarie as principais técnicas e produtos utilizados em procedimentos de descelularização de tecidos, principalmente da membrana amniótica. Os resultados obtidos contribuirão para maior compreensão de técnicas de biotecnologia tanto para a Medicina Veterinária quanto para a Medicina Humana.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Transplantes de órgãos**

Segundo a lei de doação de órgãos brasileira (art. 4º, Lei n. 9.434), é a família do possível doador que deve decidir ou não sobre a disponibilidade dos órgãos de seu parente para o eventual transplante. Além da privação da autodeterminação do doador prevista na lei, há o componente religioso que preza a sacralidade do corpo mesmo após a morte, contribuindo para a escassez dos órgãos elegíveis para transplantes. Esses dois obstáculos se configuram como um dos problemas sociais de natureza meta-legal na doação de órgãos (STANCIOLI et al, 2011).

Atualmente os transplantes são divididos em vários tipos, classificados segundo a combinação doador-receptor. O transplante autólogo diz respeito ao transplante de órgãos ou tecidos de uma parte do corpo para outra, do mesmo indivíduo, sendo ele o doador e o receptor; é um transplante muito comum em tecidos como sangue, ossos e pele. A doação autóloga de sangue intraoperativo e pós-operativo é um método de autotransfusão no qual sangue da cavidade do paciente ou sangue perdido durante a cirurgia pode ser recuperado através de métodos mecânicos e transferido novamente para o paciente, evidentemente pode ser considerado uma forma de transplante autólogo de sangue (ZHOU, 2016). O método, entretanto, tem algumas limitações, uma vez que pacientes com problemas cardíacos ou crianças não podem doar grandes quantidades de sangue (HWANG et al, 2018). Além do sangue, órgãos e tecidos podem ser passíveis de transplantes autólogos, geralmente os transplantes são precedidos de cirurgias *ex-vivo* como, por exemplo, ressecção e autotransplante de fígado contendo tumores

hepáticos (ZAWISTOWSKI et al, 2020); implantação de rins após nefrectomia realizada *ex-vivo* para retirada de tumores renais (JANSSEN et al, 2018); Outros órgãos também foram auto transplantados com sucesso seguindo cirurgia *ex-vivo* como coração, pulmões e intestino (CIUBOTARU et al, 2015).

Transplantes xenogênicos são transplantes em que indivíduos de espécies diferentes são doador e receptor de tecidos e órgãos. Apesar de ser muito mais comum em dias atuais, o xenotransplante é uma ideia antiga, com tentativas ainda no século XVII, de transfusão de sangue entre duas espécies (COOPER et al, 2017). Os avanços no xenotransplantes foram muito mais proeminentes a partir do início do século XXI com a produção de animais geneticamente modificados incapazes de fabricar antígenos que inviabilizariam os transplantes (COOPER et al, 2016). Sabe-se que *grafts* baseados em tecido cardíaco de porcos geneticamente modificados podem ser transplantados e conferir sobrevivência de longo termo em primatas não humanos (MOHIUDDIN et al, 2016). Recentemente, é cada vez mais próxima a possibilidade de transplantes de rins xenogênicos, uma vez que diversos grupos de pesquisas foram capazes de prolongar a vida de primatas para além dos usuais 90 dias após o procedimento (HIGGINBOTHAM et al, 2015; IWASE et al, 2015). Transferência de células específicas também foi realizada utilizando o xenotransplante. Por exemplo, hepatócitos foram transplantados em modelos de babuínos com falha hepática fulminante, em que essas células microencapsuladas forneceram suporte funcional temporário (MACHAIDZE et al, 2017).

Transplantes alogênicos se referem à transferência de órgãos, tecidos e sangue de um indivíduo para outro da mesma espécie, não sendo ambos necessariamente idênticos geneticamente. A maioria dos transplantes realizados é deste tipo. O transplante de rim é talvez o transplante de órgão sólido mais bem sucedido e praticado em todo mundo; desde 1970 houve pelo menos 270.000 procedimentos envolvendo este transplante, adicionando ao todo uma marca impressionante de 1.18 milhões de anos extras ao total de pacientes beneficiados (4.4 anos por paciente). A média de vida entre os transplantados é de 12.4 anos, comparados a apenas 5.4 entre aqueles que ainda esperam o transplante (OPTN, 2017). Transplantes de fígado provenientes de cadáveres quadruplicam a expectativa de vida dos recipientes. Na área pediátrica, o transplante hepático aumenta a duração de vida em 25 anos (RANA & GODFREY, 2019).

Apesar de o transplante alogênico oferecer soluções bastante eficientes para as patologias que afetam os órgãos, ainda há dois grandes problemas que devem ser superados neste tipo de transplante: o baixo número de doadores de órgãos e a rejeição do órgão pelo organismo recipiente. Em 2017, o Brasil apresentou 3.415 doadores efetivos, com a taxa média de 16,6 PMP, sendo a região sul e sudeste os representantes do maior número de doadores, com 34,1 e 17,9 PMP, respectivamente. O Brasil realizou em 2017, um total de 8.642 transplantes. Entretanto, no final daquele ano, 32.402 pacientes aguardavam na fila de espera por órgãos, com

1039 pacientes pediátricos também aguardando um órgão. Somente em 2017, o déficit de órgãos chegou a 15.590. Em comparação, a Espanha, líder mundial em transplantes de órgãos, teve no mesmo ano uma taxa igual a 46,9 doadores PMP. Em 2015 a Espanha atingiu o índice de 100,7 pacientes transplantados por milhão de pessoas, muito acima da média europeia de 62,4 PMP (COELHO & BONELLA, 2019).

Um dos principais fatores para o baixo número de doadores de órgãos é a recusa familiar, representando 45.3% das causas para não doação de órgãos. Este obstáculo poderia ser solucionado se o doador expressasse o desejo de doação em vida e se houvesse um registro nacional de doadores, comprometendo-se assim com a doação de órgãos *post mortem* (BERTASI et al, 2019). Por exemplo, um estudo holandês mostrou que se o doador tivesse registro expressando seu desejo de doação, a taxa de doação seria de 94%, comparado a apenas 23% se esta escolha fosse deixada exclusivamente para a família (GROOT et al, 2015).

O outro grande problema envolvendo o transplante alogênico é a rejeição de órgãos por parte do receptor. Este fenômeno se dá pela resposta imune adaptativa e inata quando confrontadas com um corpo geneticamente estranho. Os aloantígenos HLA (complexo de imuno histocompatibilidade) I e II presentes no órgão doado são reconhecidos pelas células dendríticas do receptor que degradam e apresentam esses antígenos para as células T e B, ativando-as. As células T então ativadas produzem citocinas como a IL-2 para auxiliar na diferenciação e proliferação deste tipo celular (PONTICELLI, 2011). Para contornar o problema muitas vezes se recorre a imunossuppressores; entretanto, a imunossupressão abre espaço para infecções oportunistas e desenvolvimento de tumores. Há estudos que analisam a terapia genética, desligando genes envolvidos na rejeição de órgãos (YANG & SARWAL, 2017). Porém esta metodologia ainda não está sendo utilizada clinicamente. Temos, portanto, além do problema social da doação de órgãos, obstáculos biológicos que muitas vezes comprometem a prática de transplantação.

Recentemente, com a pandemia de COVID-19 que assolou o mundo nos últimos dois anos, houve grande queda no número de doadores e de transplantes realizados; sobretudo no Brasil, onde tivemos um dos piores cenários da pandemia, com colapso do sistema de saúde e suspensão de cirurgias gerais, inclusive de transplantes. No primeiro trimestre de 2021 houve queda de 26% na taxa de doadores de órgãos, agravando ainda mais um banco que já sofre de déficit de órgãos. Transplantes de pulmão sofreram queda de 62%, de rim 34%, de coração 34%, de fígado 28% e de pâncreas 5%. A lista de espera para órgãos como rim cresceu 4.2% e os óbitos em lista aumentaram 40% (ABTO, 2021). A figura 1 ilustra um gráfico do número absoluto de transplantes realizados no Brasil nos últimos 10 anos. Podemos notar que com o início da pandemia em 2020, esses procedimentos foram severamente afetados, especialmente o transplante de rim.

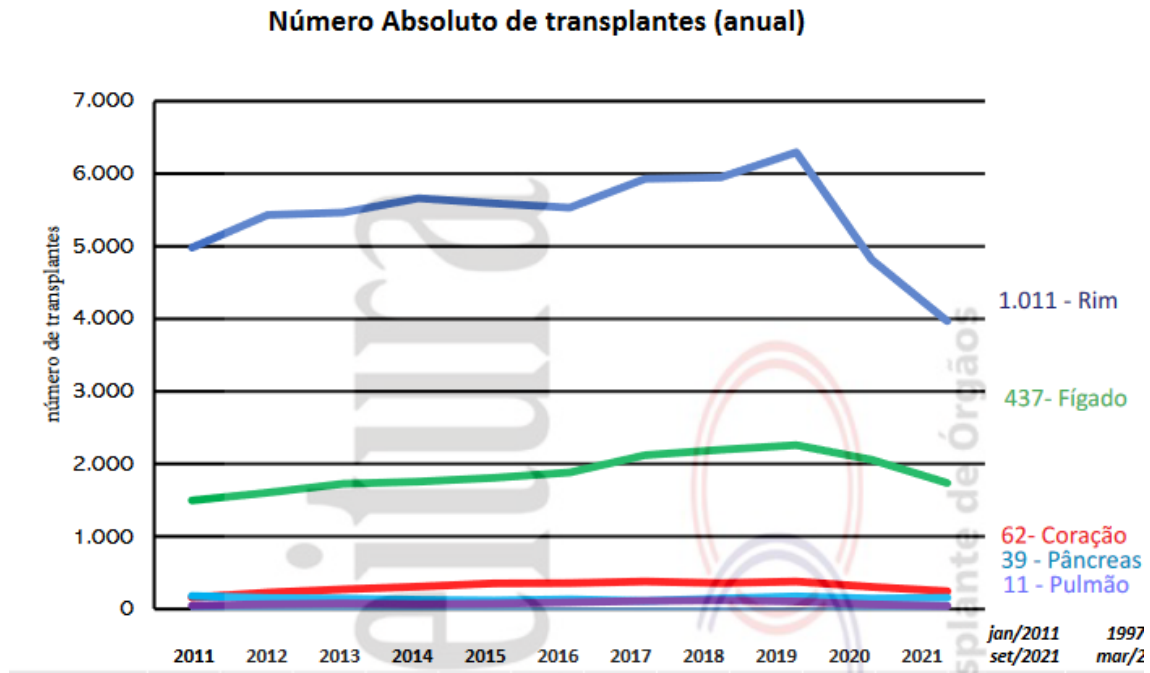


Figura 1: Número absoluto de transplantes realizados em território nacional nos últimos 10 anos. FONTE: ABTO, 2021

Diante de tantos obstáculos referentes ao transplante de órgãos, alternativas na medicina regenerativa tornam-se cada vez mais necessárias. Atualmente temos estudos em terapias celulares com o uso de células tronco cultivadas e pré-diferenciadas em laboratório para o tratamento de diversas patologias do corpo humano; próteses artificiais ou provenientes de outros animais também marcam presença na medicina moderna; e cada vez mais vem crescendo os estudos referentes ao desenvolvimento e uso de biomateriais. Entre eles, a matriz extracelular de órgãos descelularizados fornece um microambiente propício à recelularização com células que melhor atendem a demanda daquela patologia ou situação, possibilitando a criação de órgãos ou tecidos semissintéticos.

## 2.2 Transplantes de tecidos na medicina veterinária

A medicina veterinária enfrenta problemas ainda maiores quando comparados aos transplantes na área médica humana. Além do déficit de órgãos que também é presente, não há a rotatividade de órgãos observada na medicina humana com doadores documentando sua intenção e disponibilidade para doação, agilizando o processo. Entretanto, isso não significa que não haja transplantes nessa área. O transplante de rim já está bem estabelecido e amplamente utilizado principalmente em gatos domésticos, que inerentemente apresentam vulnerabilidade renal; embora o transplante de órgãos em cães ainda esteja em fase de experimentação com sucesso bastante reduzido se comparado aos felinos (OLIVEIRA et al, 2019).

A falta de órgãos e a rejeição são problemas que constituem uma barreira ainda mais difícil de transpor na medicina veterinária do que na humana. Embora outras metodologias sejam cada vez mais desenvolvidas, principalmente para procedimentos cirúrgicos de animais domésticos, como por exemplo, a impressão de um modelo de coração 3D com células, vasos sanguíneos, ventrículos e artérias (AIMAR et al, 2019).

Além da necessidade de alternativas para órgãos inteiros, existem outras patologias de tratamentos complicados que podem acometer animais. A exemplo, fraturas ósseas causadas por fatores ambientais como trauma ou genéticos, como a displasia coxofemoral (MACARIO & SACATA, 2021). Em qualquer natureza, fraturas ósseas podem ser de difícil regeneração principalmente se houverem alterações em fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e união fibrocartilaginosa. Nesses casos, podem ser utilizados enxertos ósseos para uma melhor recuperação. Se esses enxertos forem provenientes do próprio organismo, a resposta imunológica é baixa e a recuperação acelerada (RODRIGUES et al, 2020).

### **2.3 Produção de *Scaffolds* biológicos**

Um *scaffold* biológico se refere a um biomaterial proveniente de órgãos ou tecidos de origem animal ou humano decelularizados. Geralmente são derivados de matriz extracelular e podem ser aplicados a diversos propósitos. Para a obtenção desses *scaffolds*, muitas vezes é usada a técnica da descelularização, na qual o órgão ou o tecido é degradado por técnicas que explanaremos posteriormente, e simultaneamente repovoado com células do futuro recipiente do biomaterial. Muitos são os usos para esses biomateriais, mais comumente temos o uso de biomateriais derivados de tecidos para o reparo de hérnia, reconstituição de mama e de outros tecidos moles (RAMSHAW et al, 2007; BREUING et al, 2007; HILES et al, 2009; ZIENOWICZ et al, 2007). Evidentemente, a grande vantagem do uso deste tipo de *scaffold* é que não há a necessidade da utilização de material alogênico ao indivíduo, uma vez que o biomaterial é feito com suas próprias células; diminuindo consideravelmente o risco de inflamações ou rejeições (DEEKEN et al, 2012).

Quando falamos em biomateriais, podemos considerar os biomateriais sintéticos e aqueles derivados de tecidos naturais. Os materiais naturais apresentam algumas vantagens importantes sobre os sintéticos. Esses materiais são compostos de polipeptídeos, polissacarídeos, e componentes da MEC; assim sendo, apresentam excelente atividade fisiológica, como adesão seletiva de células, através da fibrina e colágenos; propriedades mecânicas semelhantes às naturais e biodegradabilidade. A grande desvantagem de biomateriais sintéticos é a falta de sinais de reconhecimento celular provenientes da MEC natural; esses sinais são essenciais para regular a proliferação celular e expressão gênica das células que estão aderidas à MEC. Nesse sentido, um biomaterial sintético deve, além da biocompatibilidade, ter implantado em si peptídeos que

controlam o reconhecimento celular. Entretanto, isso não significa que os biomateriais naturais não tenham limitações próprias. Quando implantados *in vivo*, podem surgir deficiências como risco de infecção viral, imogenicidade e deterioração precoce do material (ROSSO et al, 2005). Além da possibilidade de biomateriais derivados de tecidos, há cada vez mais interesse na produção de órgãos inteiros de forma semissintética através do processo de descclularização. Esta técnica promove a criação de arcabouços de matriz extracelular tridimensionais de órgãos em sua integridade, que podem ser recelularizados posteriormente (HE & CALLANAN, 2013). A figura 2 mostra o esquema da produção de *scaffolds* baseados em órgãos inteiros. O primeiro órgão complexo a ser descclularizado gerando *scaffolds* de órgãos inteiros foi conquistado por Ott e colaboradores, que em 2008 conseguiram produzir a MEC descclularizada de coração (OTT et al, 2008). A partir dos anos que se seguiram, outros órgãos de animais e humanos também foram descclularizados com sucesso. Entre eles podemos citar rins (ROSS et al, 2009; 2012), pulmões (OTT et al, 2011; PETERSEN et al, 2010), fígado (BAPTISTA et al, 2011) e pâncreas (GOH et al, 2013).

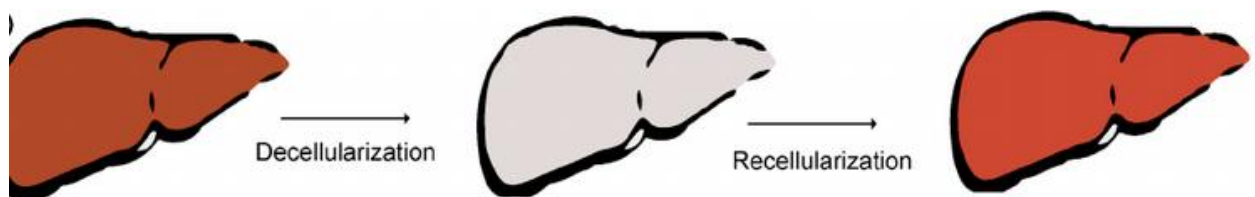


Figura 2: Esquema de produção de *scaffolds* através da descclularização. O órgão descclularizado gera um arcabouço de matriz extracelular que pode ser recelularizado com células do receptor. FONTE: HILLEBRANDT et al, 2019.

Alguns requisitos são essenciais para um *scaffold* adequado. Três são bastante importantes, sendo biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedade mecânica. A biocompatibilidade adequada é atingida uma vez que o *scaffold* apresenta células que se aderem, funcionem normalmente, migrem através do *scaffold* e provoquem quase nenhuma reação imunológica. Evidentemente, este é o requisito primário para o uso clínico desses biomateriais. Biodegradabilidade é de igual importância, pois o propósito principal do *scaffold* é apenas promover suporte para a proliferação celular e regeneração tecidual, desta maneira, espera-se que o biomaterial seja substituído pelas células do próprio recipiente. É importante também que os subprodutos da degradação do biomaterial não sejam tóxicos e não apresentem risco ao organismo em que foi implantado. Por fim, a propriedade mecânica adequada representa a qualidade física do biomaterial; que deve ser favorável ao local anatômico de implantação e resistente para permitir o manuseio durante a cirurgia. Essas propriedades são difíceis de atingir, especialmente em *scaffolds* de ossos e tecidos cardiovasculares, pois a integridade mecânica

muitas vezes não resiste até o momento do remodelamento tecidual (O'BRIEN, 2011).

Um dos desafios na produção de *scaffolds* é maximizar a regeneração de um órgão ou tecido específico, para isso é necessário um design que seja compatível com a hierarquia e complexibilidade dos elementos da versão funcional do tecido. Assim sendo, há desafios quando a tecnologia de produção de *scaffolds* adentra a área comercial ou industrial. Para uma dada tecnologia obter sucesso no mundo comercial, é imperativo que ela tenha 3 características principais, sendo elas: grande nicho de possibilidades de aplicação nas mais diversas áreas possíveis; uma forte publicação científica que evidencie a solidez do produto nos testes pré clínicos e clínicos; e uma patente eficiente no sentido de garantir a exclusividade da tecnologia e dos novos métodos que surgem a partir dela. Além disso, a tecnologia deve apresentar relativa facilidade na sua reprodutibilidade e manufatura, e a companhia deve sempre considerar o potencial da tecnologia, atrelado com o custo e a possibilidade de reembolso (WEBBER et al, 2015).

Para trazer produtos farmacêuticos ou médicos para o mercado, é necessário desembolsar quantias financeiras razoavelmente altas. Estima-se que uma empresa farmacêutica gasta em media 850 milhões de dólares para trazer uma nova droga ou tecnologia ao mercado, valor esse que pode subir para 1.8 bilhão de dólares depois da capitalização. No caso de tecidos produzidos através da bioengenharia, dados mostram que a venda desses produtos triplicaram desde a segunda metade dos anos 2000, arrecadando um total de 3.5 bilhões de dólares por ano, em contraste com o gasto semelhante das empresas e o emprego de mais de 14.000 funcionários na área (JAKLENEC, 2012).

Os *scaffolds* também apresentam limitações, como todo estudo preliminar. Para prática clínica, essas peças costumam ser custosas financeiramente, compreendendo uma faixa de menos de 10\$/cm<sup>2</sup> a mais de 30\$/cm<sup>2</sup>. Como esses materiais são produzidos em tamanhos limitados, muitas vezes requerem mais de um produto para reparar danos extensos (DEEKEN et al, 2012). Outra limitação, desta vez de cunho biológico, é a presença de reminentes celulares, nucleares e químicos em *scaffolds* provenientes de processos de decelularização. Esses resquícios podem desencadear processos imunológicos se implantados em seres vivos. Dependendo da concentração de detergentes e do método utilizado para o processo de decelularização, é necessário também considerar os eventuais danos que podem estar presentes no material final. Danos como a disrupção de fibras de colágeno e destruição de fatores de crescimento da MEC podem comprometer a qualidade e o uso do *scaffold*. Para evitar certos problemas que surgem a partir desses fatores, é recomendável o uso de métodos para identificar a integridade da MEC resultante do processo e a análise do conteúdo de material nuclear restante no produto final (CHAKRABORTY et al, 2019).

Além disso, pode haver limitações religiosas por parte de alguns pacientes, que apresentam preocupações quanto à implantação de tecido de origem animal ou humana em seu

corpo (DEEKEN et al, 2012). Diante desses obstáculos, cada vez mais se tem buscado a otimização da produção e uso de *scaffolds*.

## 2.4 Métodos de descelularização

O processo de descelularização se caracteriza como sendo metodologias que removem células e ácidos nucleicos (DNA e RNA) de um órgão ou tecido específico, deixando para trás apenas a ultraestrutura nativa da matriz extracelular e suas proteínas constituintes. A preservação da matriz extracelular é de suma importância para o futuro *scaffold*, uma vez que será este arcabouço proteico que dará suporte para a implantação e proliferação de células. O processo completo pode ser dividido entre três fases distintas: *wash*, *rinse* e *sterilization*. Durante a fase de *washing*, são utilizados agentes químicos, físicos ou enzimáticos para a lise celular e desmantelamento do tecido ou órgão. *Rinse* se refere à fase de enxágue da matriz extracelular agora descelularizada, a fim de remover qualquer resíduo de detergentes ou eventuais contaminantes. Por fim, a fase de *sterilization* remove qualquer bactéria ou agentes antigênicos para evitar processos imunogênicos e de rejeição por parte do recipiente (CHOUDHURY et al, 2020).

Talvez a fase mais importante para o processo de produção de *scaffolds* seja a fase de descelularização, ou seja, a fase de *wash*. Há vários tipos de componentes que removem todos os componentes celulares e moleculares com sucesso; podendo ser divididos em 3 categorias: químicos, biológicos e físicos. Os químicos geralmente se utilizam de detergentes para a lise celular, podendo ser surfactantes iônicos ou não-iônicos; Os detergentes SDS (sodium dodecyl sulfate) e TRITON X-100 são os mais comumente utilizados. Os métodos biológicos funcionam quase da mesma forma, com a diferença de que são utilizadas enzimas e nucleases para lise e digestão celular. Os métodos físicos por sua vez alteram o tecido através de cortes ou processamento de partes indesejadas (CRAPO et al, 2011).

SDS é um detergente iônico amplamente utilizado nos processos de descelularização, conseguindo remover não só componentes celulares, mas também componentes nucleares e outros resquícios eficientemente (ALIZADEH et al, 2019). Os átomos de carbono da substância estão ligados a grupos sulfato conferindo ao detergente propriedade anfipática. Sua capacidade de remover proteínas nucleares se deve principalmente à ação do composto em romper as ligações não covalentes causando a desnaturação protéica (WATANABE et al, 2005). O detergente, porém, pode gerar alguns efeitos citotóxicos, uma vez que a remoção completa do composto é bastante complicada, deixando para trás resíduos que resistem aos processos de enxágue (CEBOTARI et al, 2010).

As metodologias pelas quais o detergente ou outro composto orgânico é infundido ao órgão para causar a descelularização, podem ser divididas em dois grandes grupos:

descelularização baseada em perfusão e descclularização baseada em imersão. A escolha de um método sobre outro irá depender dos parâmetros do experimento, entre eles, consideram-se o tipo de reagente utilizado, sua concentração, o tempo de exposição a ele, o pH do reagente e a temperatura (FERNANDEZ-PERES et al, 2019).

Não há ainda um consenso sobre a concentração do detergente nem sobre o tempo de exposição quando falamos em descclularização por imersão. Becker et al (2018) conseguiram resultados positivos ao descclularizar membranas amnióticas humanas para aplicações na cardiologia. Os autores usaram o detergente SDS em concentração de 0.5% no qual a membrana amniótica ficou imersa por 4 horas em temperatura ambiente (BECKER et al, 2018). Por outro lado o uso de apenas 0.03% de SDS também promoveu descclularização adequada em outro estudo; conservando as propriedades mecânicas da matriz extracelular nativa e a presença dos colágenos I e IV e fibronectina (WILSHAW et al, 2006).

Ao longo dos anos, vários aparatos de perfusão visando a descclularização efetiva e/ou rápida de órgãos foram desenvolvidos. Sullivan et al apresentaram um sistema contendo tanques de 200L preenchidos com reagentes de descclularização que são conectados por cânulas que são infundidas nos órgãos. Esses tanques funcionam com pulsos peristálticos e válvulas que controlam a entrada de diferentes reagentes em períodos de tempo específicos (SULLIVAN et al, 2012). Price et al desenvolveram um sistema automático de descclularização de órgãos inteiros. Este sistema se baseia em mecanismos de válvulas automáticas que perfusam reagentes como o TRITON X-100. O método foi capaz de descclularizar completamente pulmões suínos em apenas 24h com os vasos do órgão intactos (PRICE et al, 2015). Casari et al usaram metodologia envolvendo CO<sub>2</sub> supercrítico e SDS. O tecido é exposto ao scCO<sub>2</sub> onde a difusão rápida do gás no tecido rapidamente elimina e extrai as impurezas nele presentes. Essa metodologia reduz bastante o tempo necessário para a descclularização (CASARI et al, 2018).

Além de mecanismos que são desenvolvidos por pesquisadores em todo mundo, há alguns sistemas que são comercialmente fabricados e amplamente utilizados para processos de descclularização e recelularização de órgãos. Temos, por exemplo, o ORCA (*organ control and acquisition bioreactor*) desenvolvido pela Harvard Apparatus em 2013, o qual é capaz de descclularizar e recelularizar órgãos de diversos tamanhos e formas, sendo desenvolvido especificamente para esses propósitos. O equipamento conta com sensores de temperatura, pH e pressão, conferindo mais controle ao experimento. Desenvolvido pela mesma empresa, o HPC-3 (*hydrostatic and perfusion chamber*) permite o armazenamento de diversos reagentes e possui câmaras que se conectam com o órgão ou tecido, criando uma boa opção para descclularizações de pequena escala (HARVARD APPARATUS, 2013). Ebers tubular chamber, apesar de inicialmente proposto para cultivo de células em ambientes cilíndricos, pode ser usado para a descclularização de pequenos vasos; este aparato permite a manipulação do fluxo de reagentes ao tecido (EBERS MEDICAL TECHNOLOGY, 2019).

## 2.5 Matriz extracelular (MEC)

A matriz extracelular é o nome dado ao componente de comunicação entre as células. Entre suas várias funções podemos citar suporte físico e biológico para as células, fornecimento de oxigênio e nutrientes e eliminação de CO<sub>2</sub> e outras toxinas; além de armazenamento de proteases, citocinas e fatores de crescimento. A matriz extracelular varia de acordo com o tecido analisado, mas sua estrutura básica se constitui de fibras e substância fundamental, um gel viscoso de moléculas.

As fibras são responsáveis pela resistência, elasticidade e fornecem suporte sob o qual repousam as células, essas fibras geralmente são representadas por fibras colágenas, elásticas e reticulares. As fibras colágenas por sua vez, podem ser divididas em vários tipos de funções: fibras colágenas que formam fibrilas (colágeno tipo I, II, III, V e XI), fibras associadas às fibrilas (tipo IX e XII) e colágeno formadores de redes, principais responsáveis pela manutenção da lâmina basal (Tipo IV). Fibras elásticas são mais delgadas e se unem umas às outras formando redes irregulares de elastina.

A MEC também conta com a presença de monômeros de proteoglicanos formados por glicosaminoglicanos (GAG). Os GAG são polímeros largos de polissacarídeos não ramificados constituídos por um ácido urônico e uma hexosamina; o principal representante dos GAG é o ácido hialurônico. Uma vez que os GAG são ânions com carga negativa, eles são os maiores responsáveis em conferir característica hidrofílica para a matriz extracelular. (NARANJO et al, 2009). A formação da matriz extracelular é essencial para processos fisiológicos como reparo tecidual de feridas, crescimento e fibrose. Além disso, a matriz extracelular parece estar envolvida em patologias de interesse clínico, como câncer, uma vez que para o progresso da doença e metástase, a degradação da MEC parece ser essencial (KUMAR et al, 2013).

A MEC é um fator importante a se considerar em áreas como a medicina regenerativa e engenharia tecidual. Para esses propósitos a matriz serve para duas funções importantes: previne a ativação do sistema imune em resposta à injúria e facilita a propagação de células em locais de lesões. A matriz extracelular é essencial para a engenharia de tecidos, uma vez que é ela que providenciará o suporte para a implantação do novo órgão ou células, a matriz pode ser extraída de órgãos, geralmente bexiga, de suínos e outros animais. A descélularização de órgãos inteiros possibilita a compreensão da estrutura e da composição a nível local do órgão, que pode ser subsequentemente recelularizado até atingir a reprodução funcional do órgão, inclusive considerando a rede de vascularização presente no órgão nativo. Evidentemente, a técnica de descélularização de órgãos completos é mais custosa e é sujeita a mais dificuldades se comparada a descélularização de pequenos fragmentos de tecido (HE & CALLANAN,2013). Tanto na descélularização de órgãos inteiros quanto de fragmentos de tecidos, a esta aplicação

designamos a matriz como um *ECM biomaterial*.

## 2.6 Membrana Amniótica

A membrana amniótica é parte constituinte do saco amniótico, estrutura na qual o embrião e posteriormente o feto se desenvolvem. A membrana mais interna denominada âmnio circunda a cavidade amniótica, contendo fluido e o próprio feto no seu interior. As membranas amnióticas não contêm nervos, vasos linfáticos ou músculos, e são conectadas a outros anexos extraembrionários como o saco vitelino, alantóide e à placenta, via cordão umbilical e sua fonte de energia é o fluido coriônico e o fluido amniótico (LARSEN, 2001).

Além de funcionar como barreira física, a membrana amniótica também possui várias outras funções *in útero*. Apresenta função anti-inflamatória mediada principalmente por citocinas como a IL-10 que se opõe às atividades de pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$ . A membrana amniótica também produz activina, que em altas doses, inibe a produção de IL-6, IL-8 e PGE2. Essas funções anti-inflamatórias não são observadas no córion ou na decídua, evidenciando o papel especializado da membrana amniótica. A inibição de IL-6 também promove outra função da membrana amniótica na prevenção de formação de cicatrizes, fato este evidenciado pelo fenômeno cunhado de *scarless fetal wound healing* (TSENG et al, 2004).

A membrana amniótica tem espessura de 0,02 a 0,5 mm e é constituída de três camadas histológicas: camada epitelial, membrana basal grossa e mesênquima avascular. A camada mais interna é íntima ao fluido amniótico e possui células epiteliais cubóides firmemente ancoradas na membrana basal, que por sua vez repousa sobre uma camada acelular de colágeno tipo I, II e V. As células epiteliais da membrana amniótica possuem vários micróvilos em sua superfície apical que sugerem função de transporte intra e extracelular bem como função secretora. Essas células expressam vários marcadores epiteliais tais como CA125 e CD44. A membrana basal é constituída de proteoglicanos e serve como uma barreira permeável à macromoléculas relacionadas ao saco amniótico, bem como à moléculas que realizam manutenção da integridade da membrana. Por fim, a camada mais externa da membrana amniótica é composta de células fibroblastóides mesenquimais. Alguns autores alcunham esta camada mais externa de zona esponjosa em alusão às enormes quantidades de proteoglicanos e glicoproteínas que conferem aparência esponjiforme (MAMEDE et al, 2012). A figura 3 ilustra um esquema da membrana amniótica e sua matriz extracelular.

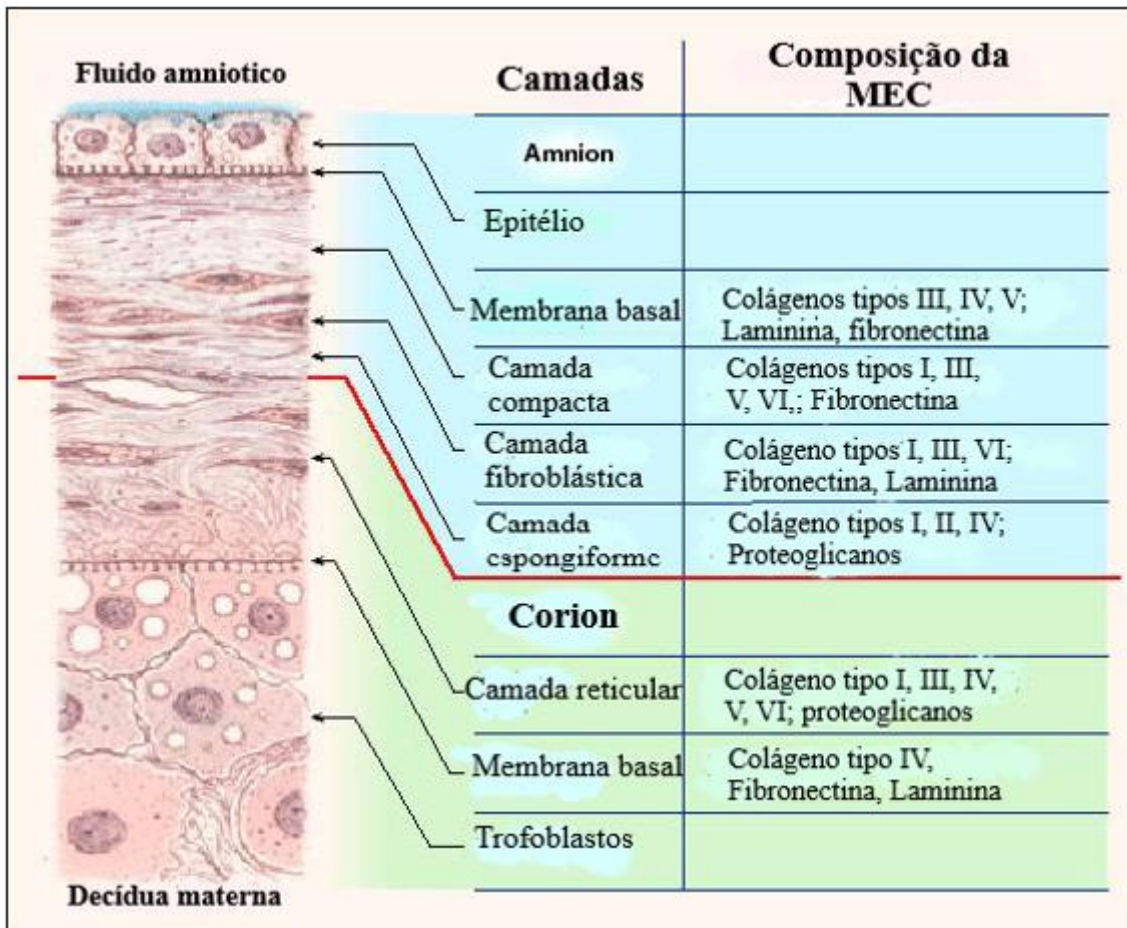


Figura 3: Esquema da estrutura da membrana amniótica. FONTE: Adaptado de NIKNEJAD et al, 2008.

As aplicações da membrana amniótica compreendem desde enxertos de pele para queimaduras a objeto de engenharia tecidual. Um dos primeiros e maiores usos de membranas amnióticas se encontra na área oftalmológica, onde há mais de 70 anos, o potencial da membrana amniótica para transplantes começava a ser explorado. Nos últimos anos, as membranas amnióticas têm sido utilizadas para tratar vários tipos de desordens oculares. Podem ser usadas como enxertos que potencializam a proliferação e diferenciação do epitélio da superfície ocular; tem utilidade como emplastos biológicos que servem para cobrir a superfície ocular inflamada ou lesionada por queimaduras ou doenças; e podem ser utilizadas também para preenchimento. Através de transplantes de pequenos pedaços de membrana amniótica, tem-se o preenchimento e tratamento de lesões e defeitos no estroma ocular (MAMEDE et al, 2012).

A membrana amniótica é ideal para uso em engenharia tecidual; uma vez que possui fácil obtenção, é um tecido constantemente descartado, portanto está disponível para doação, pode ser usado para vários propósitos e apresenta risco muito baixo de infecção ou resposta imune no receptor. Diante de tantas vantagens, a membrana pode ser facilmente utilizada como arcabouço de matriz extracelular para promover proliferação celular, reepitelização de tecidos e supressão de fibrose (PORTMANN-LANZ et al, 2007), se configurando assim como um potencial *scaffold* para utilização na medicina regenerativa.

Na literatura científica existem vários trabalhos elucidando métodos e aplicações de descelularização de membranas amnióticas de várias espécies, em particular a humana.

## 2.7 Aplicação na medicina veterinária

Assim como seres humanos, animais domésticos e silvestres demandam tratamentos que envolvem medicina regenerativa como uma das, ou única alternativa de recuperação. Na maior parte dos casos, o uso da terapia regenerativa na medicina humana se baseia em terapia celular de células mesenquimais, uma metodologia já bem estabelecida e utilizada (GIROLAMO et al, 2013). Na medicina veterinária, entretanto, temos grande diversidade anatômica e fisiológica entre várias espécies, com consequências na aplicação de células tronco quanto seus efeitos e mecanismos de ação. Em vista desse detalhe, ainda hoje é difícil definir exatamente o estado da arte na medicina regenerativa veterinária.

Sabe-se que o uso de células tronco em medicina veterinária não se compara ao uso amplo na medicina humana, porém o uso de células tronco mesenquimais, caracterizadas em diversas espécies, vem crescendo cada vez mais e se tornando um dos métodos mais utilizados em medicina regenerativa veterinária (VOLK & THEORET, 2013).

Alguns *scaffolds* também são utilizados para o tratamento de úlceras e injúrias. Por exemplo, há dois tipos de *scaffolds* presentes para cavalos, um biológico e outro semissintético. A matriz extracelular de bexiga de suínos é utilizada para o tratamento de queimaduras, úlceras, rompimento de ligamento e injúrias no casco (FLANAGAN et al, 2009). Esse *scaffold* também se mostra eficiente no tratamento de lesões esofágicas em cães, desde que o biomaterial seja revestido com tecido muscular autólogo (BADYLAK et al, 2005). MEC sintéticas feitas de hidrogel de ligações cruzadas de glicosaminoglicanos são utilizadas para tratar lesões de pele, como queimaduras. Em porcos foi observada cicatrização acelerada nos dias 3 e 5 da análise (KIRKER et al, 2004).

A reposição de juntas e implantes de valvas cardíacas também foi estudada em animais. Em ovelhas, plugs osteocondrais semissintéticos foram utilizados para artroplastia. Novamente, foi notada cicatrização aumentada em nível histológico se comparado com animais submetidos a operações contralaterais (PILLIAR et al, 2007). *Scaffolds* obtidos de órgãos descelularizados foram usados com sucesso em animais. Enxertos provenientes da MEC descelularizada de fígado de ratos demonstraram boa compatibilidade quando implantadas em animais heterólogos (XIN PAN et al, 2014).

## 2.8 Medicina Translacional

As espécies domésticas ou de produção estão cada vez mais sendo consideradas como

modelos fundamentais para medicina translacional. Comparados aos roedores usuais, os modelos de grande porte oferecem um escopo maior para análises de patologias e tratamentos que podem ser transferidos para medicina humana. Apesar de roedores serem mais acessíveis e passíveis de manipulação genética, grandes animais compartilham vários mecanismos biológicos mais próximos dos seres humanos, considerando inclusive a exposição ao ambiente exterior. Por exemplo, 292 doenças genéticas caninas, 163 felinas, 142 bovinas e 109 equinas são homólogas com defeitos genéticos humanos.

Além disso, grandes animais compartilham até mesmo comportamentos semelhantes aos dos seres humanos, como atletismo (animais esportivos) ou de trabalho (animais de serviço), contribuindo para a semelhança da fisiopatologia inclusive em fatores de nível sociocomportamental (VOLK & THEORET, 2013).

Como já dito anteriormente, a engenharia tecidual pode contribuir para mecanismos regenerativos, principalmente se aliada à células tronco como catalisadores, uma vez que esses tecidos semissintéticos agem como um meio para proliferação e diferenciação de células tronco (DUTTA & DUTTA, 2010). Nas últimas duas décadas, as áreas de células tronco, biomateriais e engenharia tecidual levaram ao desenvolvimento de tecnologias inovadoras como tecidos sintéticos de bexiga, pele, vasos e vias aéreas superiores (MING CHEN et al, 2012).

Com todos os avanços na área de engenharia tecidual, cada vez mais tem se desenvolvido novas técnicas menos invasivas além de fornecer entendimentos mais profundos acerca da fisiologia e fisiopatologia de doenças teciduais. Nesse ponto, as pesquisas em níveis translacionais prometem novos tratamentos de substituição de tecidos sem a morbidade do transplante tradicional (ISHIKAWA et al, 2010). Entretanto, é importante salientar que enquanto a pesquisa básica alavanca a compreensão da engenharia tecidual em nível humano ou translacional, ainda há fatores como a demanda da saúde pública e interesses industriais a se considerar quanto à aplicação *de facto* dessas pesquisas e tecnologias (BELARDELLI et al, 2011). Dito isso, o desenvolvimento de protocolos mais rápidos e econômicos relacionados à produção de tecidos sintéticos pode contribuir para não só o conhecimento em nível básico, mas na aplicação desses materiais na prática clínica cotidiana.

### **3.0 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Produzir um artigo de revisão sobre as metodologias e aplicações do método de descclularização empregados na membrana amniótica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Diferenciar as metodologias utilizadas nos processos de descclularização

- Salientar o uso dos *scaffolds* resultantes do processo de descelularização na medicina regenerativa.
- Analisar o uso de processos de descelularização na membrana amniótica.

#### 4.0 MATERIAL E MÉTODOS

O artigo de revisão foi feito com base em publicações na área de biomateriais, especialmente as que utilizaram o método de descelularização. Foi realizada uma pesquisa através de várias plataformas de acesso à periódicos gratuitos como Google Scholar, Pubmed, PloS, SciELO, Science Direct e Science Open. Foram selecionados artigos de trabalhos experimentais realizados nos últimos 20 anos, salvo trabalhos que apresentassem conceitos teóricos e informações já bem estabelecidas. Para a filtragem de artigos baseados em trabalhos com a membrana amniótica, também foi incluído o critério de metodologia detalhada, sendo necessário informar os tamanhos dos fragmentos do tecido utilizado no trabalho. As palavras-chave utilizadas para a pesquisa foram escritas em inglês para ampliar o número de artigos relacionados ao tema. Abaixo é apresentada uma tabela resumindo o método de filtragem e produção do artigo.

Plataformas de Busca	Intervalo de tempo	Palavras -chave	Critério de inclusão
Pubmed; Google scholar; SciELO; ScienceOpen; ScienceDirect; PLOS;	Últimos 20 anos (2002-2022)	Amniotic membrane; Decellularization; Scaffold; Biomaterial; Organ decellularization; Regenerative medicine; Stem cells.	Trabalho experimental; Metodologia detalhada.

Tabela 1: Metodologia de pesquisa e filtragem para a produção do artigo de revisão

## 5.0 Capítulo 1

Manuscrito a ser submetido à revista *Polymers* (fator de impacto: 4.967)

Instruções para autores: <https://www.mdpi.com/journal/polymers/instructions>

# Membrana amniótica como fonte de biomaterial: dos métodos empregados às aplicações *in vivo*.

Wesley Rogério Negri<sup>1</sup>(†); Phelipe Oliveira Favaron<sup>1</sup>(†).

1. Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL); Londrina, Brasil. [wesley.rog.negri@uel.br](mailto:wesley.rog.negri@uel.br) (W.R.N); [phelipe@uel.br](mailto:phelipe@uel.br) (P.O.F).

(†): Os autores contribuíram igualmente com o trabalho

### Resumo

Para suprir a demanda da medicina regenerativa, atualmente contamos com um número cada vez mais crescente de metodologias alternativas e acessíveis. Uma delas, a produção de biomateriais através do procedimento de descelularização, oferece uma nova oportunidade na área de transplantes de órgãos e tecidos. Em particular, biomateriais resultantes da membrana amniótica se apresentam como *scaffolds* ideais pela sua fácil acessibilidade e riqueza em elementos da matriz extracelular utilizados na medicina regenerativa. Neste artigo, reunimos os principais métodos de descelularização empregados na fabricação de *scaffolds* e os trabalhos realizados nos últimos 20 anos demonstrando os resultados do uso desses biomateriais na medicina regenerativa humana e veterinária. Os trabalhos analisados demonstraram relativos sucessos em descelularizar órgão e tecidos, sobretudo membranas amnióticas de várias espécies. A aplicação se provou viável na maioria dos estudos e apesar de certas metodologias utilizarem menos tempos e reagentes, ainda se busca um protocolo ideal que possa ser usado de forma padrão.

**Palavras-chave:** descelularização; membrana amniótica; biomateriais; scaffolds; medicina regenerativa.

### Abstract

To meet the demand for regenerative medicine, we currently have an increasingly growing number of alternative and accessible methodologies. One of them, the production of biomaterials through the decellularization procedure, offers a new opportunity in the field of organ and tissue transplants. In particular, biomaterials resulting from the amniotic membrane are ideal scaffolds due to their easy accessibility and richness in extracellular matrix elements used in regenerative medicine. In this article, we bring together the main decellularization methods used in the manufacture of scaffolds and the work carried out in the last 20 years demonstrating the results of the use of these biomaterials in both human and veterinary regenerative medicine. The works analyzed showed relative success in decellularizing organs and tissues, especially amniotic membranes of several species. The application proved to be viable in most studies and although certain methodologies use less time and reagents, an ideal protocol that can be used in a standard way is still being sought.

**Keywords:** decellularization; amniotic membrane; biomaterials; scaffolds; regenerative medicine.

### 1.0 Introdução

A membrana amniótica ou âmnio é uma estrutura fina e translúcida, que envolve o embrião e feto durante o desenvolvimento embrionário. Em humanos, o âmnio surge a partir da cavidade amniótica, a qual é formada na segunda semana de gestação como um espaço entre células do citotrofoblasto e epiblasto. Células do epiblasto migram e passam a revestir a cavidade diferenciando-se em amnioblastos, células do epitélio da membrana amniótica. Posteriormente, a membrana se expande gradualmente, acompanhando o crescimento do embrião e se enche de líquido, o fluido amniótico [1]. O líquido amniótico é derivado do plasma

materno pela passagem de solutos e água através das aquaporinas expressas nas membranas extraembrionárias como o âmnion e o córion [2]. Além da conhecida função de proteção mecânica exercida pela natureza absorvente do saco amniótico, o líquido amniótico é um componente importante que auxilia na formação e desenvolvimento do sistema respiratório; e por meio do deslocamento das partes fetais auxiliadas pelo líquido, o sistema locomotor é induzido ao desenvolvimento [3]. A membrana amniótica é desprovida de vasos sanguíneos, nervos, músculos ou vasos linfáticos [4]. Em humanos e primatas, a membrana amniótica tem íntima relação com o córion, dessa forma o suprimento de nutrientes e gases se difunde através do fluído coriônico para o amniótico [5].

A membrana amniótica pode chegar a 0,5 mm de espessura e é geralmente dividida em três camadas histológicas: epitelial, membrana basal, e mesênquima; esta última sendo subdividida ainda em: estroma compacto, camada fibroblástica e camada esponjiforme [6]. A camada epitelial é constituída por células cubóides que estão em contato imediato com o líquido amniótico, essas células contém micro vilosidades que sugerem participação em transportes intracelulares [1]. A membrana basal, que serve de assoalho para as células epiteliais, é constituída principalmente por colágeno, fibronectina e laminina, tendo como função principal conferir elasticidade e resistência para toda estrutura da membrana [7]. Esses componentes são extremamente importantes para a manutenção da matriz extracelular, conferindo a ela elasticidade, resistência e organização a nível molecular. No mesênquima, se encontra o estroma compacto, se constituindo como maior esqueleto fibroso da membrana; na camada fibroblástica se encontram fibroblastos, células do mesênquima amniótico e alguns macrófagos; e no folheto esponjoso há proteoglicanos e glicoproteínas que conferem a essa camada aparência esponjosa [8]. Como grande parte da membrana amniótica é constituída por tecido conjuntivo, vários são os estudos que buscam utilizar esse folheto na medicina regenerativa.

O uso da membrana amniótica na medicina regenerativa data do início do século XX, sendo utilizada no tratamento oftalmológico desde pelo menos meio século atrás [9]. Atualmente, a membrana amniótica é amplamente utilizada em vários campos da medicina: Enxertos para queimaduras, como material para prevenção de adesão tecidual após operações de cabeça, pescoço e abdômen [10] ou como *scaffolds* decelularizados para bioengenharia e hidrogéis, por exemplo [11]. Os *scaffolds* são estruturas que agem como esqueletos de sustentação nos quais podem ser semeadas células; repletos de fatores de crescimento assim, os *scaffolds* auxiliam e direcionam a formação e regeneração de tecidos [12]. O potencial das linhagens de células tronco provenientes da membrana amniótica também é bastante explorado e se apresenta como área promissora na medicina regenerativa [13].

Quando falamos em biomateriais, podemos considerar os biomateriais sintéticos e aqueles derivados de tecidos naturais. Os materiais naturais apresentam algumas vantagens importantes sobre os sintéticos. Esses materiais são compostos de polipeptídeos, polissacarídeos,

e componentes da MEC, assim sendo, apresentam excelente atividade fisiológica, como adesão seletiva de células, através da fibrina e colágenos; propriedades mecânicas semelhantes às naturais e biodegradabilidade. A grande desvantagem de biomateriais sintéticos é a falta de sinais de reconhecimento celular provenientes da MEC natural; esses sinais são essenciais para regular a proliferação celular e expressão gênica das células que estão aderidas a MEC. Nesse sentido, um biomaterial sintético deve, além da biocompatibilidade, ter implantado em si peptídeos que controlam o reconhecimento celular. Entretanto, isso não significa que os biomateriais naturais não tenham limitações próprias. Quando implantados *in vivo*, podem surgir deficiências como risco de infecção viral, imunogenicidade e deterioração precoce do material [14].

Métodos de descelularização de órgãos e tecidos visam à produção de um arcabouço tridimensional de matriz extracelular preservada. Esses arcabouços devem ser livres de componentes celulares e imunogênicos que estavam presentes no tecido nativo [15]. Evidentemente, a remoção de 100% do material nativo não foi reportada até o presente momento, sendo aceita a “decelularização suficiente” que deve atender os seguintes critérios: (1) O *scaffold* resultante não deve conter quantidade de material genético nativo que ultrapasse 50 ng/mg; (2) Os fragmentos de DNA restantes devem ter comprimento de no máximo 200bp e (3) não deve haver nenhum componente nuclear visível no *scaffold* [16]. Descelularizações podem ser atingidas através de tratamentos do tecido com detergentes, métodos físicos e enzimáticos. Todos esses procedimentos também podem danificar o tecido, sendo assim, um balanço entre dano e descelularização deve ser estabelecido a fim de se obter um *scaffold* eficiente [17]. O uso de membranas amnióticas descelularizadas oferece uma grande promessa para regeneração tecidual ou como suporte para proliferação celular alogênicas ou autólogas; além de serem biodegradáveis e bioativas, requisitos essenciais para um *scaffold* [18; 19].

A presente revisão tem como objetivo sumarizar métodos de descelularização utilizados em membranas amnióticas, humanas ou animais; e salientar os resultados e as aplicações dos *scaffolds* resultantes desses processos.

## **2.0 Métodos de descelularização**

O método a ser utilizado para um processo de descelularização dependerá de vários fatores, entre eles: o tipo de tecido, densidade celular, conteúdo lipídico e espessura tecidual. Os métodos mais comuns de descelularização, entretanto, se resumem em físicos, químicos e enzimáticos [16].

### **2.1 Métodos físicos**

Os métodos de descelularização utilizando fenômenos físicos promovem a remoção celular do tecido por meio do uso de temperatura, pressão, eletricidade, entre outros. O método de *Freeze-thaw* se baseia nas mudanças de estado físico da água para promover a descelularização. Os cristais de gelo formados durante um rápido congelamento lisam as

membranas das células do tecido. Após múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento, pode-se obter a descelularização do tecido sem comprometer as proteínas da MEC [20]. Vale salientar, entretanto, que pela natureza disruptora do método de *freeze-thaw*, podem ser gerados danos na ultraestrutura do tecido, fazendo com que o método possa ser utilizado somente quando esses danos são considerados aceitáveis para o produto final [21].

Pressão hidrostática pode ser ideal para descelularizar vasos de órgãos, sendo muitas vezes mais eficiente que métodos baseados em detergentes ou enzimas. Alguns cuidados, porém devem ser considerados durante a utilização deste método: a formação de cristais de gelo pode agredir a ultraestrutura da MEC; para isso é recomendável que durante a aplicação da pressão hidrostática, haja também a manutenção da temperatura, a fim de evitar a formação desses cristais [22]. A força mecânica em associação com enzimas também é utilizada na descelularização, particularmente em tecidos como membranas amnióticas, bexigas urinárias e intestinos delgados. Evidentemente a estrutura do tecido bem como a membrana basal sobre as quais repousam as células são constantemente danificadas em qualquer método que envolva agressão mecânica [23].

A eletroporação não-termal é uma técnica que se baseia na aplicação de micro pulsos elétricos que promovem aberturas de poros nas membranas plasmáticas das células através da alteração do potencial elétrico, levando a célula à morte. Controlando a geração de calor pela corrente elétrica, o arcabouço de MEC se mostra bastante conservado [24]. Como os eletrodos são pequenos, esse método limita-se apenas à descelularização de pequenas partes de tecidos ou órgãos. Além disso, a remoção dos restos celulares *in vitro* não conta com a atividade do sistema imunológico, sendo necessário o uso de agentes de lavagem; como o soluto Ringer lactado [25].

## 2.2 Métodos químicos

Métodos químicos se baseiam em compostos químicos como ácidos e bases, bem como detergentes para promover a limpeza celular do tecido. Ácidos podem catalisar as reações hidrolíticas celulares e promover a decelularização. Ácidos acéticos ou peracéticos funcionam como desinfetantes e poderosos agentes removedores de ácidos nucleicos e restos celulares [26]. Apesar de esses compostos danificarem o colágeno da ultraestrutura do tecido, os glicosaminoglicanos (GAGs) são relativamente bem conservados no *scaffold* resultante [27]. Bases como NaOH e CaOH são bons agentes removedores de células de tecido dérmico; todavia, essas bases danificam profundamente fatores de crescimento da MEC, assim como reduzem propriedades mecânicas da ultraestrutura tecidual. O mecanismo pelo qual isso acontece é a clivagem das ligações cruzadas de fibrilas e colágeno na MEC [28].

Detergentes iônicos e não iônicos são amplamente utilizados para procedimentos moleculares justamente pela sua capacidade em solubilizar membranas plasmáticas e dissociar material genético das proteínas celulares [29]. Esses detergentes tendem a danificar a MEC

restante, portanto é importante a dosagem do tempo no qual o tecido fica exposto ao detergente e a minimização de combinações de detergentes, uma vez que números elevados de compostos podem acelerar a perda da MEC [30].

Entre os detergentes mais populares usados na descclularização de membranas amnióticas, o *Sodium Dodecil Sulfate* (SDS) merece destaque. Esse detergente é ideal para a descclularização de tecidos espessos como rins e articulações. Além disso, a adição de SDS a outro protocolo de descclularização pode ser o fator crucial para a remoção completa das células [31]. Os átomos de carbono da substância estão ligados a grupos sulfato conferindo ao detergente propriedade antipática. Sua capacidade de remover proteínas nucleares se deve principalmente a ação do composto em romper as ligações não-covalentes causando a desnaturação protéica. O detergente, porém, pode gerar alguns efeitos citotóxicos, uma vez que a remoção completa do composto é bastante complicada, deixando para trás resíduos que resistem aos processos de enxágue [32].

Triton X -100 também se configura como um detergente bastante utilizado nesses procedimentos. Esse detergente consegue penetrar em tecidos espessos como valvas que não conseguem ser descclularizadas por métodos enzimáticos. O triton X- 100, entretanto, assim como o SDS, pode causar dano na MEC e destruição de fatores de crescimento associados ao arcabouço tecidual [33].

### **2.3 Métodos enzimáticos**

Enzimas relatadas em protocolos de descclularização de tecidos incluem nucleases, tripsina, colagenase, lipase, dispase, termolisina e  $\alpha$ -galactosidase. Enzimas podem fornecer alta especificidade para a remoção de resíduos celulares ou constituintes indesejáveis da MEC [34]. No entanto, a remoção completa das células apenas por tratamento enzimático é difícil e resíduos podem prejudicar a recelularização ou provocar uma resposta imune adversa. Nucleases são essenciais para impedir a persistência de materiais moleculares no tecido descclularizado; especialmente endonucleases, que possuem a capacidade de clivar sequências intermediárias do DNA, fazendo com que a fragmentação fique mais eficiente e a remoção facilitada [35].

### **3.0 Técnicas de aplicação dos métodos de descclularização**

Além dos próprios agentes usados na descclularização, deve-se também considerar as técnicas pelas quais esses agentes são introduzidos no órgão ou tecido desejado para descclularização. A escolha das diversas técnicas de aplicação dos agentes de descclularização pode variar conforme a espessura do tecido, finalidade da decelularização e aplicabilidade do *scaffold* pós-descclularização. Vale salientar também que tecidos gordurosos e amorfos requerem tratamento extra através de alcoóis e solventes para remover excesso de materiais indesejados [16].

### 3.1 *Perfusão de órgãos inteiros*

Essa categoria se baseia no uso de mecanismos que promovem a descclularização do órgão através da passagem do agente decelularizante pelos vasos e vias do órgão. Ao longo dos anos, vários aparatos de perfusão visando a descclularização efetiva e/ou rápida de órgãos foram desenvolvidos. Sullivan e colaboradores apresentaram um sistema contendo tanques de 200L preenchidos com reagentes de descclularização que são conectados por cânulas que são infundidas nos órgãos. Esses tanques funcionam com pulsos peristálticos e válvulas que controlam a entrada de diferentes reagentes em períodos de tempo específicos [36]. Price e colaboradores desenvolveram um sistema automático de descclularização de órgãos inteiros. Este sistema se baseia em mecanismos de válvulas automáticas que perfusam reagentes como o TRITON X-100 e foi capaz de descclularizar completamente pulmões suínos em apenas 24h com os vasos do órgão intactos [37].

Além de mecanismos que são desenvolvidos por pesquisadores em todo mundo, há alguns sistemas que são comercialmente fabricados e amplamente utilizados para processos de descclularização e recelularização de órgãos. Temos, por exemplo, o ORCA (*organ control and acquisition bioreactor*) desenvolvido pela Harvard Apparatus em 2013 [38]; o qual é capaz de descclularizar e recelularizar órgãos de diversos tamanhos e formas, sendo desenvolvido especificamente para esses propósitos. Conta com sensores de temperatura, pH e pressão, dando mais controle ao experimento. Desenvolvido pela mesma empresa, o HPC-3 (*hydrostatic and perfusion chamber*) permite o armazenamento de diversos reagentes e possui câmaras que se conectam com o órgão ou tecido, criando uma boa opção para descclularizações de pequena escala [39]. Ebers tubular chamber, apesar de inicialmente proposto para cultivo de células em ambientes cilíndricos, pode ser usado para a descclularização de pequenos vasos; este aparato permite a manipulação do fluxo de reagentes ao tecido [40].

Vários são os estudos que demonstram a eficácia do método de perfusão para a descclularização de órgãos inteiros. Em um estudo, usando a perfusão de SDS 0.1% e Triton X-100 0.1% por meio da veia porta do fígado de rato, o órgão adquiriu aparência pálida e translúcida ao longo do processo, evidenciando a eficácia da descclularização e a reminiscência do arcabouço de MEC. Os resultados sugerem preservação da MEC, uma vez que resíduos nucleares foram removidos ao mesmo tempo em que foi observada presença de colágeno na MEC [41].

### 3.2 *Imersão*

Quando o tecido não possui clara vascularização ou estruturas que permitam a perfusão por cânulas, outras estratégias são adotadas para a descclularização. A mais comum e utilizada é a imersão do material no agente descclularizador enquanto agitado para facilitar o desprendimento das células e restos celulares. Tecidos finos ou pedaços de material biológico

podem ser descelularizados através deste método. Não há ainda um consenso sobre a concentração do detergente nem sobre o tempo de exposição quando falamos em descelularização por imersão. Becker e colaboradores (2018) conseguiram resultados positivos ao descelularizar membranas amnióticas humanas para aplicações na cardiologia. Os autores usaram o detergente SDS em concentração de 0.5% no qual a membrana amniótica ficou imersa por 4 horas em temperatura ambiente [42]. Por outro lado, o uso de apenas 0.03% de SDS também promoveu descelularização adequada em outro estudo; conservando as propriedades mecânicas da matriz extracelular nativa e a presença dos colágenos I e IV e fibronectina [43].

Além dos clássicos detergentes SDS e Triton-X 100, outros componentes demonstram potencial para decelularização eficaz e conservação da MEC. Concentrações de 0.02% de EDTA e 2M de ácido peracético se mostraram eficientes na remoção de células e material nuclear em seus respectivos experimentos envolvendo descelularização de membrana amniótica humana. Ambos os solventes conseguiram também preservar a estrutura da MEC nativa, se destacando como substâncias de potencial uso em procedimentos para produção de *scaffolds* [44].

#### 4.0 Análises de *Scaffolds*

Após o tratamento de descelularização do *scaffold*, deve-se confirmar se de fato todas as células e materiais nucleares foram removidos completamente, a fim de evitar qualquer resposta imunológica quando o material for reimplantado em outro organismo. Para isso, estão disponíveis técnicas moleculares, histológicas e imunológicas que analisam desde o microambiente até níveis moleculares.

Quando um *scaffold* é analisado quanto à eficiência do processo de descelularização, um dos pontos mais importantes a ser considerado é a remoção do material nuclear que muitas vezes pode persistir mesmo após o tratamento com detergentes e enzimas. Comumente é aceito que uma concentração de <50 ng/mg de material genético no tecido se configura como uma descelularização eficiente [45]. Podem ser empregadas várias técnicas para a quantificação do material genético, tais como PCR, eletroforese e espectrofotometria. Esta última fornece o resultado mais acurado de quantificação enquanto a PCR consegue ser também qualitativa [46].

Para a análise do arcabouço resultante da descelularização, podem ser empregadas várias técnicas histológicas que visam à investigação da eficiência da remoção de células, bem como a qualidade e preservação da MEC após o tratamento. A coloração por hematoxilina-eosina (HE) é uma técnica bem conhecida e amplamente usada na análise histológica de cortes de tecido. Essa técnica se baseia nas propriedades básicas e ácidas da hematoxilina e eosina, respectivamente. A hematoxilina com caráter básico é atraída por estruturas ácidas, como o núcleo da célula, por exemplo; ao passo que a eosina, de caráter ácido cora o citoplasma celular [47]. No caso de tecidos descelularizados, é ideal que todo o componente celular seja removido. Dessa maneira, a histologia HE esperada de uma descelularização é de cor rosada e clara, sem a

presença de estruturas nucleares escuras no corte [44].

Para a análise dos componentes da MEC como as fibras colágenas e tecido conjuntivo circundante pode ser usado a coloração tripla do tricrômio de Masson. Essa técnica consiste na combinação de três corantes que variam dependendo da versão da técnica utilizada. Normalmente um corante azul ou verde tingem as fibras colágenas, vermelho ou rosa identifica citoplasma celular e preto ou castanho, núcleos celulares [48]. Evidentemente, é esperado que *scaffolds* descelularizados conservem a estrutura da sua MEC nativa ao mesmo tempo em que apresentem ausência celular. Dessa forma, um *scaffold* ideal possuiria grandes quantidades de fibras colágenas e pouco material celular [49]. Alternativamente, para a investigação mais aprofundada das fibras colágenas, pode ser utilizada a coloração de picrossirius red que diferencia fibras colágenas em diferentes cores: fibras de colágeno tipo I são coradas em vermelho enquanto fibras do tipo III são coradas em amarelo [50].

A imunohistoquímica é uma técnica que visa destacar componentes específicos através da afinidade desses com seus respectivos anticorpos. No caso de processos de descelularização, geralmente são analisadas fibras colágenas e outros componentes da MEC, como laminina e fibronectina. É ideal que em um material descelularizado se conservem as propriedades e plasticidade da MEC, presença de colágeno do tipo 4 e análise da laminina podem indicar uma descelularização eficiente e um *scaffold* adequado [42].

## 5.0 Recelularização de *Scaffolds*

Após a descelularização satisfatória do tecido, o *scaffold* resultante pode ser submetido à recelularização com objetivo de formar novos tecidos ou órgãos. Esses órgãos sintéticos provenientes de *scaffold* e recelularizados com novas células prometem transplantes e enxertos com pouca ou nenhuma reação imunológica no transplantado [51]. No caso da membrana amniótica, as possibilidades são ainda maiores. Sabe-se que seu uso como *scaffold* reduz a inflamação, promove epitelização e evita a formação de cicatrizes [52]. Para a recelularização, é comum que sejam usadas células tronco mesenquimais (MSC). As integrinas das MSC interagem com diferentes proteínas da MEC [53]. Em verdade, as MSC demonstram preferência em se associar com regiões específicas da MEC, principalmente aquelas ricas em colágeno tipo I e IV, laminina e fibronectina [54]. Essas interações podem regular o comportamento das MSC, fazendo com que elas adquiram características celulares das células nativas que outrora povoavam o *scaffold* [55]. Dessa forma, quando se usa MSC para a recelularização, essas células desempenham papel importante na mediação da regeneração tecidual através da influência na diferenciação funcional das células, regulação da resposta imunológica e angiogênica [56].

## 6.0 Aplicações de *scaffolds*

Após a descelularização, os *scaffolds* podem ser recelularizados com outros tipos celulares com o objetivo de formar o tecido demandado, ou podem ser usados enquanto descelularizados, como suportes para a proliferação celular. É ideal que se conservem as propriedades mecânicas do órgão e a matriz extracelular, pois esta dará suporte físico e biológico para a formação do novo tecido funcional por meio do processo de recelularização [57].

Vários órgãos e tecidos já foram descelularizados com sucesso e estão descritos na literatura. Para citar alguns, ossos desmineralizados e descelularizados [58]; implantes alogênicos e xenogênicos de tecido adiposo descelularizado para regeneração foram usados com sucesso em testes pré-clínicos e clínicos [59, 60, 61] produção de pulmões bioartificiais pela recelularização da MEC pulmonar e de outros tecidos relacionados ao sistema respiratório com células endoteliais e epiteliais e implantação desses órgãos *in vivo* [62, 63]. O fígado com sua MEC preservada após a descelularização demonstram boa biocompatibilidade e neovascularização quando implantados *in vivo* [64, 65]. Alguns estudos demonstraram também capacidade de *scaffolds* derivados de tecido nervoso de promoverem crescimento e regeneração de conexões de nervos periféricos em ratos [66, 67]. A descelularização de órgãos inteiros possibilita a compreensão da estrutura e da composição a nível local do órgão, que pode ser subsequentemente recelularizado até atingir a reprodução funcional do órgão, inclusive considerando a rede de vascularização presente no órgão nativo. Evidentemente, a técnica de descelularização de órgãos completos é mais custosa e é sujeita a mais dificuldades se comparada a descelularização de pequenos fragmentos de tecido [68]. Além dos estudos preliminares ilustrados anteriormente, há um grande número de *scaffolds* comerciais que são amplamente utilizados na medicina regenerativa, sendo os mais comuns fragmentos de tecidos descelularizados usados para a implantação e formação tecidual [69]; [70].

A formação de órgãos semissintéticos com a ajuda dos *scaffolds* se apresenta como uma alternativa promissora inclusive na área de transplantes xenogênicos, que sofrem com a baixa taxa de doadores e a alta demanda. Um dos principais fatores para o baixo número de doadores de órgãos é a recusa familiar, representando 45.3% das causas para não doação de órgãos. Este obstáculo poderia ser solucionado se o doador expressasse o desejo de doação em vida e se houvesse um registro nacional de doadores, comprometendo-se assim com a doação de órgãos *post mortem* [71]. Por exemplo, um estudo holandês mostrou que se o doador tivesse registro expressando seu desejo de doação, a taxa de doação era de 94%, comparado a apenas 23% se esta escolha fosse deixada exclusivamente para a família [72].

Além da produção de órgãos inteiros, há a possibilidade de se fabricar enxertos ou revestimentos a base de material descelularizado. A membrana amniótica se apresenta como um candidato perfeito para tais finalidades. A membrana amniótica possui propriedades antibacteriais e apresenta baixa imunogenicidade. Por essa razão, os *scaffolds* provenientes deste

material são constantemente usados como enxertos de pele, em neurocirurgias, na área oftalmológica e ginecológica; além de se provar um excelente suporte para a proliferação de células. Enxertos a base de membranas amnióticas são capazes inclusive de inibirem a proliferação de bactérias resistentes tais como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, cepas de difícil tratamento comumente encontradas em pacientes com queimaduras [73]. O uso da membrana amniótica para enxertos de pele não se limita apenas ao tratamento de queimaduras. Revestimentos descelularizados também foram usados para tratamento de feridas diabéticas [74] e também para tratamentos de doenças de pele [75].

Nos últimos anos, a Medicina Veterinária tem avançado muito no que diz respeito ao diagnóstico e tratamento de doenças, inclusive empregando novos tratamentos relacionados à Medicina Regenerativa. Além disso, num contexto de Medicina Translacional, os modelos animais tem representado um papel fundamental e crescente para os avanços de tratamentos inovadores. Muitos estudos realizados demonstram a possibilidade de descelularização e inclusive a aplicação clínica de *scaffolds* obtidos a partir da membrana amniótica.

Além da necessidade de alternativas para órgãos inteiros, existem outras patologias de tratamentos complicados que podem acometer animais. A exemplo, fraturas ósseas causadas por fatores ambientais como trauma ou genéticos, como a displasia coxofemoral [76]. Em qualquer natureza, fraturas ósseas podem ser de difícil regeneração principalmente se houverem alterações em fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e união fibrocartilaginosa. Nesses casos, podem ser utilizados enxertos ósseos para uma melhor recuperação. Se esses enxertos forem provenientes do próprio organismo, a resposta imunológica é baixa e a recuperação acelerada.

Alguns *scaffolds* também são utilizados para o tratamento de úlceras e injúrias. Por exemplo, há dois tipos de *scaffolds* presentes para cavalos, um biológico e outro semissintético. A matriz extracelular de bexiga de suínos é utilizada para o tratamento de queimaduras, úlceras, rompimento de ligamento e injúrias no casco [77]. Esse *scaffold* também se mostra eficiente no tratamento de lesões esofágicas em cães, desde que o biomaterial seja revestido com tecido muscular autólogo [78]. MEC sintéticas feitas de hidrogel de ligações cruzadas de glicosaminoglicanos são utilizadas para tratar lesões de pele, como queimaduras; em porcos foi observada cicatrização acelerada nos dias 3 e 5 da análise [79].

A Bioengenharia tecidual como reposição de articulações e de valvas cardíacas também foi estudada em animais. Em ovelhas, plugs osteocondrais semissintéticos foram utilizados para artroplastia. Novamente, foi notada cicatrização aumentada em nível histológico se comparado com animais submetidos a operações contralaterais [80]. *Scaffolds* obtidos de órgãos descelularizados foram usados com sucesso em animais. Enxertos provenientes da MEC descelularizada de fígado de ratos demonstraram boa compatibilidade quando implantadas em animais heterólogos [81]. Abaixo, encontra-se uma tabela sumarizando as aplicações de alguns

tecidos descelularizados e uma tabela especificamente contendo dados sobre a descelularização da membrana amniótica.

Tabela 1: Órgãos comumente utilizados em processos de descelularização

Tecido decelularizado	Aplicação	Referência
Rim	Regeneração renal mediada por <i>scaffold</i> ; Promoção de proliferação e diferenciação celular.	[82]; [83]
Coração	Regeneração de miocárdio em áreas danificadas por infarto isquêmico.	[84]
Fígado	Regeneração parcial da função renal e consolidação de redes vasculares	[85]; [86].
Membrana Amniótica	Regeneração de pericárdio; Reparo de doenças de pele; Em combinação com fragmentos de cartilagem, acelera a regeneração osteocondral; Cicatrização de feridas; Reconstrução da superfície ocular; Reparação de rupturas prematuras na membrana amniótica;	[18]; [75]; [87]; [88]; [89].
Estômago	Regeneração da camada muscular gástrica	[90].
Vasos sanguíneos	Veia descelularizada exibiu resistência e função adequada quando implantada em sujeitos caninos, com mínima rejeição.	[91].
Ovário	Implantes xenogênicos de ovários decelularizados e semeados com células ovarianas.	[92].
Cartilagem	Regeneração de defeitos de cartilagem através de <i>scaffolds</i> semeados com células-tronco derivadas de tecido adiposo	[93].
Traquéia	Transplante alográfico de traquéia.	[94].

Tabela 2: Métodos utilizados em descelularizações de membranas amnióticas

Método	Espécie	Tempo de descelularização	Tamanho do Fragmento	Agente e concentração	Resultados	Referências
Químico	Humana	4H	2.0 x 2.0 cm	Triton X-100; 1%	O <i>scaffold</i> promoveu cicatrização acelerada de ferimentos quando comparado a métodos tradicionais.	[75].
Químico, Enzimático	Humana	Dias	1.0 x 1.0 cm	Triton X-100 1%; DNase 2000 U/L; Lipase 2000 U/L	A membrana descelularizada apresentou boa biocompatibilidade e é promissor uso em cirurgias	[95].
Químico	Humana	2H	Inteira	SDS 2%	Quando implantados em feridas em ratos, os <i>scaffolds</i> promoveram cicatrização mais rapidamente se comparados ao grupo controle.	[44].
Químico	Humana	24H	5 X 5 cm <sup>2</sup>	TRITON X-100 1%	Quando implantados intraperitonealmente, os <i>scaffolds</i> de membrana amniótica combinados com fibras de seda demonstraram	[96]

					efeitos anti-inflamatórios e regenerativos superior a outros tipos de enxertos.	
Químico, enzimático	Bovina	12H	10cm x 3cm	SDS 1%, Tripsina 0,5%	Se associada a uma dupla camada de quitosana, o curativo resultante promove cicatrização mais rápida que um curativo tradicional.	[74]
Químico	Humana	30min	2.5cm x 2.5cm	EDTA 0.2%	<i>Scaffold</i> foi capaz de reduzir fibrose em doença de adesão intrauterina, mas não demonstrou regeneração significativa se comparado com o controle.	[97].

Não há ainda um consenso sobre a concentração do detergente nem sobre o tempo de exposição quando falamos em descelularização por imersão. Evidentemente, é necessário atingir um equilíbrio adequado entre concentração, tempo de exposição e manutenção dos componentes do *scaffold*. Algumas concentrações não demonstraram resultados satisfatórios como os supracitados. Abaixo segue uma tabela com químicos e suas respectivas concentrações testadas na membrana amniótica que não atingiram os resultados esperados:

Tabela 3: Agentes descelularizantes e concentrações que promoveram desnudamento insatisfatório

Espécie	Agente descelularizante	Concentração	Tempo	Resultados	Referência
Humana	EDTA	0.02-0.1%	0.5-	Tecido não	[98].

			16H	descelularizado por completo, com redução de conteúdo de DNA de apenas 50% do original.	
Humana	SDS	0.03%	24h	Membrana basal conservada, porém dano no mesênquima da arquitetura da matriz.	[43].
Humana	NaOH; EDTA	0.5M; 0.2%	30min	A membrana descelularizada não foi capaz de prevenir proliferação bacteriana.	[99].
Humana	EDTA	0.02%	2H	A preservação da membrana basal e a adesão e proliferação celular foram menores se comparadas ao método de desnudamento por uréia 5M	[100].
Bovina	SDS; Tripsina	1%; 0.25%	12H	A descclularização foi mais eficiente com maior tempo de exposição e maior concentração de tripsina	[74].
Bovina	Tween; NaOH	80; 0.1	4H;1H	Conteúdo de DNA pós descclularização mais elevado se comparado aos métodos com o uso de SDS 0.1%	[45].

Humana	Cloreto de Amônio;	5%;	30min	Matriz resultante apresentou danos extensos e houve persistência de material celular após o tratamento	[44].
--------	--------------------	-----	-------	--	-------

## 7.0 Prospecções na área industrial

Um dos desafios na produção de *scaffolds* é maximizar a regeneração de um órgão ou tecido específico, para isso é necessário um design que seja compatível com a hierarquia e complexibilidade dos elementos da versão funcional do tecido. Assim sendo, há desafios quando a tecnologia de produção de *scaffolds* adentra a área comercial ou industrial. Para uma dada tecnologia obter sucesso no mundo comercial, é imperativo que ele tenha 3 características principais, sendo elas: grande nicho de possibilidades de aplicação nas mais diversas áreas possíveis; uma forte publicação científica que evidencie a solidez do produto nos testes pré clínicos e clínicos; e uma patente eficiente no sentido de garantir a exclusividade da tecnologia e dos novos métodos que surgem a partir dela. Além disso, a tecnologia deve apresentar relativa facilidade na sua reprodutibilidade e manufatura, e a companhia deve sempre considerar o potencial da tecnologia, atrelado com o custo e a possibilidade de reembolso [101].

Para trazer produtos farmacêuticos ou médicos para o mercado, é necessário desembolsar quantias financeiras razoavelmente altas. Estima-se que uma empresa farmacêutica gasta em média 850 milhões de dólares para trazer uma nova droga ou tecnologia ao mercado, valor esse que pode subir para 1.8 bilhão de dólares depois da capitalização. No caso de tecidos produzidos através da bioengenharia, dados mostram que a venda desses produtos triplicaram desde a segunda metade dos anos 2000, arrecadando um total de 3.5 bilhões de dólares por ano, em contraste com o gasto semelhante das empresas e o emprego de mais de 14.000 funcionários na área [102].

Os *scaffolds* também apresentam limitações, como todo estudo preliminar. Para prática clínica, essas peças costumam ser custosas financeiramente, compreendendo uma faixa de menos de 10\$/cm<sup>2</sup> a mais de 30\$/cm<sup>2</sup>. Como esses materiais são produzidos em tamanhos limitados, muitas vezes requerem mais de um produto para reparar danos extensos [103]. Outra limitação, desta vez de cunho biológico, é a presença de reminentes celulares, nucleares e químicos em *scaffolds* provenientes de processos de decelularização. Esses resquícios podem desencadear processos imunológicos se implantados em seres vivos. Dependendo da concentração de detergentes e do método utilizado para o processo de decelularização, é

necessário também considerar os eventuais danos que podem estar presentes no material final. Danos como a interrupção de fibras de colágeno e destruição de fatores de crescimento da MEC podem comprometer a qualidade e o uso do *scaffold*. Para evitar certos problemas que surgem a partir desses fatores, é recomendável o uso de métodos para identificar a integridade da MEC resultante do processo e a análise do conteúdo de material nuclear restante no produto final [104].

Além disso, pode haver limitações religiosas por parte de alguns pacientes, que apresentam preocupações quanto à implantação de tecido de origem animal ou humana em seu corpo [103]. Diante desses obstáculos, cada vez mais se tem buscado a otimização da produção e uso de *scaffolds*.

## 8.0 Considerações finais

A bioengenharia tecidual oferece alternativas consideravelmente mais acessíveis e rápidas para algumas doenças e condições que impõem grande sofrimento ao ser humano e ao sistema de saúde. Com o advento dos métodos de descclularização, é possível contornar algumas dessas dificuldades e reduzir o custo do tratamento; especialmente no que diz respeito à espera da disponibilização de órgãos e tecidos, uma vez que os materiais produzidos pela técnica podem ser provenientes de outros organismos.

A membrana amniótica se configura como um tecido ideal para tais propósitos, com sua versatilidade e facilidade de coleta, a membrana amniótica pode servir como enxertos e suporte para proliferação celular. Como demonstrado, vários são os procedimentos para a descclularização do tecido em questão. Quanto menor o tempo e a menor quantidade de detergentes utilizados para a descclularização, mais viável se torna o método. O menor tempo possibilita a produção em larga escala do *scaffold*, enquanto concentrações baixas de detergentes minimizam os danos na MEC do *scaffold* resultante, assim como facilita a fase de enxague do produto. Trabalhos como o de Song et al e Milan et al, conseguiram a obtenção de *scaffolds* adequados para o uso utilizando pouco tempo de exposição do tecido ao detergente, 4H e 2H respectivamente [75, 44]. Se considerarmos a concentração, Chen et al, conseguiram decelularizar fragmentos da membrana amniótica em apenas 30 minutos e com concentração de apenas 0.2% de EDTA [97]. Um resultado impressionante se comparado com os outros, que apesar de também serem bem sucedidos, levaram mais tempo e maior concentração de químicos para atingir o resultado.

Evidentemente, a descclularização de membranas ou de órgãos ainda é uma metodologia que ainda se encontra em seus estágios iniciais, mas que possua grande potencial para se tornar um recurso poderoso e popular para a medicina regenerativa humana e veterinária.

**Contribuições autorais:** Os autores contribuíram igualmente na produção do artigo.

**Financiamento:** O projeto foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (CAPES).

**Conflito de interesses:** Os autores declaram que não há conflito de interesses.

## Referências

1. MAMEDE, A. C; CARVALHO, M.J; ABRANTES, A.M; LARANJO, M; MAIA, C.J; BOTELHO, M.F. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Research*. **2012**, 349, 447-458.
2. UNDERWOOD, M. A; GILBERT, W. M; SHERMAN, M. P. State of the Art Amniotic Fluid: Not Just Fetal Urine Anymore. *Journal of Perinatology*; **2005**, 25, 341-348.
3. FAVARON, P. O., CARVALHO, R. C., BORGHESI, J., ANUNCIACÃO, A. R. A., & MIGLINO, M. A. The amniotic membrane: development and potential applications—a review. *Reproduction in domestic animals*, **2015**,50(6), 881-892.
4. TODA, A; OKABE, M; YOSHIDA, T; NIKAIDO, T; The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *Journal of Pharmacological Science*, **2007**, 105, 215–228.
5. SADLER, T.; Langmans medical embryology. Slock, London; 2000
6. McDONALD, C; SIATSKAS, C; BERNARD C, C, A; The emergence of amnion epithelial stem cells for the treatment of Multiple Sclerosis. *Inflammation and Regeneration*. **2011**, 31: 3, 256-271.
7. CARUSO, M; CARGNONI, A; PAROLINI, O. Stem Properties of Amniotic Membrane-Derived Cells. Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications. *Springer Netherlands*,. **2015**, 1st ed., 57–76.
8. NIKNEJAD, H; PEIROVI, H; JORJANI, M; AHMADIANI, A; GHANA VI, J; SEIFALIAN A. M. Properties of the Amniotic Membrane for Potential Use in Tissue Engineering. *European Cells & Materials*. **2008**, 15, 88–99.
9. DUA, H.S; GOMES, J. A; KING, A.J; MAHARAJAN, V.S. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* **2004**, 49, 51-77.
10. KIM, J. C.; TSENG, S. C. G. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean Journal of Ophthalmology* **1995**, 9(1), 32
11. LEAL-MARIN, S; KERN, T.; HOFMANN, N; POGOZHYKH, O; FRAMME, C; BORGEL, M; FIGUEIREDO, C; GLASMANCHER, B; GRYSHKOV, O. Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application and storage. *J Biomed Mater Res*. **2019**, 109, 1198-1215.

12. O'BRIEN, FERGAL J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today* **2011**, 14(3), 88-95.
13. DE COPPI, P; BARTSCH, G; SIDDIQUI, M. M; XU, T; SANTOS, C. C; PERIN, L; MOSTOLAVSKY, G; SERRE, A. C; SNYDER, E. Y; YOO, J. J; FURTH, M. E; SOKER, S; ATALA, A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat. Biotech.* **2007**, 25,100-106.
14. ROSSO, F., MARINO, G., GIORDANO, A., BARBARISI, M., PARMEGGIANI, D., BARBARISI, A.. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *Journal of cellular physiology* **2005**, 203.3, 465-470.
15. BADYLAK, S. F; TAYLOR, D; UYGUN, K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* **2011**, 13, 27-53.
16. CRAPO, P. M; GILBERT, T. W; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* **2011**, 32(12), 3233–3243.
17. ISIDAN, A; SHAOHUI, L.; PING, L; LASHMET, M; SMITH, L. J; HARA, H; COOPER, D. K.C; EKSER, B. Decellularization methods for developing porcine corneal xenografts and future perspectives. *Xenotransplantation.* **2020**, 26(6).
18. FRANCISCO, J.C.; CORREA, C. R.; CARDOSO, M.A.; BAGGIO, S. R.; MOGHARBEL, B.F.; PICHARSKI, G.L.; SILVA, M. D. D.; GUARITA-SOUZA, L.C.; CARVALHO, K.A.T. Decellularized Amniotic Membrane Scaffold as a Pericardial Substitute: An In Vivo Study. *Transplant. Proc.* **2016**, 48, 2845–2849.
19. ZHOU, Z.; LONG, D.; HSU, C. C.; LIU, H.; CHEN, L.; SLAVIN, B.; LIN, H.; LI, X.; TANG, J.; YIU, S.; et al. Nanofiber-reinforced decellularized amniotic membrane improves limbal stem cell transplantation in a rabbit model of corneal epithelial defect. *Acta Biomater.* **2019**, 97, 310–320.
20. PATEL, N; SOLANKI, E; PICCIANI, R; CAVETT, V; CALDWELL-BUSBY, J. A; BHATTACHARYA, S.K; Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics. *Proteomics.* **2008**, 8(5), 1055–1070.
21. HOPKINSON, A., SHANMUGANATHAN, V. A., GRAY, T., YEUNG, A. M., LOWE, J., JAMES, D. K., & DUA, H. S. Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **2008** 14(4), 371-381.
22. FUNAMOTO, S; NAM, K; KIMURA, T; MURAKOSHI, A; HASHIMOTO, Y; NIWAYA, K; The use of high hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*, **2010**, 31(13), 3590–3595.

23. SCHENKE-LAYLAND, K; VASILEVSKI, O; OPITZ, F; KONIG, K; RIEMANN, I; HALBHUBER, K. J; Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol.* **2003**, 143(3), 201–208.
24. LEE, R. C; KOLODNEY, M. S. Electrical injury mechanisms: electrical breakdown of cell membranes. *Plast Reconstr Surg.* **1987**, 80(5), 672–679.
25. SANO, M. B; NEAL, R.E 2nd; GARCIA, P. A; GERBER, D; ROBERTSON, J. DAVALOS, R.V. Towards the creation of decellularized organ constructs using irreversible electroporation and active mechanical perfusion. *Biomed Eng Online.* **2010**, 9(1):83.
26. HODDE, J., JANIS, A., ERNST, D., ZOPF, D., SHERMAN, D., & JOHNSON, C. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part I. Composition and matrix architecture. *Journal of materials science: materials in medicine*, **2007**, 18(4), 537-543.
27. DONG, X. WEI, X. YI, W. GU, C. KANG, X. LIU, Y. RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* **2009**.
28. GORSCHESKY, O., KLAKEW, A., RIECHERT, K., PITZL, M., & BECKER, R. Clinical comparison of the Tutoplast allograft and autologous patellar tendon (bone-patellar tendon-bone) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: 2-and 6-year results. *The American journal of sports medicine*, **2005**, 33(8), 1202-1209.
29. COX, B; EMILI, A. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in massspectrometry-based proteomics. *Nat Protoc.* **2006**, 1(4), 1872–1878.
30. ALHAMDANI, M. S; SCHRODER, C; WERNER, J; GIESE, N; BAUER A; HOHEISEL, J. D; Single-step procedure for the isolation of proteins at near-native conditions from mammalian tissue for proteomic analysis on antibody microarrays. *J Proteome Res.* **2010**, 9(2), 963–971.
31. YANG, B; ZHANG, Y; ZHOU, L; SUN, Z; ZHENG, J; CHEN, Y; Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* **2010**, 16(5), 1201–1211.
32. CEBOTARI, S., TUDORACHE, I., JAEKEL, T., HILFIKER, A., DORFMAN, S., TERNES, W., ... & LICHTENBERG, A. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artificial organs*, **2010**, 34(3), 206-210.
33. MEYER, S. R; CHIU, B; CHURCHILL, T. A; ZHU L; LAKEY, J. R; ROSS, D. B. comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. *J Biomed Mater Res A.* **2006**, 79(2), 254–262.
34. PETERSEN, T. H; CALLE, E. A; ZHAO, L; LEE, E. J, Gui L, RAREDON, M. B; Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science.* **2010**, 329(5991), 538–541.

35. KHOSRAVIMELAL, S; MOMENI, M; GHOLIPUR, M; KUNDU, S. C; GHOLIPOURMALEKABADI, M. Protocols for decellularization of human amniotic membrane. *Methods in Cell Biology*. **2020**, 157, 37-47.
36. SULLIVAN D. C; Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials*. **2012**.
37. PRICE, A. P; GODIN, L. M; DOMEK, A; COTER, T; D’CUNHA, J; TAYLOR, D. A; PANOSKALTSIS-MORTARI, A; Automated decellularization of intact, human-sized lungs for tissue engineering. *Tissue Engineering*. **2015**, 21, 94-103.
38. Harvard Apparatus, ORCA Bioreactors <http://www.hoeferinc.com/media/wysiwyg/HART/PDFs/ORCA%20Bioreactor.pdf>.
39. Harvard Apparatus, HPC-3, Hydrostatic Perfusion Chamber for Organ and Tissue Decellularization. [http://www.harvardapparatus.com/media/harvard/pdf/RM1\\_54.pdf](http://www.harvardapparatus.com/media/harvard/pdf/RM1_54.pdf).
40. Ebers Medical, Static tubular chamber overview. <https://ebersmedical.com/154-products/bioreactors/flow-culture/tubular-chambers>. 2019.
41. SHUPE, T; WILLIAMS, M; BROWN, A; WILLENBERG; B; PETERSEN, B. E; Method for the decellularization of intact rat liver. *Organogenesis*; **2010**, 6(2), 134–136.
42. BECKER, M.; MARING, J. A; SCHNEIDER, M; MARTIN, A. X. H; SEIFERT, M; KLEIN, O; BRAUN, T; FALK, V; STAMM, C; Towards a Novel Patch Material for Cardiac Applications: Tissue-Specific Extracellular Matrix Introduces Essential Key Features to Decellularized Amniotic Membrane. **2018**, *International journal of molecular sciences*, 19.
43. WILSHAW, S. P.; KEARNEY, J. N; FISHER, J; INGHAM, E; Production of an Acellular Amniotic Membrane Matrix for Use in Tissue Engineering. *Tissue Engineering*. **2006**, 12(8).
44. MILAN, P. B; AMINI, N; JOGHATAEI, M. T; EBRAHIMI, L; AMOUPOUR, M; SARVEAZAD, A; KARGOZAR, S; MOZAFARI, M; Decellularized human amniotic membrane: From animal models to clinical trials. *Methods*. **2020**, 171, 11-19.
45. VILLAMIL BALLESTEROS, A. C., SEGURA PUELLO, H. R., LOPEZ-GARCIA, J. A., BERNAL-BALLEN, A., NIETO MOSQUERA, D. L., MUNOZ FORERO, D. M., NEIRA BEJARANO, Y. A. Bovine decellularized amniotic membrane: Extracellular matrix as scaffold for mammalian skin. *Polymers*, **2020** 12(3), 590.
46. HAQUE, K. A., PFEIFFER, R. M., BEERMAN, M. B., STRUEWING, J. P., CHANOCK, S. J., & BERGEN, A. W. Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC biotechnology*, **2003**, 3(1), 1-10.
47. FISCHER, A. H., JACOBSON, K. A., ROSE, J., ZELLER, R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold spring harbor protocols*, **2008** (5),.

48. CHANG, J. Y. F; KESSLER, H. P. Masson trichrome stain helps differentiate myofibroma from smooth muscle lesions in the head and neck region. *Journal of the Formosan Medical Association*, **2008**, 107(10), 767-773.
49. WANG, Y., BAO, J., WU, Q., ZHOU, Y., LI, Y., WU, X., BU, H. Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts. *Xenotransplantation*, **2015** 22(1), 48-61.
50. RICH, L., & WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Journal of morphological sciences*, **2017**, 22(2).
51. NAYAKAWDE, N. B; METHE, K; BANERJEE, D; BERG, M; PREMARATNE G. U; OLAUSSON, M. In Vitro Regeneration of Decellularized Pig Esophagus Using Human Amniotic Stem Cells. *BioResearch Open Access*. **2020**, 9:1, 22-36.
52. WILSHAW, S. P; KEARNEY, J; FISHER, J; INGHAM, E. Biocompatibility and Potential of Acellular Human Amniotic Membrane to Support the Attachment and Proliferation of Allogeneic Cells. *tissue engineering: Part A*. **2008**, 14:4, 463-472.
53. GIANCOTTI, F.G.; RUOSLAHTI, E. INTEGRIN SIGNALING. *Science*. **1999**, 285, 1028–1033.
54. BROWN, B.N.; LONDONO, R.; TOTTEY, S.; ZHANG, L.; KUKLA, K.A.; WOLF, M.T.; DALY, K.A.; REING, J. E.; BADYLAK, S.F. Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials. *Acta Biomater* **2012**. 8 ,978–987.
55. NAVA, M.M.; RAIMONDI, M.T.; PIETRABISSA, R. Controlling self-renewal and differentiation of stem cells via mechanical cues. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**.
56. AHMED, E; SALEH, T; XU, M. Recellularization of Native Tissue Derived Acellular Scaffolds with Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. **2021** 10.
57. GILPIN, A., & YANG, Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *BioMed research international*,**2017**.
58. BRACEY, D. N., SEYLER, T. M., JINNAH, A. H., LIVELY, M. O., WILLEY, J. S., SMITH, T. L., WHITLOCK, P. W. A decellularized porcine xenograft-derived bone scaffold for clinical use as a bone graft substitute: a critical evaluation of processing and structure. *Journal of functional biomaterials*, **2018**, 9(3), 45.
59. HEMMRICH, K.; VON HEIMBURG, D. Biomaterials for adipose tissue engineering. *Expert Rev. Medical Devices*. **2006**, 635–645.

60. GIRANDON, L., KREGAR-VELIKONJA, N., BOZIKOV, K., & BARLIC, A. In vitro models for adipose tissue engineering with adipose-derived stem cells using different scaffolds of natural origin. *Folia Biol (Praha)*, **2011**, 57(2), 47-56.
61. ONNELLY, E.D. Breast Reconstruction with a Tissue Engineering and Regenerative Medicine Approach (Systematic Review). *Ann. Biomedical Engineering*. **2020**, 9–25.
62. GIRALDO-GOMEZ, D.M; LEON-MANCILLA, B; DEL PRADO-AUDELO, M.L; SOTRES-VEJA, A; VILLALBA-CALOCA, J; GARCIADIEGO-CAZARES, D; PIÑA-BARBA M.C. Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: Morphological and biophysical characterization. *Material Science and Engineering C*. **2016**, 59, 930–937.
63. ERSHADI, R; RAHIM, M; JAHANY, S; RAKEL, S. Transplantation of the decellularized tracheal allograft in animal model (rabbit). *Asian Journal Surgery*. **2018**, 41(4), 328–332.
64. MAZZA, G; ROMBOUTS, K; HALL, A. R; URBANI, L; LUONG, T. V; AL-AKKAD, W; LONGATO, L; BROWN, D; MAGHSOUDLOU, P; DHILLON A, P; FULLER, B; DAVIDSON, B; MOORE, K; DHAR, D; De COPPI, P; MALAGO, M; PINZANI, M; Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Science Reports*. **2015**, 5, 1–15.
65. MAZZA, G; AL-AKKAD, W; MOORE, K; PINZANI, M; De COPPI, P; ROMBOUTS, K; URBANI, L; LONGATO, L; HALL, A; TELESE, A; ROBISON, B; KONG, K; FRENGUELLI, L; MARRONE, G; WILLACY, O; SHAERI, M; BURNS, A; MALAGO, M; GILBERTSON, J; RENDELL, N; HUGHES, D; NOTINGHER, I; JELL, G; HERNANDEZ, A. D. R; Rapid production of human liver scaffolds for functional tissue engineering by high shear stress oscillation-decellularization. *Science Reports* , **2017** , 7, 1–14.
66. BAIGUERA, S; GAUDIO, C. D; LUCATELLI, E; KUEVDA, E;BOIERI, M; MAZZANTI, B; BIANCO, A; MACCHIARINI, P. Electrospun gelatin scaffolds incorporating rat decellularized brain extracellular matrix for neural tissue engineering. *Biomaterials*. **2014**, 35, 1205–1214.
67. HEIKKINEN, A; PIHLAJANIEMI, T; FAISSNER, A; YUZAKI, M. Neural ECM and Synaptogenesis. *Progress in Brain Research*. **2014**, 214, 29–51.
68. HE, M., & CALLANAN, A. Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, **2013**, 19(3), 194-208.
69. BADYLAK, S.F; FREYTES, D. O; GILBERT, T. W; Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterials*. **2009**, 5, 1–13.
70. FOLLI, S.; CURCIO, A; MELANDRI, D; ROCCO, A; CATANUTO, G; FALCINI, F; PURPUR, V; MINGOZZI, M; BUGGI, F; MARONGIU, F; A New Human-Derived Acellular Dermal Matrix for Breast Reconstruction Available for the European Market: Preliminary Results. *Aesthetic Plastic Surgery*. **2018**, 42, 434–441.

71. BERTASI, R. A. D. O., BERTASI, T. G. D. O., REIGADA, C. P. H., RICETTO, E., BONFIM, K. D. O., SANTOS, L. A., HIRANO, E. S. Perfil dos potenciais doadores de órgãos e fatores relacionados à doação e a não doação de órgãos de uma Organização de Procura de Órgãos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. **2019**, 46.
72. DE GROOT, J., VAN HOEK, M., HOEDEMAEKERS, C., HOITSMA, A., SMEETS, W., VERNOOIJ-DASSEN, M., VAN LEEUWEN, E. Decision making on organ donation: the dilemmas of relatives of potential brain dead donors. *BMC Medical Ethics*, **2015**, 16(1), 1-11.
73. KHOSRAVIMELAL, S; MOMENI, M; GHOLIPUR, M; KUNDU, S. C; GHOLIPOURMALEKABADI, M. Protocols for decellularization of human amniotic membrane. *Methods in Cell Biology*. **2020**, 157, 37-47.
74. YANG, Y., ZHANG, Y., YAN, Y., JI, Q., DAI, Y., JIN, S., TENG, L. A sponge-like double-layer wound dressing with chitosan and decellularized bovine amniotic membrane for promoting diabetic wound healing. *Polymers*, **2020**, 12(3), 535.
75. SONG, M., WANG, W., YE, Q., BU, S., SHEN, Z., & ZHU, Y. The repairing of full-thickness skin deficiency and its biological mechanism using decellularized human amniotic membrane as the wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*, **2017**, 77, 739-747.
76. MACÁRIO, F. C. B., SILVESTRE, K. P., SAKATA, S. H. Displasia coxofemoral em cão de raça lhasa apso. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, **2021**, 4(1), 77-80.
77. TSCHOEKE, B., FLANAGAN, T. C., KOCH, S., HARWOKO, M. S., DEICHMANN, T., ELLÅ, V., JOCKENHOEVEL, S. Tissue-engineered small-caliber vascular graft based on a novel biodegradable composite fibrin-poly lactide scaffold. *Tissue Engineering Part A*, **2009**, 15(8), 1909-1918.
78. BADYLAK, S. F., VORP, D. A., SPIEVACK, A. R., SIMMONS-BYRD, A., HANKE, J., FREYTES, D. O., NIEPONICE, A. Esophageal reconstruction with ECM and muscle tissue in a dog model. *Journal of Surgical Research*, **2005**, 128(1), 87-97.
79. KIRKER, K. R., LUO, Y., NIELSON, J. H., SHELBY, J., & PRESTWICH, G. D. Glycosaminoglycan hydrogel films as bio-interactive dressings for wound healing. *Biomaterials*, **2002**, 23(17), pp. 3661-3671.
80. PILLIAR, R. M., KANDEL, R. A., GRYNPAS, M. D., ZALZAL, P., HURTIG, M. Osteochondral defect repair using a novel tissue engineering approach: sheep model study. *Technology and Health Care*, **2007**, 15(1), 47-56.
81. PAN, M. X., HU, P. Y., CHENG, Y., CAI, L. Q., RAO, X. H., WANG, Y., & GAO, Y. An efficient method for decellularization of the rat liver. *Journal of the Formosan Medical Association*, **2014**, 113(10), 680-687.

82. SALLUSTIO, F; SERINO, G; SCHEA, F. P. Potential Reparative Role of Resident Adult Renal Stem/Progenitor Cells in Acute Kidney Injury. *BioResearch open access* , **2015**, 4. pp. 326-333.
83. QAIS, A. A; OLIVER, J. A. Stem cells in the kidney. *Kidney International* **2002**, 61, 387-395;
84. VENUGOPAL, J.R; PRABHAKARAN, M. P; MUKHERJEE, S; RAVICHANDRAN, R; DAN, K; RAMAKRISHNA, S. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. *Journal of the Royal Society Interface*, **2011** 9, 1-19.
85. HONGYU, Z; YUJUN, Z; FENGXI, M; PING, B; LIANHUA, B. Orthotopic transplantation of decellularized liver scaffold in mice. *International Journal of Clinical & Experimental Medicine*. **2015**, 8 pp. 598-606.
86. BAPTISTA, P.M; SIDDIQUI, M.M; LOZIER, G; RODRIGUEZ, S.R; ATALA A; SOKER, S. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* **2011**, 53, 604-617.
87. JUN, Z., YUPING, W., YANRAN, H., ZIMING, L., YUWAN, L., XIZHONG, Z., XIAOJI, L. Human acellular amniotic membrane scaffolds encapsulating juvenile cartilage fragments accelerate the repair of rabbit osteochondral defects. *Bone & Joint Research*, **2022**, 11(6), 349-361.
88. MURPHY, S.V; SKARDAL, A; ATALA, A. Amniotic membrane powder and its use in wound healing and tissue engineering constructs. *European Patent Office*; **2019**
89. FINGER, P. T; JAIN, P; MUKKAMALA, S. K. Super-thick amniotic membrane graft for ocular surface reconstruction. *Am J Ophthalmol*. **2019**, 198 , 45-53.
90. REVI, D; VINEETHA, V. P; MUHAMED, J. SURENDRAN, G. C; RAJAN, A; KUMARY, T. V; ANILKUMAR, T. V. Wound healing potential of scaffolds prepared from porcine jejunum and urinary bladder by a non-detergent/enzymatic method. *Journal of biomaterials applications*. **2015**, 29, 1218-1229.
91. MARTIN, N. D., SCHANER, P. J., TULENKO, T. N., SHAPIRO, I. M., DIMATTEO, C. A., WILLIAMS, T. K., DIMUZIO, P. J. In vivo behavior of decellularized vein Allograft1, 2. *Journal of surgical research*, **2005**, 129(1), 17-23.
92. LIU, W. Y., LIN, S. G., ZHUO, R. Y., XIE, Y. Y., PAN, W., LIN, X. F., & SHEN, F. X. Xenogeneic decellularized scaffold: a novel platform for ovary regeneration. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **2017**, 23(2), 61-71.
93. KANG, H., PENG, J., LU, S., LIU, S., ZHANG, L., HUANG, J., GUO, Q. In vivo cartilage repair using adipose-derived stem cell-loaded decellularized cartilage ECM scaffolds. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, **2014** 8(6), 442-453.

94. WANG, Z., SUN, F., LU, Y., ZHANG, B., ZHANG, G., SHI, H. Rapid preparation method for preparing tracheal Decellularized scaffolds: vacuum assistance and optimization of DNase I. *ACS omega*, **2021**, 6(16), pp. 10637-10644.
95. SHI, P., GAO, M., SHEN, Q., HOU, L., ZHU, Y., WANG, J. Biocompatible surgical meshes based on decellularized human amniotic membrane. *Materials Science and Engineering: C*, **2015**, 54, pp. 112-119.
96. LIU, Z., ZHU, X., ZHU, T., TANG, R. evaluation of a biocomposite mesh modified with decellularized human amniotic membrane for intraperitoneal onlay mesh repair. *ACS omega*, **2020**, 5(7), pp. 3550-3562.
97. CHEN, X., ZHOU, Y., SUN, Y., JI, T., & DAI, H. Transplantation of decellularized and lyophilized amniotic membrane inhibits endometrial fibrosis by regulating connective tissue growth factor and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **2021**, 22(3), 1-8.
98. SANLUIS-VERDES, A., YEBRA-PIMENTEL VILAR, M. T., GARCÍA-BARREIRO, J. J., GARCÍA-CAMBA, M., IBÁÑEZ, J. S., DOMÉNECH, N., & RENDAL-VÁZQUEZ, M. E. (). Production of an acellular matrix from amniotic membrane for the synthesis of a human skin equivalent. *Cell and tissue banking*, **2015**, 16, 411-423
99. BEHRUZI, M., GHASEMI HAMIDABADI, H., GHOLIPOUR MALEKABADI, M., REZAEI, N., NAZM BOJNORDI, M., & MALEKZADEH SHAFAROU DI, M. Using Hydroxyapatite-Gelatin Scaffold Seeded with Bone Marrow Stromal Cells as a Bone Graft in Animal Model. **2016**, *ISMJ*, 19(5), 773-786.
100. ZHANG TING, GARY HIN-FAI YAM, ANDRI K. RIAU, REBEKAH POH, JOHN C. ALLEN, GARY S. PEH, ROGER W. BEUERMAN, DONALD T. TAN, JODHBIR S. MEHTA; The Effect of Amniotic Membrane De-Epithelialization Method on its Biological Properties and Ability to Promote Limbal Epithelial Cell Culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**; 54(4):3072-3081.
101. WEBBER, M. J., KHAN, O. F., SYDLIK, S. A., TANG, B. C., & LANGER, R. A perspective on the clinical translation of scaffolds for tissue engineering. *Annals of biomedical engineering*, **2015**, 43, 641-656.
102. JAKLENEC, A., STAMP, A., DEWEERD, E., SHERWIN, A., & LANGER, R. Progress in the tissue engineering and stem cell industry “are we there yet?”. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, **2012**, 18(3), 155-166.
103. DEEKEN, C. R., ELIASON, B. J., PICHERT, M. D., GRANT, S. A., FRISELLA, M. M., & MATTHEWS, B. D. Differentiation of biologic scaffold materials through

physicomechanical, thermal, and enzymatic degradation techniques. *Annals of surgery*, **2012** 255(3), 595-604.

104. CHAKRABORTY, P. K., ADHIKARI, J., & SAHA, P. (). Facile fabrication of electrospun regenerated cellulose nanofiber scaffold for potential bone-tissue engineering application. *International journal of biological macromolecules*, **2019**, 122, 644-652.

## 6.0 Conclusão

A descelularização de órgãos e tecidos se apresenta como um método alternativo moderno para a medicina regenerativa, principalmente na área de transplantes e enxertos. Muitos são os procedimentos pelo qual a técnica é desenvolvida; entretanto, para um resultado ideal, é necessário levar em consideração o método utilizado e o tipo de tecido que será descelularizado.

Nesta dissertação reunimos trabalhos que visavam a descelularização de órgãos e tecidos, especialmente da membrana amniótica. Essa membrana fetal é particularmente vantajosa, pois apresenta fácil acessibilidade, facilita regras bioéticas para pesquisa, não é essencial ao sujeito doador e é rica em elementos da matriz extracelular, produzindo *scaffolds* biológicos de qualidade e valor comercial. Evidentemente, ainda não há um consenso sobre qual método ou concentração de descelularização é melhor para se atingir o *scaffold* ideal, todavia, neste trabalho listamos alguns dos quais foram bem sucedidos em produzir um produto final satisfatório. Essas informações podem servir de ponto de partida para pesquisadores que pretendam começar na área de descelularização de tecidos e de uso da membrana amniótica como biomaterial na medicina regenerativa.

## 7.0 Referências

ABTO - Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Disponível em: <<https://site.abto.org.br/>>.

ALIZADEH M. *et al.* Evaluation of vacuum washing in the removal of SDS from decellularized bovine pericardium: method and device description. **Heliyon**. v. 5, 2019.

AIMAR, A.; PALERMO, A.; INNOCENTI, B. The Role of 3D Printing in Medical Applications: A State of the Art. **Journal of Healthcare Engineering**, v. 2019, 2019.

da ANUNCIACÃO, A. R. A., *et al.* Extracellular matrix in epitheliochorial, endotheliochorial and haemochorial placentation and its potential application for regenerative medicine. **Reproduction in Domestic Animals**, 52(1), 2017.

BADYLAK, S. F. Regenerative medicine and developmental biology: The role of the extracellular matrix. **The Anatomical Record Part B: The New Anatomist**, v. 287B, 2005.

BADYLAK, S.F. *et al.* Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. **Acta Biomaterials**. v. 5, 2009.

BAPTISTA, P. M. *et al.* The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. **Hepatology**, v. 53, 2011.

- KEANE, T. J., SWINEHART, I. T., & BADYLAK, S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods**. v. 84 2015.
- BAIGUERA, S *et al* Electrospun gelatin scaffolds incorporating rat decellularized brain extracellular matrix for neural tissue engineering. **Biomaterials**., v. 35, 2014.
- BAPTISTA P.M. *et al*. Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol**. 2009 Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/5333145>>. Acesso em: 13 junho 2022.
- BECKER, M.; *et al*. Towards a Novel Patch Material for Cardiac Applications: Tissue-Specific Extracellular Matrix Introduces Essential Key Features to Decellularized Amniotic Membrane. **International journal of molecular sciences**, v.19. 2018.
- BELARDELLI, F *et al*. Translational research on advanced therapies. **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, v. 47, 2011.
- BERTASI R. A. O. *et al*. Perfil dos potenciais doadores de órgãos e fatores relacionados à doação e a não doação de órgãos de uma Organização de Procura de Órgãos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 46. 2019
- BRACEY, D.N, *et al* A decellularized porcine xenograft-derived bone scaffold for clinical use as a bone graft substitute: A critical evaluation of processing and structure. **Journal of Functional Biomaterial**. v. 19, 2018.
- BREUING K.H, COLWEL A.S. Inferolateral AlloDerm hammock for implant coverage in breast reconstruction. **Annals of Plastic Surgery**.. v.59 , 2007.
- BRIGIDO, S. A.; CARRINGTON, S. C.; PROTZMAN, N. M. The Use of Decellularized Human Placenta in Full-Thickness Wound Repair and Periarticular Soft Tissue Reconstruction. **Clinics in podiatric medicine and surgery** v. 35, 2018.
- BORGHESI, J. *et al*. Canine amniotic membrane mesenchymal stromal/stem cells: Isolation, characterization and differentiation. **Tissue and cell** v. 58, 2019.
- BORGHESI, J. *et al*. Effects of doxorubicin associated with amniotic membrane stem cells in the treatment of canine inflammatory breast carcinoma (IPC-366) cells. **BMC Veterinary Research**, v. 16, 2020.
- CASARI D. M. *et al*. A novel supercritical CO<sub>2</sub> -based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties. **Journal of Supercritical Fluids**. v.131, 2018
- CEBOTARI S. *et al*. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. **Artificial Organs**. v.34, 2010.
- CHAKRABORTY, J; ROY, S; GHOSH, S; Regulation of decellularized matrix mediated immune response. **Biomaterials Science**. v.8 2019.
- CHEN, F.-M. *et al*. Prospects for translational regenerative medicine. **Biotechnology Advances**, v. 30, 2012.
- CHOUDHURY D. *et al*. Decellularization systems and devices: State-of-the-art. **Acta Biomaterialia**. v. 115 , 2020.
- CIUBOTARU A. *et al*. Ex vivo Approach to Treat Failing Organs: Expanding the Limits. **European Surgical Research**. v. 54 2015.
- COELHO, G. H. F; BONELLA A. E. Doação de órgãos e tecidos humanos: a transplantação na Espanha e no Brasil. **Revista Bioética**. v.27, 2019.
- COOPER D.K.C, *et al*. Progress in pig-to-non-human primate transplantation models (1998–2013): a comprehensive review of the literature. **Xenotransplantation**. v. 21, 2016.
- COOPER D.K.C. Early clinical xenotransplantation experiences-An interview with Thomas E. Starzl, MD, PhD. **Xenotransplantation**. v. 24, 2017.
- CRAPO P. M. *et al*. An overview of tissue and whole organ decellularization processes, **Biomaterials**.. v, 32, 2011
- DEEKEN *et al*. Differentiation of Biologic Scaffold Materials Through Physicomechanical, Thermal, and Enzymatic Degradation Techniques. **Annals of surgery**. v. 255, 2012.

- DUTTA, R. C.; DUTTA, A. K. Comprehension of ECM-Cell dynamics: A prerequisite for tissue regeneration. **Biotechnology Advances**, v. 28, 2010.
- Ebers Medical, Static tubular chamber overview. <https://ebersmedical.com/154-products/bioreactors/flow-culture/tubular-chambers>. 2019.
- FAVARON, P. *et al.* The Amniotic Membrane: Development and Potential Applications - A Review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, 2015.
- FAVARON, P. O., *et al.* Establishment of 3-dimensional scaffolds from hemochorial placentas. **Placenta**. 81. 2019
- FERNANDES, M. *et al.* Amniotic Membrane Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. **Cornea**, v. 24. 2005.
- FERNANDEZ-PEREZ M. *et al.* The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels, **Scientific Reports**. v. 9, 2019
- FLANAGAN, T. C. *et al.* In Vivo Remodeling and Structural Characterization of Fibrin-Based Tissue-Engineered Heart Valves in the Adult Sheep Model. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, 2009.
- FOLLI, S.; *et al.* A New Human-Derived Acellular Dermal Matrix for Breast Reconstruction Available for the European Market: Preliminary Results. **Aesthetic Plastic Surgery**. , v. 42, 2018.
- ERSHADI, R. *et al.* Transplantation of the decellularized tracheal allograft in animal model (rabbit). **Asian Journal Surgery**. v, 41. 2018.
- GIRANDON, L. *et al.* In vitro models for adipose tissue engineering with adipose-derived stem cells using different scaffolds of natural origin. **Folia Biologica**,.v. 57, 2011
- GIRALDO-GOMEZ, D.M *et al.* Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: Morphological and biophysical characterization. **Material Science and Engineering C**. v.59, 2016.
- GIROLAMO, L *et al.* Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A New "Cells as Drugs" Paradigm. Efficacy and Critical Aspects in Cell Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, 2013.
- GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International**,. v. 2017, 2017.
- GOH, S.-K. *et al.* Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. **Biomaterials**, v. 34, 2013.
- GROOT J. *et al.* Decision making on organ donation: the dilemmas of relatives of potential brain dead donors. **BMC Med Ethics**. v. 16, 2015.
- Harvard Apparatus, HPC-3, Hydrostatic Perfusion Chamber for Organ and Tissue Decellularization. [http://www.harvardapparatus.com/media/harvard/pdf/RM1\\_54.pdf](http://www.harvardapparatus.com/media/harvard/pdf/RM1_54.pdf).
- Harvard Apparatus, ORCA Bioreactors <http://www.hoeferinc.com/media/wysiwyg/HART/PDFs/ORCA%20Bioreactor.pdf>.
- HE, M.; CALLANAN, A. Comparison of Methods for Whole-Organ Decellularization in Tissue Engineering of Bioartificial Organs. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 19, 2013.
- HEIKKINEN, A. *et al.* Neural ECM and Synaptogenesis. **Progress in Brain Research**., v. 214, 2014
- HEMMRICH, K.; VON HEIMBURG, D. Biomaterials for adipose tissue engineering. **Expert Rev. Medical Devices**, v. 3, 2006.
- HIGGINBOTHAM L. *et al.* Pre-transplant antibody screening and anti-CD154 costimulation blockade promote long-term xenograft survival in a pig-to-primate kidney transplant model. **Xenotransplantation**., v. 22, 2015.
- HILES M. *et al.* Record Ritchie RD, Altizer AM. Are biologic grafts effective for hernia repair? A systematic review of the literature. **Surgery Innovations**. v. 16, 2009
- HILLEBRANDT, K.H. *et al.* Strategies based on organ decellularization and recellularization. **Transplant**

**International**, v. 2019, 2019.

HWANG R. *et al.* Ex vivo liver resection and autotransplantation: An emerging option in selected indications. **Journal of Hepatology**. v. 69, 2018.

ISHIKAWA, Y. *et al.* Tolerance and Long-Lasting Peripheral Chimerism After Allogeneic Intestinal Transplantation in MGH Miniature Swine. **Transplantation**, v. 89, n. 4, 2010.

IWASE, H. *et al.* Pig kidney graft survival in a baboon for 136 days: longest life-supporting organ graft survival to date. **Xenotransplantation**. v. 22, 2015.

JAKLENEC, A.; STAMP, A; DEWEERD, E; SHERWIN, A; LANGER, R. Progress in the tissue engineering and stem cell industry “are we there yet?”. **Tissue Eng. Part B Rev.** v. 18, 2012;

JANSSEN, M. W. W *et al.* Kidney autotransplantation after nephrectomy and work bench surgery as an ultimate approach to nephron-sparing surgery. **World Journal of Surgical Oncology**. v. 16 ,2018

KIRKER, K. R. *et al.* Glycosaminoglycan Hydrogels as Supplemental Wound Dressings for Donor Sites. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, v. 25, 2004.

KUMAR, S. *et al.* Change in the microenvironment of breast cancer studied by FTIR imaging. v. 138, 2013.

LARSEN, W. J. **Human Embryology** (3rd ed.). Churchill Livingstone., 2001.

LEONEL, L. C. P. C. *et al.* Decellularization of placentas: establishing a protocol. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, 2018.

MACÁRIO, F. C. B.; SILVESTRE, K. P.; SAKATA, S. H. Displasia coxofemoral em cão de raça lhasa apso / Canine hip dysplasia in lhasa apso. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, 2021.

MACHAIDZE, Z. *et al.* Testing of microencapsulated porcine hepatocytes in a new model of fulminant liver failure in baboons. **Xenotransplantation**. v. 3, 2017

MAMEDE A. C. *et al.* Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. **Cell Tissue Research**. v. 349 , 2012.

MAZZA, G. *et al.* Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. **Science Reports.**, v. 5, 2015

MAZZA, G *et al.* Rapid production of human liver scaffolds for functional tissue engineering by high shear stress oscillation-decellularization. **Science Reports.**, v. 7, 2017

MENDIBIL, U. *et al.* Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. **International Journal of Molecular Sciences.**, v. 21, 2020.

MOHIUDDIN M.M, *et al.* Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft. **Nature Communications**. v. 7 2016

NARANJO T. A *et al.* La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I). **Revista Española de Patología**. v. 42, 2009

NIKNEJAD H. *et al.* Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **European Cells and Materials**. v. 15. 2008.

O'BRIEN F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**. v. 21, 2011.

OLIVEIRA, R. A. *et al.* A Retrospective Cohort Study of Risk Factors for Surgical Site Infection Following Liver Transplantation. **Progress in Transplantation**, v. 29, 2019.

ONNELLY, E.D. Breast Reconstruction with a Tissue Engineering and Regenerative Medicine Approach (Systematic Review). **Ann. Biomedical Engineering**, v. 48, 2020.

**OPTN: Organ Procurement and Transplantation Network - OPTN.** Disponível em: <<https://optn.transplant.hrsa.gov/>>.

**Organ Donation and Transplantation.** Disponível em: <<https://data.hrsa.gov/topics/health-systems/organ->

donation>.

OTT H.C *et al.* Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. **Nature Medicine**. v.14 2008.

OTT H. C *et al.* Enhanced in vivo function of bioartificial lungs in rats. **Annals of Thoracic Surgery**. v.3 2011.

PETERSEN *et al.* Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. **Science**. v. 329, 2010

PILLIAR, R. M. *et al.* Formation of Biphasic Constructs Containing Cartilage with a Calcified Zone Interface. **Tissue Engineering**, v. 13, 2007.

PONTICELLI C. The mechanisms of acute transplant rejection revisited. **Journal of the American Society of Nephrology**. v.25 2011.

PORTMANN-LANZ, C. B *et al.* Manufacture of a Cell-free Amnion Matrix Scaffold that Supports Amnion Cell Outgrowth In Vitro. **Placenta** v. 28, 2007.

PRICE A. P. *et al.* Automated decellularization of intact, human-sized lungs for tissue engineering, **Tissue Engineering**. v. 21, 2015

RAMSHAW B. J.; BACHMAN S. L. Surgical materials for ventral hernia repair. **General Surgery News**. v. 148 2007.

RANA, A. *et al.* Survival Benefit of Solid-Organ Transplant in the United States. **JAMA Surgery**, v. 28, 2015.

RANA, A.; GODFREY, E. L. Outcomes in Solid-Organ Transplantation: Success and Stagnation. **Texas Heart Institute Journal**. v. 46, 2019.

RODRIGUES, C. *et al.* Low-cost hybrid scaffolds based on polyurethane and gelatin. v. 9, **Journal of Materials Research and Technology**, 2020.

ROSS E.A *et al.* Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. **Journal of American Society of Nephrology**. v. 20, 2009

ROSSO, F. *et al.* Smart materials as scaffolds for tissue engineering. **Journal of Cellular Physiology**, v. 203, 2005.

STANCIOLI, B. *et al.* Brazilian national transplantation system: discussing health and autonomy. **Revista de Direito Sanitário**, v. 21, 2011.

SULLIVAN D. C. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system, **Biomaterials**. v. 33, 2012.

TOLOSA E.M.C, *et al.* Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2. Ed. Baueri, São Paulo: Ed. Manole. 2003.

TSENG, Scheffer CG *et al.* How does amniotic membrane work?. **The ocular surface**, v. 2, 2004.

VOLK, S. W.; THEORET, C. Translating stem cell therapies: The role of companion animals in regenerative medicine. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, 2013.

WATANABE. K; IMAI. S; YASUHIKO. H. Surfactant effects on hydrate formation in an unstirred gas/liquid system: An experimental study using HFC-32 and sodium dodecyl sulfate. **Japan Chemical Engineering Science**., v. 63, 2005.

WEBBER. M .J; KHAN. O. F; SYDLIK S. A; TANG. B. C; LANGER. R. A Perspective on the Clinical Translation of Scaffolds for Tissue Engineering. **Ann Biomed Eng**. v. 43, 2015.

WILSHAW, S. P.; *et al.* Production of an Acellular Amniotic Membrane Matrix for Use in Tissue Engineering. **Tissue Engineering**, v. 12. 2006.

XIN PAN, M, *et al.* An efficient method for decellularization of the rat liver. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 113, 2014.

YANG J. Y.; SARWAL, M. M. Transplant genetics and genomics. **Nature Reviews Genetics**.v. 18 , 2017

ZAWISTOWSKI, M. *et al.*. "Outcomes of ex vivo liver resection and autotransplantation: A systematic review and meta-analysis". **Surgery**., v. 168, 2020

ZHOU, J. A review of the application of autologous blood transfusion. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**.v. 49, 2016.

ZHUANG, Q. *et al.* Graft-infiltrating host dendritic cells play a key role in organ transplant rejection. **Nature Communications**, v.7, 2016.

ZIENOWICZ R. J; KARACAOGLU E. Implant-based breast reconstruction with allograft. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 125, 2007