



Revista Brasileira de Cirurgia
Cardiovascular/Brazilian Journal of
Cardiovascular Surgery

ISSN: 0102-7638

revista@sbccv.org.br

Sociedade Brasileira de Cirurgia
Cardiovascular

Ferretti de Nazareno Wollmann, Luciana Cristina; Laurindo, Carlos A. H.; Diniz Affonso da
Costa, Francisco; Novais Moreno, Andréa

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

Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular/Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery,
vol. 26, núm. 3, julio-septiembre, 2011, pp. 490-496

Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular
São José do Rio Preto, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=398941882029>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

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

Effects of cryopreservation and/or decellularization on extracellular matrix of porcine valves

Luciana Cristina Ferretti de Nazareno Wollmann¹, Carlos A. H. Laurindo², Francisco Diniz Affonso da Costa³, Andréa Novais Moreno⁴

DOI: 10.5935/1678-9741.20110029

RBCCV 44205-1310

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar a morfologia de valvas pulmonares porcinas criopreservadas e/ou descclularizadas para determinar uma solução que remova as células, sem promover danos à matriz extracelular. Valvas pulmonares porcinas foram incubadas por 24h em soluções de deoxicolato de sódio 1% e de dodecil sulfato de sódio 0,1% e 0,3%, com ou sem criopreservação adicional. A avaliação foi feita com microscopia óptica (hematoxilina eosina, orceína acética ou Gomori) e por morfometria. A efetividade das soluções foi variável, mas os melhores resultados foram obtidos com enxertos frescos descclularizados com dodecil sulfato de sódio 0,1%.

Descritores: Engenharia Tecidual. Matriz Extracelular. Biotecnologia. Morfologia.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the morphology of decellularized and/or cryopreserved porcine pulmonary valves, to determine a solution capable of completely remove the cells without damaging the extracellular matrix. Porcine pulmonary valves were incubated for 24 hs in sodium deoxicholate 1% or sodium dodecyl sulfate 0.1 and 0.3%, with or without associated cryopreservation. Evaluation was done with optical microscopy (Hematoxin-Eosin, Acetic Orcein and Gomori) and with morphometric analysis. The effectiveness of the solutions was variable, but the best results were obtained with the sodium dodecyl sulfate solution 0.1%.

Descriptors: Tissue Engineering. Extracellular Matrix. Biotechnology. Morphology.

INTRODUÇÃO

Homoenxertos valvares aórticos e pulmonares têm sido empregados como substitutos valvares ou na correção de cardiopatias congênitas há mais de 40 anos, com resultados clínicos satisfatórios [1,2].

A criopreservação é o método mais frequentemente empregado para o processamento e estocagem desses enxertos, visto que preserva a matriz extracelular (MEC)

relativamente intacta, com manutenção da viabilidade celular, possibilitando a estocagem dos enxertos por até 5-10 anos. Entretanto, alguns trabalhos mais recentes sugerem que a criopreservação pode estar associada a danos estruturais antes não reconhecidos, com alterações significativas nas fibras colágenas e elásticas e perda de glicosaminoglicanos (GAGs) da MEC [3,4].

Acreditou-se por muito tempo que a preservação da viabilidade celular fosse importante, porque resultaria em

1. Graduação; Farmacêutica Bioquímica.

2. Mestrado; Tecnólogo em mecatrônica.

3. Livre docência; Cirurgião Cardíaco.

4. Doutorado; Bióloga.

Endereço para correspondência:

Luciana Cristina Ferretti de Nazareno Wollmann.

Rua Engenheiro Arthur Bettes, 340/1204 – Portão – Curitiba, PR – Brasil – CEP: 80610-290

enxertos com algum grau de capacidade regenerativa e, consequentemente, com maior durabilidade. Entretanto, diversos estudos comprovaram que, após o implante, homoenxertos criopreservados tornam-se rapidamente acelulares, e sujeitos à degeneração tecidual progressiva. Além disso, existem evidências que elevados graus de viabilidade celular possam ser inclusive deletérios, visto que despertam resposta imune mais intensa por parte do hospedeiro, levando à destruição tecidual acelerada [1,3].

Mais recentemente, a metodologia de descelularização tem sido proposta como uma alternativa promissora no processamento de tecidos biológicos [5]. Dentre as várias técnicas descritas, estão o uso de tratamentos enzimáticos [1,6-8], com detergentes aniônicos ou não iônicos e/ou álcool, isoladamente ou em combinação, tais como a tripsina, Triton X-100, Tween-20, CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Deoxicolato de Sódio (DOA), Glicerol e Polietilenoglicol [9-13].

Em teoria, a remoção completa das células resulta em uma matriz acelular e inerte do ponto de vista imunológico, passível de ser repovoada “*in vitro*” em bioreatores ou “*in vivo*” pelo próprio hospedeiro, resultando em um enxerto vivo, com capacidade regenerativa e de crescimento [14,15]. A adequada preservação da MEC durante a descelularização é fundamental, visto que o futuro repovoamento está na dependência da interação com moléculas específicas da matriz que permitem a adesão, proliferação e diferenciação celular [1,5,16,17].

Esse trabalho tem por finalidade analisar as alterações morfológicas na MEC decorrentes do processo de descelularização com diferentes concentrações de SDS ou DOA, isoladamente ou em associação com a criopreservação, buscando determinar um método de processamento tecidual otimizado para a produção de homoenxertos valvares descelularizados.

MÉTODOS

Foram utilizados 32 enxertos valvares pulmonares porcinos, que foram divididos em dois grupos de 16 enxertos cada, de acordo com a técnica inicial de preservação

tecidual. O grupo I consistiu de enxertos frescos, enquanto o Grupo II foi constituído por enxertos criopreservados. Ambos os grupos foram subdivididos em quatro subgrupos com quatro enxertos em cada, de acordo com o tratamento adicional pela descelularização. Os subgrupos IA e IIA não foram descelularizados, enquanto que os subgrupos I e IIB, I e IIC e I e IID foram descelularizados com DOA 1%, SDS 0,1% e SDS 0,3%, respectivamente. A divisão dos enxertos nos subgrupos está representada na Tabela 1.

Enxertos valvares pulmonares porcinos

Foram utilizados corações de porcos brancos machos da raça Landrace, com idade entre 90 e 120 dias. Logo após o abate, os corações foram imersos em solução salina 0,9% gelada a 4°C, sendo então transportados até o laboratório. O tempo de isquemia total, entre o sacrifício e a dissecação, nunca ultrapassou 20h, e a temperatura máxima da solução de transporte do enxerto não ultrapassou 10°C. Os enxertos foram preparados dissecando-se a musculatura da via de saída do ventrículo direito proximalmente, deixando-se uma borda muscular de apenas 3 a 5 mm e fazendo-se a transecção distal do tronco da artéria pulmonar 1 a 2 cm acima das comissuras da valva pulmonar. A camada adventícia, assim como o tecido gorduroso periadventicial, foi cuidadosamente dissecada em toda a extensão do conduto arterial. Uma vez terminada a dissecação e preparo dos enxertos, quatro foram imediatamente acondicionados para análise histológica – Grupo IA (Grupo Controle – Enxertos Frescos). Todos os demais foram armazenados por algumas horas em solução salina gelada, sendo subsequentemente submetidos ao processo de criopreservação e/ou de descelularização.

Processo de criopreservação

Para a criopreservação, os enxertos foram imersos em 100 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute - mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular), 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) e 10% de soro fetal bovino (SFB). Foram, então, acondicionados em embalagens de alumínio seladas e mantidos a temperatura 2-8°C por 30 minutos. O congelamento foi feito com velocidade de resfriamento

Tabela 1. Enxertos Valvares de acordo com a metodologia de processamento e descelularização

| | Subgrupo A | Subgrupo B | Subgrupo C | Subgrupo D |
|-------------------------|-------------------|--------------|----------------|----------------|
| Grupo I | | | | |
| Enxertos Frescos (n=16) | Não Descel. (n=4) | DOA 1% (n=4) | SDS 0,1% (n=4) | SDS 0,3% (n=4) |
| Grupo II | | | | |
| Enxertos Crio (n=16) | Não Descel. (n=4) | DOA 1% (n=4) | SDS 0,1% (n=4) | SDS 0,3% (n=4) |

Crio = Criopreservados, DOA = Ácido Deoxicólico, SDS = Dodecil Sulfato de Sódio, Não Descel. = Não Descelularizados

tecidual programada de -1° a $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até a temperatura de -80°C com equipamento Planer, *KRYO 10 Series, Model 10-16*. Os enxertos foram, então, estocados por 15 dias em recipientes específicos à temperatura do vapor do nitrogênio líquido (-195°C). O descongelamento foi feito de forma rápida, com soro fisiológico a temperaturas entre $42-50^{\circ}\text{C}$, seguido de diluição gradual do crioprotetor com solução de RPMI 1640 e 10% de SFB [18].

Processo de descelularização

Para a descelularização, os enxertos foram colocados em recipientes individuais contendo 100 ml da solução descelularizante (DOA 1%, SDS 0,1% ou SDS 0,3%), sendo o processo realizado sob agitação constante, em temperatura ambiente, por um período de 24 horas, conforme PI 0800603-2. Após isto, os enxertos foram lavados com solução de cloreto de sódio 0,9% em agitação por um período de 10 dias, para assegurar a remoção completa dos detergentes.

Análise histológica

Para a análise histológica, foram obtidos segmentos de 1 cm^2 da parede arterial dos condutos que foram retirados da região logo acima da junção sinotubular, assim como segmentos da região central das cúspides.

Análise Qualitativa: a análise da morfologia tecidual foi feita com coloração hematoxilina-eosina (HE), sendo avaliados a presença de células, a integridade da MEC e o espaçamento das fibras elásticas e colágenas.

Análise Quantitativa: foram utilizadas as colorações tricrômico de Gomori para análise quantitativa de colágeno, e orceína acética, para as fibras elásticas. A quantificação do colágeno e das fibras elásticas foi feita com programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics), sendo capturadas

imagens das lâminas com colorações específicas para cada componente de matriz (10 imagens em objetiva de 40x de cada lâmina de modo a capturar toda a extensão da cúspide e partes aleatórias de conduto). As imagens foram fotografadas com auxílio de uma câmera Olympus BX50.

Análise estatística

Os resultados da morfometria foram analisados utilizando-se o teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla, sendo consideradas significativas diferenças com valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Análise qualitativa

Os condutos pulmonares do subgrupo controle (IA) apresentaram MEC íntegra, com coloração rósea típica, fibras colágenas e elásticas bem preservadas e com quantidade e morfologia celular típicas desse tipo de tecido. Condutos descelularizados com DOA 1% apresentaram uma MEC mais compactada e com coloração mais azulada que o grupo controle. Essa coloração pode ser decorrente do extravasamento nuclear, uma vez que o DNA pode se fixar a glicoproteínas presentes na MEC. Além disso, havia a presença de diversas células íntegras no interior desta matriz, demonstrando falha deste método em promover a descelularização completa. Já os condutos descelularizados com SDS 0,1% estavam completamente acelulares, sem restos nucleares fixados na matriz, a qual se encontrava visualmente íntegra e sem compactação das fibras. Os condutos descelularizados com SDS 0,3% tiveram achados semelhantes, entretanto, pode-se perceber discreto espaçamento das fibras colágenas (Figura 1 - à esquerda).

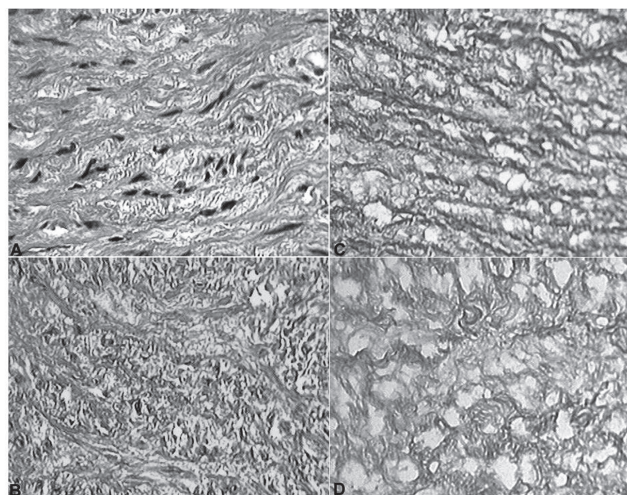
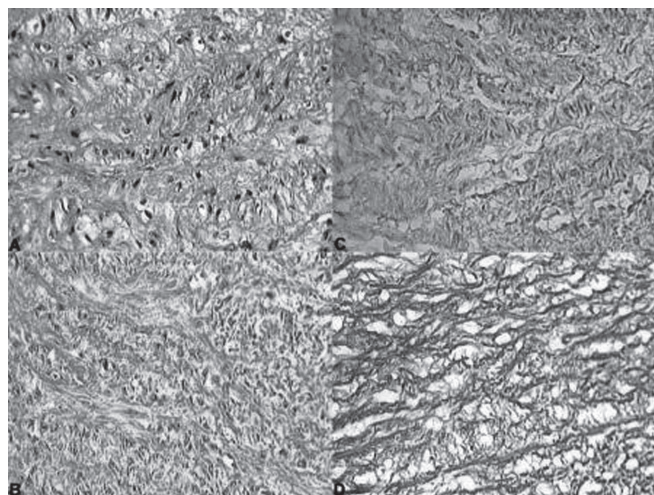


Fig. 1 - À esquerda: análise qualitativa da matriz extracelular de condutos pulmonares submetidos a processo de descelularização. A - Controle Pré-Descelularização. B - DOA 1%; C - SDS 0,1% e D - SDS 0,3%. À direita: análise qualitativa da matriz extracelular de condutos pulmonares criopreservados e submetidos a processo de descelularização. A - Controle criopreservado. B - DOA 1%; C - SDS 0,1% e D - SDS 0,3%

O aspecto histológico dos condutos criopreservados não diferiu muito dos enxertos frescos, porém a observação visual cuidadosa revelou que as fibras estavam mais afastadas entre si, dando um aspecto mais frouxo da MEC quando comparado ao controle “fresco”. Entretanto, ficou evidente que a criopreservação, quando associada ao processo de descclularização, acentuou de forma significativa os danos na MEC, especialmente com a utilização do DOA. Os condutos criopreservados e subsequentemente descclularizados com SDS 0,1% ou com SDS 0,3% revelaram-se compactados em partes do conduto e com espaços maiores entre as fibras, sugerindo maior dano tecidual (Figura 1 - à direita).

A análise das cúspides valvares demonstrou que todos os tratamentos foram efetivos para a remoção completa das células. As cúspides tratadas com SDS 0,1% e DOA 1% estavam com a MEC de aspecto relativamente bem preservado, entretanto, a tratamento com SDS 0,3% resultou em danos significativos, com acentuada compactação das suas fibras (Figura 2 - à esquerda).

Da mesma forma que com os condutos, a criopreservação acentuou os danos observados na MEC das cúspides valvares, especialmente quando tratadas com DOA 1% e SDS 0,3%. As cúspides criopreservadas e tratadas com SDS 0,1%, entretanto, ainda se apresentavam relativamente bem preservadas e mais semelhantes aos do grupo controle (Figura 2 - à direita).

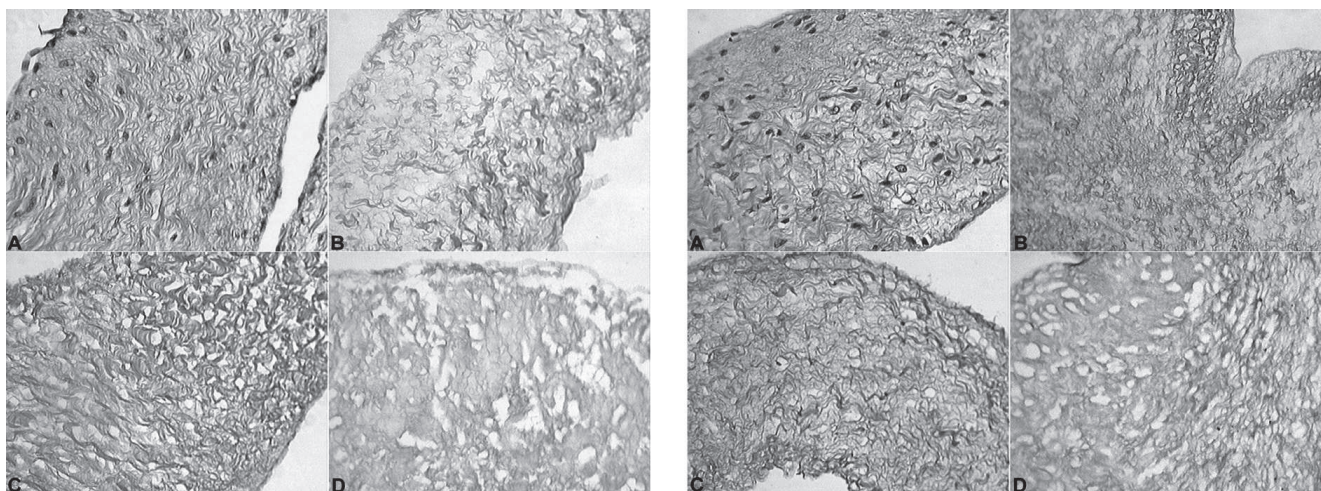


Fig. 2 - À esquerda: análise qualitativa da matriz extracelular de cúspides pulmonares submetidas a processo de descclularização. A - Controle Pré - Descclularização. B - DOA 1%; C - SDS 0,1% e D - SDS 0,3%. À direita: análise qualitativa da matriz extracelular de cúspides pulmonares criopreservadas e submetidas a processo de descclularização. A - Controle: criopreservado e não submetido a processo de descclularização. B - DOA 1%; C - SDS 0,1% e D - SDS 0,3%

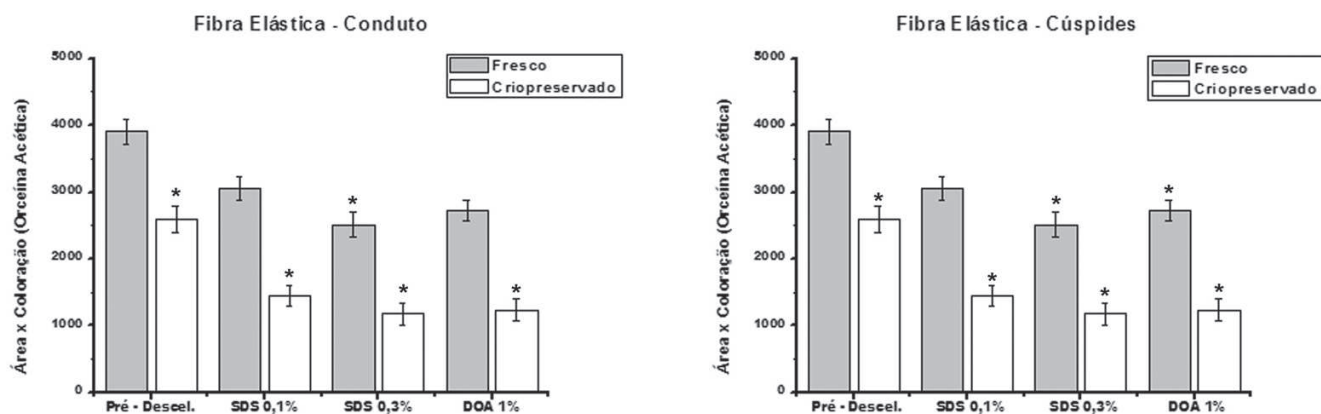


Fig. 3 - À esquerda: análise morfolométrica de lâminas de conduto de ambos os grupos I e II, respectivamente, coradas com orceína acética para observação quantitativa de fibras elásticas. À direita: análise morfolométrica de lâminas de cúspide dos grupos I e II, respectivamente, coradas com orceína acética para observação quantitativa de fibras elásticas. * = $P < 0,05$

Análise quantitativa

Os resultados encontrados na análise morfométrica para fibras elásticas e colágenas encontram-se na Tabela 2.

Fibras elásticas: Comparando somente os enxertos do grupo I, verificamos que a descelularização com SDS 0,1% e DOA 1% não reduziu significativamente a quantidade de fibras elásticas em relação ao controle. Entretanto, o emprego de SDS 0,3% acarretou diferença significativa na mesma comparação (Figura 3).

Os enxertos do grupo II tiveram menor quantidade de fibras elásticas, tanto no conduto como nas cúspides, demonstrando que a criopreservação, por si, interfere na integridade estrutural das fibras. Essas alterações foram mais significativas nas valvas descelularizadas com SDS 0,3%.

Colágeno: nos condutos frescos descelularizados, os

tratamentos feitos com SDS 0,1% e DOA 1% não alteram significativamente a quantidade de colágeno. A alteração da matriz ocorre somente com o tratamento feito com SDS 0,3% nos condutos frescos. Nos condutos criopreservados, observa-se diferença significativa em qualquer um dos tratamentos descelularizantes, sendo do tratamento com SDS 0,3% a diferença mais importante. Resultados semelhantes foram encontrados para as cúspides (Figura 4).

O que se observa na análise dos enxertos frescos é uma diferença insignificante entre o controle e o descelularizado pelo tratamento com SDS 0,1%, e diferença significativa nos outros dois tratamentos, SDS 0,3% e DOA 1%. Nos enxertos criopreservados, há alteração em todos os tratamentos descelularizantes, inclusive nas cúspides criopreservadas sem a descelularização, comparando ao controle.

Tabela 2. Valores obtidos por morfometria (μm^2) - análise estatística

| Fibra Elástica | | | | |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | Conduto | | |
| | Controle | SDS 0,1% | SDS 0,3% | DOA 1% |
| Fresco | 2102 (+- 123) | 2129 (+- 132) | 1220 (+- 121) | 2267 (+- 174) |
| Criopreservado | 1952 (+- 147) | 1847 (+- 112) | 1078 (+- 171) | 2034 (+- 148) |
| | | Cúspide | | |
| | Controle | SDS 0,1% | SDS 0,3% | DOA1% |
| Fresco | 1898 (+- 150) | 1664 (+- 170) | 1264 (+- 163) | 1536 (+- 194) |
| Criopreservado | 1595 (+- 195) | 1450 (+- 146) | 1173 (+- 170) | 1236 (+- 162) |

| Colágeno | | | | |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | Conduto | | |
| | Controle | SDS 0,1% | SD 0,3% | DOA1% |
| Fresco | 2968 (+- 444) | 2706 (+- 443) | 1936 (+- 437) | 2563 (+- 408) |
| Criopreservado | 2731 (+- 302) | 2443 (+- 344) | 1756 (+- 375) | 2163 (+- 323) |
| | | Cúspide | | |
| | Controle | SDS 0,1% | SDS 0,3% | DOA1% |
| Fresco | 3563 (+- 240) | 3113 (+- 242) | 2484 (+- 230) | 3291 (+- 246) |
| Criopreservado | 2867 (+- 191) | 2616 (+- 186) | 1688 (+- 191) | 2053 (+- 193) |

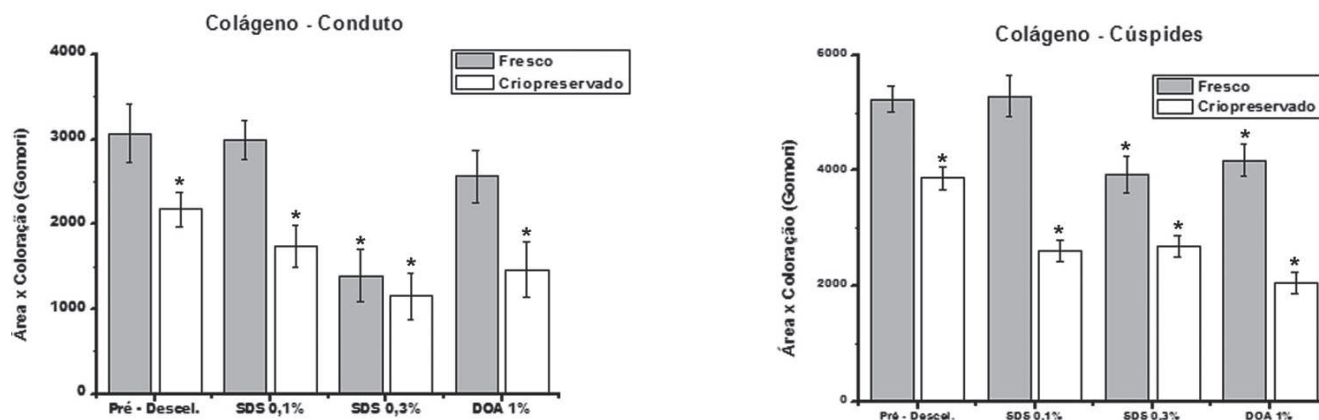


Fig. 4 - À esquerda: análise morfométrica de lâminas de conduto de ambos os grupos I e II, coradas com Gomori para observação quantitativa de colágeno. À direita: análise morfométrica de lâminas de cúspide de ambos os grupos I e II, coradas com Gomori para observação quantitativa de colágeno. * = $P < 0,05$

DISCUSSÃO

Homoenxertos valvares são utilizados para a substituição de valvas cardíacas nativas desde 1962 [2]. Desde então, diversos métodos de preservação e estocagem foram testados [19-21], entretanto, a técnica de criopreservação, por manter a integridade da MEC, preservar a viabilidade celular e permitir a estocagem por longos períodos de tempo, passou a ser metodologia mais frequentemente empregada pelos bancos de tecidos.

Atualmente, é bem determinado que enxertos com viabilidade celular despertam reação imune por parte do receptor [1,3,22], entretanto, a correlação entre a intensidade dessa reação e a longevidade do enxerto ainda é controversa. Além disso, postula-se que diferenças entre as técnicas de esterilização, processamento e estocagem induzam graus variados de reação inflamatória, que podem influir negativamente na longevidade dos enxertos. O uso de matrizes acelulares, pouco antigênicas, e capazes de serem repovoadas após o implante, podem, ao menos em teoria, resultar em enxertos funcionais e com maior durabilidade [1,5,16].

Idealmente, a técnica de descelularização deveria ser capaz de remover completamente todas as células e debris celulares e, ao mesmo tempo, manter a integridade da matriz extracelular. Nosso grupo de pesquisa do Núcleo de Enxertos Cardiovasculares da PUCPR testou diversas soluções descelularizantes, e aquelas que demonstraram os melhores resultados, DOA 1%, SDS 0,1% e SDS 0,3% [8,11,16,17,23,24], foram selecionadas para o presente estudo. Por outro lado, a técnica de criopreservação aqui empregada foi semelhante àquela utilizada pelo Banco de Valvas Cardíacas Humanas da Santa Casa de Curitiba [18].

Nossos resultados demonstraram que o SDS, em ambas as concentrações, foi efetivo na eliminação completa das células tanto das cúspides como da parede arterial de enxertos pulmonares porcinos. Já o DOA 1% foi efetivo na descelularização das cúspides, entretanto, insuficiente para a parede arterial dos condutos. Esses dados demonstram a importância de se adequar a concentração e tempo de exposição da solução descelularizante de acordo com o tipo do tecido a ser tratado. Assim, uma solução que é efetiva para a descelularização da parede arterial pulmonar pode ser insuficiente na descelularização da parede aórtica. Por outro lado, o uso de soluções mais concentradas pode ser ideal para a parede do conduto, mas, ao mesmo tempo, levar a alterações significativas da MEC das cúspides valvares.

A análise histológica demonstrou que, além de sua melhor capacidade de remover as células, o SDS promoveu menor dano à MEC quando comparado com o DOA, especialmente na concentração de 0,1%. Pode-se observar também que, a criopreservação, por si só, levou a alterações na MEC, e a adição da criopreservação com as soluções descelularizantes potencializa esses danos. Isto ficou bem evidenciado no tecido mais delicado das cúspides valvares, as quais se apresentaram bastante alteradas quando

submetidas à criopreservação e, posteriormente, descelularizadas com DOA 1% ou SDS 0,3%.

Existem controvérsias com relação aos danos teciduais causados durante a criopreservação. Schenke-Layland et al. [3] estudaram condutos porcinos frescos e criopreservados e demonstraram que, apesar das alterações verificadas pela histologia convencional serem discretas, a análise mais detalhada feita com laser infravermelho sob microscopia confocal pode demonstrar deterioração ultraestrutural e desintegração das estruturas colágenas. Esses achados não foram confirmados por Gerson et al. [25] que, empregando a mesma metodologia, demonstraram adequada preservação de toda a estrutura da MEC após a criopreservação. Apesar da discrepância desses resultados não serem aparentes, diferenças na metodologia de criopreservação e do tecido estudado podem, ao menos parcialmente, estarem implicadas.

Revisão bibliográfica sugere que nosso estudo é o primeiro a analisar as alterações nas fibras colágenas e elásticas por morfometria da MEC. Os resultados demonstraram que a descelularização com SDS 0,1% não alterou a quantidade de fibras elásticas e colágenas das cúspides e do conduto pulmonar quando comparadas ao tecido fresco. Entretanto, a descelularização com SDS 0,3% ou DOA 1% esteve associada a menores concentrações dessas fibras, sendo essas perdas acentuadas de forma significativa pela associação da criopreservação. Os resultados aqui obtidos são inéditos, uma vez que não há referência de análise quantitativa por análise morfométrica de componentes da MEC em valvas submetidas a processos de descelularização, e podem servir de referência em futuras investigações.

A avaliação de enxertos descelularizados como substitutos valvares é bastante complexa, e envolve não somente a sua caracterização histológica, mas também sua caracterização biomecânica, biocompatibilidade, imunogenicidade e potencial de repovoamento celular. Entretanto, postula-se que uma matriz íntegra com ausência completa de células seja essencial para a obtenção de enxertos que venham a ser adequadamente repovoados por células específicas, sem tendência à degeneração, sendo duráveis, com potencial regenerativo e de crescimento. Em vista dos resultados aqui obtidos, podemos sugerir que enxertos frescos e descelularizados com solução de SDS 0,1% sejam os que melhor preencham estas premissas teóricas.

REFERÊNCIAS

1. Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Repin O, Batrinac A, et al. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation*. 2002;106(12 suppl 1):I63-8.
2. Ross DN. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet*. 1962;2(7254):487.

3. Schenke-Layland K, Madershahian N, Riemann I, Starcher B, Halbhuber KJ, König K, et al. Impact of cryopreservation on extracellular matrix structures of heart valve leaflets. *Ann Thorac Surg*. 2006;81(3):918-26.
4. Narine K, Ing EC, Cornelissen M, Desomer F, Beele H, Vanlangenhove L, et al. Readily available porcine aortic valve matrices for use in tissue valve engineering. Is cryopreservation an option? *Cryobiology*. 2006;53(2):169-81.
5. Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation*. 2000;102(19 Suppl 3):III50-5.
6. Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, Kirsch L, Hurschler C, Hilfiker A, et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis*. 2007;16(5):567-73.
7. Karim N, Golz K, Bader A. The cardiovascular tissue-reactor: a novel device for the engineering of heart valves. *Artif Organs*. 2006;30(10):809-14.
8. Grauss RW, Hazekamp MG, van Vliet S, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126(6):2003-10.
9. Meyer SR, Chiu B, Churchill TA, Zhu L, Lakey JR, Ross DB. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. *J Biomed Mater Res A*. 2006;79(2):254-62.
10. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;27(4):566-71.
11. Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis*. 2002;11(4):457-62.
12. Mirsadraee S, Wilcox HE, Korossis SA, Kearney JN, Watterson KG, Fisher J, et al. Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering. *Tissue Eng*. 2006;12(4):763-73.
13. Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G, et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs*. 2003;26(5):421-7.
14. Schenke-Layland K, Riemann I, Opitz F, König K, Halbhuber KJ, Stock UA. Comparative study of cellular and extracellular matrix composition of native and tissue engineered heart valves. *Matrix Biol*. 2004;23(2):113-25.
15. Leyh RG, Wilhelmi M, Rebe P, Fischer S, Kofidis T, Haverich A, et al. *In vivo* repopulation of xenogenic and allogenic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation. *Ann Thorac Surg*. 2003;75(5):1457-63.
16. Dohmen PM, da Costa FD, da Costa IS, Konertz W. Valvas cardíacas obtidas por engenharia de tecidos: A mais nova geração de próteses biológicas. *Arq Bras Cardiol*. 2002;79(5):555-9.
17. Dohmen PM, Ozaki S, Nitsch R, Yperman J, Flameng W, Konertz W. A tissue engineered heart valve implanted in a juvenile sheep model. *Med Sci Monit*. 2003;9(4):BR97-BR104.
18. Costa MTBA, da Costa FDA, Nazareno LCF, Domachoski J, Peruzzo AM, Colatusso C, et al. Análise das atividades dos oito anos iniciais do Banco de Valvas Cardíacas Humanas do Hospital de Caridade da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2005;20(4):398-407.
19. Hopkins RA. Historical development of the use of homograft valves. In: *Cardiac reconstructions with allograft valves*. New York:Springer-Verlag;1989. p.3-13.
20. Hopkins RA. Rationale for use of cryopreserved allograft tissues for cardiac reconstructions. In: *Cardiac reconstructions with allograft valves*. New York:Springer-Verlag;1989. p.15-20.
21. Parker R. An international survey of allograft banks. In: Yankah A.C., Yacoub, M.H., Hetzer, R. *Cardiac valve allografts: science and practice*. Darmstadt: Springer;1997. p.5-9.
22. da Costa FD, Dohmen PM, Duarte D, von Glenn C, Lopes SV, Haggi Filho H, et al. Immunological and echocardiographic evaluation of decellularized versus cryopreserved allografts during the Ross operation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;27(4):572-8.
23. da Costa FDA, Dohmen P, Lopes SV, Pohl F, Vilani R, Vieira ED, et al. Estudo experimental com heteroenxertos valvares descclularizados: a prótese do futuro. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2004;19(1):74-82.
24. Costa FDA, Dohmen P, Vieira ED, Lopes SV, Colatusso C, Pereira EWL et al. Operação de Ross com homoenxertos valvares descclularizados: resultados de médio prazo. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2007;22(4):454-62.
25. Gerson CJ, Goldstein S, Heacox AE. Retained structural integrity of collagen and elastin within cryopreserved human heart valve tissue as detected by two-photon laser scanning confocal microscopy. *Cryobiology*. 2009;59(2):171-9.