

ANTONIO ALEXANDRE SPERI ALVES

**Placenta bovina de clones descelularizada como fonte de  
“scaffolds” biológicos**

SÃO PAULO

2019

**ANTONIO ALEXANDRE SPERI ALVES**

**Placenta bovina de clones descelularizada como fonte de “scaffolds”  
biológicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Departamento:** Cirurgia

**Área de Concentração:** Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

**Orientador:** Dr. Rodrigo Silva Nunes Barreto.

São Paulo  
2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3833  
FMVZ

Alves, Antonio Alexandre Speri  
Placenta bovina de clones descelularizada como fonte de "scaffolds" biológicos /  
Antonio Alexandre Speri Alves. – 2019.  
53 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Nunes Barreto.

1. Placenta bovina. 2. Matriz extracelular. 3. "Scaffold" biológico. 4. Descelularização. 5.  
Medicina regenerativa. I. Título.

# Certificado do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "PLACENTA BOVINA DE CLONES DESCELULARIZADA COMO FONTE DE SCAFFOLDS BIOLÓGICOS", protocolada sob o CEUA nº 2043140817 (ID 005103), sob a responsabilidade de **Rodrigo da Silva Nunes Barreto e equipe; Antonio Alexandre Speri Alves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 20/06/2018.

We certify that the proposal "DECELULARIZED CLONED BOVINE PLACENTA AS BIOLOGICAL SCAFFOLDS SOURCE", utilizing 10 Bovines (10 females), protocol number CEUA 2043140817 (ID 005103), under the responsibility of **Rodrigo da Silva Nunes Barreto and team; Antonio Alexandre Speri Alves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/20/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2017](#) a [08/2019](#)

Área: [Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres](#)

Origem: [Amostras biológicas estocadas](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [2 a 6 anos](#)

N: [10](#)

Linhagem: [azebuadas](#)

Peso: [400 a 600 kg](#)

Local do experimento: Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ/SP

São Paulo, 12 de agosto de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALVES, Antonio Alexandre Speri

Título: Placenta bovina de clones descelularizada como fonte de “scaffolds” biológicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIAS

A minha família, Mara Speri, Davi Speri, Mario Siga, Gildasio Mota, Maria Carolina, pela paciência, compreensão e incentivo.

Ao meu pai, Ranulfo Alexandre Alves (in memoriam), pela admiração e amor incomensuráveis que nos uniam.

A minha mãe Maria Tereza Speri, por me ensinar o amor à vida.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao Professor. Dr. Rodrigo Silva Nunes Barreto,  
por ter permitido a realização de um sonho.

Aos amigos, Fabio Yuti, Marcio Piccirillo, Marcelo Piccirillo, Adriano Silva,  
Anaelise Turquetti, Joao Leite, Daniel Rocha, Olívia Cunha.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor. Dr. Luciano de Moraes Pinto, pela amizade e carinho incondicionais, no início de minha carreira de docente.

Ao Professor MSc. Flávio Augusto, por todo o ensinamento a mim ofertado durante a residência.

Ao Professor MSc. Marco Aurélio, por todo o ensinamento dispensado nos plantões no pronto socorro do Hospital Paulistano.

Ao Professor MSc. Christian Ares, pelo auxílio na língua inglesa, paciência, persistência, carisma e amizade, o meu muito obrigado.

A Professora MSc. Dominique Fernandes, por todo o seu amor, carinho e ensinamentos no início da docência.

A Professora. Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Miglino, pela dedicação em ensinar a arte chamada ANATOMIA.

A Professora. Dr<sup>a</sup>. Rose Eli por todo o ensinamento científico, junto ao CADI FMVZUSP o meu muito obrigado pela sua paciência, carisma e conselhos.

A Professora. Dr<sup>a</sup>. Cristina, pela troca de experiências no mundo da docência.

A Professora. Dr<sup>a</sup>.Thais, por todo o ensinamento científico, com seu carisma, paciência e dedicação ao mundo da estereologia.

A Dr<sup>a</sup>. Eliane Camargo, pela amizade, carinho, reciprocidade e todos os ensinamentos na área de Radiologia.

A Dr<sup>a</sup>. Eliane Lacerda, pela amizade, carinho, ensinamentos diários, no período de transição profissional e pessoal.



Ao casal Dr. Maurício Rodrigues e Dr<sup>a</sup>. Bruna Valim, pelos ensinamentos, trabalho em equipe e amizade.

Ao Ronaldo Agostinho, pelo auxílio junto ao laboratório de Histologia.

Ao Doutorando Igor, pela ajuda incondicional no laboratório de Biologia Tecidual.

Aos amigos do pedal, grupo Older bike: Kaka, Celino, Gordinho, Moacir, Dalton, Jorge, Mauro, Nello, Salvador, pela parceria incondicional nos treinos e as boas risadas em equipe.

Aos amigos do Laboratório Zoolive: Anny, Bruna, Bertan, Roberta, Pedro, Sasca, Dona Lenira, pelo convívio em equipe, ensinamentos e amizade.

Aos amigos do Hospital Paulistano: Aroldo, Carlos, Marta, Marco, Roberto, Lurdes, Ivonete, pelo convívio em equipe, ensinamentos e amizade.

A enfermeira Lídia Kimura, que, com sua braveza, postura e ensinamentos, mostrou que eu poderia trocar a faxina na véspera de Ano Novo por uma vida melhor, por meio dos estudos.

O Rei se alegra em tua força senhor e na tua salvação grandemente se  
regozija **SALMO 21.**

## RESUMO

ALVES, A.A.S. **Placenta bovina de clones descelularizada como fonte de “scaffolds” biológicos** [Decelularized bovine placenta as a biological scaffolds source]. 2019. 53f. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A bioengenharia de tecidos visa o desenvolvimento de órgãos, ou partes deles, para que diretamente ou indiretamente atue na cura de doenças agudas e/ou crônicas. Sua finalidade não é apenas substituir, mas também recuperar a funcionalidade perdida, fornecendo elementos necessários para a reparação ou estimulando a capacidade de regeneração intrínseca do organismo, resultando numa possível redução de filas de transplantes. A utilização de órgãos ou fragmentos descelularizados “scaffolds” como fonte de biomateriais vem crescendo amplamente, entretanto a escassez de órgãos humanos para tal processo ainda é um grande desafio. Trabalhos recentes têm estudado a utilização de “scaffolds” originados de órgãos de diferentes espécies visando sua implantação, além da utilização de “scaffolds” xenólogos. Neste contexto, os “scaffolds” biológicos de origem animal, como a placenta de bovinos descelularizada, seriam promissores para esse uso, visto suas características vasculares, composição e fácil obtenção. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um “scaffold” biológico de origem placentária bovina de animais clonados, comparando tanto a origem placentária como a idade gestacional. As amostras das placentas bovinas de animais clonados foram obtidas por remoção cirúrgica no centro de reprodução assistida “*In Vitro Brasil*” e as placentas controle em frigoríficos e abatedouros conveniados. Tanto as amostras de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) como as amostras controles foram submetidas a análises histológica, microscopia eletrônica por varredura, quantificação estereológica e quantificação de DNA. Os resultados obtidos com o processo descelularização, confirmaram a eficácia do protocolo e a preservação da matriz extracelular e vasos sanguíneos. Tanto as placentas bovinas de animais clonados, como as placentas bovinas de animais não clonados descelularizada, demonstra-se uma fonte viável na elaboração de “scaffolds” biológicos independentemente da idade e fonte gestacional.

**Palavras-chave:** Placenta bovina de clones Matriz extracelular. “scaffold” biológico. Descelularização. Medicina regenerativa.

## ABSTRACT

ALVES, A.A.S. **Decellularized bovine clone placenta as a biological scaffolds source** [Placenta bovina descelularizada com fonte de “scaffolds” biológicos]. 2019. 53f. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The tissue bioengineering aimed to develop organs, or parts of them, that directly or indirectly act on the healing of acute and/or chronic diseases. Its purpose is not only to replace but also to recover lost functionality by providing the necessary elements for repairing or by stimulating the body's intrinsic regeneration capacity, resulting in a possible reduction of transplanting lists. The use of decellularized organs or fragments (*scaffolds*) as a source of biomaterials has been growing widely, but the scarcity of human organs for this process is still a great challenge. Recent works have studied the use of *scaffolds* originating from organs of different species aiming their implantation, besides the use of xenologous *scaffolds*. In this context, biological scaffolds from animal origin, such as the decellularized bovine placenta, could be promisor due to vascular characteristics, composition and availability. The present work aims to develop a biological *scaffold* from bovine placenta of cloned animals, comparing both placental origin and gestational age. The bovine placenta samples from cloned animals were obtained by surgical removal at the assisted reproduction center "In Vitro Brasil" and the control placenta samples were from slaughterhouses. Both the TNCS and the control samples were submitted to histological analysis, scanning electron microscopy, stereological quantification and DNA quantification. Partial results obtained with the decellularization process confirmed the protocol efficacy and the preservation of the extracellular matrix and blood vessels. Differences between ages and gestational sources are still in progressing analysis. Therefore, the decellularized bovine placenta demonstrates a viable source in the elaboration of biological *scaffolds* regardless of age and gestational source.

**Keywords:** Bovine placenta. Extracellular Matrix. Biological scaffolds. Decellularization. Regenerative medicine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Volume total do cotilédone bovino clone a termo, a partir do Princípio de Cavalieri .....	23
Figura 2 - Amostragem do cotilédone bovino TNCS descelula rizado a termo.	24
Figura 3 - Estimativa do volume total de fibras de colágeno. Princípio de Cavalieri .....	25
Figura 4 – Estimativa do volume total de proteoglicano. Princípio de Cavalier...	26
Figura 5 – Imagens macroscópicas de placentas bovinas nativas e descelula rizadas, onde são observados placentônios de clone a termo e placentônios não clone com 7 meses de gestação .....	35
Figura 6 – Fotomicrografias de cotilédones bovinos TNCS a termo .....	36
Figura 7 – Fotomicrografias de cotilédones bovino nativo e descelularizado, com 4 meses de gestação .....	37
Figura 8 – Fotomicrografias de cotilédones bovinos nativas e descelularizado, com 7 meses de gestação .....	38
Figura 9 – Fotomicrografias de cotilédones bovinos nativas e descelularizado, com 9 meses de gestação .....	39
Figura 10 – Imagens de microscopia eletrônica por varredura de cotilédones bovinos nativos e descelularizados com quatro, sete e nove meses de gestação..... T40	
Figura 11 –Imagens de microscopia eletrônica por varredura de cotilédones bovinos TNCS a termo nativo e descelularizado .....	41
Figura 12 – Imunohistoquímica para Lamina a em placentas bovinas nativas e descelularizadas .....	45
Figura 13 – Imunohistoquímica para Fibronectina em placentas bovinas nativas e descelularizadas .....	46
Figura 14 – Imunohistoquímica para Perlecan em placentas bovinas nativas e descelularizadas .....	47

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Quantificação de DNA genômico remanescente .....	42
Gráfico 2 – Quantificação estereológica de colágeno e proteoglicanos nas gestações TNCS e controle a termo, expressas em volume e porcentagem .....	43
Gráfico 3 – Quantificação estereológica de colágeno e proteoglicanos nas gestações controle aos 4, 7 e 9 meses, expressas em volume e em porcentagem .....	44

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 Bioengenharia de tecidos .....	17
2.2 Placentação em bovinos .....	18
2.3 Matriz Extracelular .....	20
<b>3. HIPÓTESE</b> .....	23
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	23
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	23
5.1 Objetivo geral .....	23
5.2 Objetivos específicos .....	23
<b>6. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
6.1 Coleta da amostras .....	24
6.2 Protocolo de descelularização por perfusão – BIORREATOR ...	24
6.3 Protocolo de descelularização por perfusão – MANUAL .....	25
6.4 Avaliação estereológica .....	25
6.5 Histologia .....	28
6.6 Microscopia eletrônica de varredura .....	28
6.7 Quantificação de DNA remanescente .....	29
6.8 Imunohistoquímica .....	29
<b>7. RESULTADOS</b> .....	30
<b>8. DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>9. CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças que mais acometem a população estão associadas às doenças crônicas, cujos tratamentos são longos e/ou permanentes, ou até mesmo sendo necessário o transplante do órgão afetado. Os transplantes consistem em métodos cirúrgicos de substituição de um órgão ou tecido de um indivíduo para outro, objetivando uma melhor qualidade de vida do receptor, já que tal procedimento é adotado como última alternativa terapêutica. Além da busca por um doador compatível, ainda se tem as complicações pós-cirúrgicas que podem inviabilizar os transplantes (TSUCHIYA *et al.*, 2014).

Por exemplo, pacientes com hepatopatias crônicas, na sua maioria, evoluem para fibrose hepática, que implica utilização do transplante, devido ao quadro de cirrose, levando à falência funcional do órgão e todas as manifestações clínicas dela decorrentes. O Brasil é o segundo países no mundo em número total de transplantes de diversos órgãos e tecidos. Entretanto a quantidade de transplantes ainda é abaixo da demanda, devido à pouca quantidade de órgãos disponíveis. Porém novas técnicas, como a bioengenharia tecidual voltada à medicina regenerativa pode auxiliar neste contexto (CARVALHO *et al.*, 2010).

A bioengenharia de tecidos tem seu foco principal na criação de tecidos ou órgãos completos ou parciais, tendo como finalidade não apenas substituir, mas também recuperar a funcionalidade perdida, fornecendo elementos necessários para a reparação ou estimulando a capacidade de regeneração intrínseca do próprio organismo (GRIFFITH & NAUGHTON., 2002; BOROJEVIC & BALDUINO, 2004; CARVALHO *et al.*, 2010; LANGER & VACANTI, 2016).

Recentemente, na bioengenharia de tecidos vem se utilizando órgãos descelularizados cadavéricos (alogênicos) ou xenogênicos como *scaffolds* para produção de novos órgãos (ou parte deles). Neste contexto, a placenta, sendo um material de aquisição fácil e sem danos ao doador, com complexo sistema vascular e matriz extracelular rica, torna-se uma fonte promissora de “scaffolds” visando à produção de enxertos parciais (CHEN & APLIN, 2003; BARRETO *et al.*, 2017).

Com isso, o presente trabalho tem como objetivo principal desenvolver “scaffolds” biológicos, utilizando placentas bovinas de animais clonados e não



clonados, e avaliar suas principais estruturas por meio de técnicas como: histologia, imunohistoquímica, microscopia eletrônica de varredura, quantificação estereológica e quantificação de gDNA remanescente.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 BIOENGENHARIA DE TECIDOS

A bioengenharia tecidual envolve áreas biológicas e exatas, visando um material que possa ser explorado em diferentes seguimentos, tanto na indústria farmacêutica, para testes de medicamentos “in vitro”; como na medicina regenerativa, em busca de novas opções para o transplante integral ou parcial de órgãos (LANGER & VACANTI, 2016). A definição mais ampla desta área incluiria entre seus objetivos o desenvolvimento e manipulação de implantes de origem biológica, sendo naturais ou sintetizados, capazes de substituir ou estimular funcionalmente o órgão danificado (GRIFFITH & NAUGHTON, 2002; BOROJEVIC & BALDUINO 2004; CARVALHO *et al.*, 2010; LOJUDICE; SOGAYAR, 2008; LANGER & VACANTI, 2016).

Pensando por esse aspecto, diversos meios terapêuticos estão sendo utilizados como uma ferramenta coadjuvante na busca pela cura de doenças agudas e/ou crônicas, sendo o transplante de tecidos biológicos de origem humana ou animal uma dessas possibilidades (TSUCHIYA *et al.*, 2014). Entretanto, várias implicações mantêm o número de transplantes num patamar subótimo, devido ao déficit de doações, incompatibilidade entre doador/receptor e complicações pós-cirúrgicas (LOJUDICE & SOGAYAR, 2008; TSUCHIYA *et al.*, 2014).

Considerando inúmeras possibilidades, a bioengenharia de tecidos vem crescendo na área de produção de “scaffolds” biológicos naturais, de origem humana ou animal, com o intuito de serem empregados na medicina regenerativa (TSUCHIYA *et al.*, 2014; KAKABADZE & KAKABADZE, 2015; BARRETO *et al.*, 2017). A produção de “scaffolds” biológicos está diretamente relacionada com a descélularização de órgãos por inteiro ou fragmentos, preservando a estrutura do tecido, funcionalidade, arranjo vascular e a matriz extracelular (UYGUN *et al.*, 2010; BARRETO *et al.*, 2017).

A placenta é um órgão acessível em determinadas espécies, sem função específica após o parto, possui rica matriz extracelular, fonte de proteínas, como os colágenos I, III, IV, laminina e fibronectina. E dependendo da espécie, mantém arcabouço estrutural e complexo sistema vascular. Mesmo descélularizada,

preserva as características da MEC (LEONEL *et al.*, 2016; BARRETO *et al.*, 2017; KAKABADZE *et al.*, 2019).

A utilização da placenta humana descelularizada na bioengenharia de tecidos já foi descrita na regeneração do tecido adiposo em mulheres mastectomizadas (FLYNN, SEMPLE & WOODHOUSE, 2006), na reparação de feridas profundas e enxertos vasculares (HONG *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2013). Entretanto, a placenta bovina fornece uma alternativa interessante à placenta humana, para desenvolver “scaffolds” biológicos em grande escala.

O placentônio bovino, comparado com a placenta humana, tem tamanho razoável para enxertos, complexo sistema vascular com vasos grandes bem distribuídos e matriz extracelular preservada (BARRETO *et al.*, 2017; KAKABADZE *et al.*, 2019). Ainda produz com mais eficiência anastomoses após implantação, quando comparado à placenta humana (KAKABADZE; KAKABADZE, 2015).

O placentônio bovino descelularizado foi empregado na bioengenharia de tecidos, como um “scaffold” biológico recelularizado com células hepáticas e translocado no fígado de ratos, com intuito de avaliar o arranjo vascular, manutenção de nutrientes, atuação metabólica e hemostase. Apresentou resultados expressivos que determinaram seu potencial uso na medicina regenerativa (KAKABADZE *et al.*, 2019). Entretanto a sua estrutura e composição pós descelularização ainda não foi descrita

## **2.2 PLACENTAÇÃO EM BOVINOS**

A placenta é um órgão de estruturas complexas, que contribui para o desenvolvimento e nutrição da prole, compondo a interação materno fetal (MIGLINO, 2004).

Os bovinos, assim como os outros ruminantes, possuem uma placenta corioalantoidiana (predominância das membranas coriônica e alantoidiana), zonária cotiledonária (região de interação materno-fetal formada por unidades funcionais chamadas placentônios), vilosa (interdigitação materno-fetal em forma de vilos), sineptliocorial (todas as seis camadas de tecidos preservadas na interface materno-fetal, além da ocorrência de sincício) e com vascularização contra-corrente (corrente sanguínea materna e fetal em direções opostas) (MOSSMAN, 1987; LEISER & KAUFMANN, 1994).

Nos bovinos, de 100 a 140 cotilédones (policotiledonária) se desenvolvem e aderem às carúnculas uterinas, formando os placentônios, onde as vilosidades fetais se interdigitam com as criptas maternas. Assim, o tamanho do placentônio aumenta, no decorrer da gestação, devido ao desenvolvimento de ambos os componentes (ASSIS NETO *et al.*, 2009; FURUKAWA; KURODA & SUGIYAMA, 2014). Ainda, o trofoblasto, migra e funde com o epitélio endometrial, formando uma espécie de sincício, o que caracteriza essa placenta como sinepteliocorial (LEISER & KAUFMANN, 2009; BARRETO *et al.*, 2017). E esta, como citado anteriormente, é caracterizada pela presença de todas as seis camadas de tecidos entre o sangue materno e o fetal, sendo elas: endotélio materno, estroma endometrial, epitélio materno, trofoblasto, mesênquima fetal e endotélio fetal (LEISER & KAUFMANN, 1994).

Por outro lado, a estrutura e função, da placenta bovina são profundamente influenciadas pela origem do embrião, ou seja, se foi produzido a partir de monta natural, inseminação artificial, fertilização *in vitro* ou transferência nuclear de células somáticas (TNCS). Dentre as biotecnologias da reprodução, a TNCS tem o maior comprometimento da placentação (MIGLINO *et al.*, 2007), que provavelmente contribui para as suas baixas taxas de nascimentos (em torno de 5%) (MIGLINO *et al.*, 2007; MEIRELLES *et al.*, 2010).

Grande parte das perdas gestacionais de conceptos bovinos TNCS-clones ocorrem entre 30 e 60 dias de gestação (WELLS, 2005). Frequentemente, essas perdas estão associadas a deficiências placentárias (HILL *et al.*, 2000; HILL *et al.*, 2003). Exatamente nesse período (de 40-60 dias de gestação), ocorre a transição da nutrição fetal de vitelínica para a corioalantoidiana, sendo crucial para a sobrevivência do feto em desenvolvimento (ASSIS NETO *et al.*, 2009).

Ainda, em receptoras gestando embriões TNCS, tanto no início (HILL *et al.*, 2000) como no final da gestação (HEYMAN *et al.*, 2002), a placenta apresenta uma diminuição da vascularização, áreas hemorrágicas, hipoplasia placentária (MIGLINO *et al.*, 2007), alterações no número, tamanho e formato dos placentônios (MIGLINO *et al.*, 2007; BARRETO *et al.*, 2009), presença de hidroalantóide, e de malformações do cordão umbilical que são via de regra associados ao bezerro macrossômico (“Large offspring syndrome”) (YOUNG, SINCLAIR & WILMUT, 1998; SOUSA *et al.*, 2001).

Segundo MIGLINO *et al.* (2007), desse grupo de sobreviventes, parte nasce com inúmeros problemas de saúde, tais como: alopecia, anemia ferro priva, distúrbios cardiorrespiratórios, envelhecimento precoce, hidrocefalia, hipóxia/sofrimento fetal, hepatomegalia, rinomegalia e macrossomia, além de alterações posturais e musculoesqueléticas.

### **2.3 MATRIZ EXTRACELULAR**

A matriz extracelular (MEC) é conhecida por sua capacidade de fornecer resistência e suporte estrutural para órgãos e tecidos. Recentemente, desenvolveu-se a ideia de que as características mecânicas da matriz, como rigidez e deformidade, também auxiliam no comportamento das células (HYNES, 2009; KULAR, BASU & SHARMA, 2014).

Os múltiplos componentes da MEC são secretados, principalmente, por células do tecido conjuntivo e dividem-se em grandes grupos: 1) proteínas estruturais, constituídas por moléculas protéicas alongadas, que se agregam formando estruturas fibrilares ou fibrosas, como os colágenos e a elastina; 2) glicoproteínas adesivas, como a fibronectina e laminina, cuja função principal é realizar a adesão entre a matriz extracelular e as células; e 3) proteínas amorfas, responsáveis pelo preenchimento da matriz extracelular, absorvendo água, tornando-se gelatinosas e hidrofílicas, atuando na reserva de hormônios e fatores de crescimento (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005; KULAR, BASU & SHARMA, 2014).

A MEC proporciona um ambiente para as células da placenta e está relacionada à regulação das principais funções celulares, tais como a sinalização, proliferação, migração e invasão, e tem por função a estruturação dos tecidos e órgãos (FRANCZYR *et al.*, 2016). Na placenta, a MEC realiza uma multiplicidade funcional, como a mediação da ligação do trofoblasto, induzindo a diferenciação celular; reservatório de fatores de crescimento ou servindo como trilhas junto à migração celular (HAEGER, HAMBRUCH & PFARRER 2016). Os processos de implantação e placentação envolvem a remodelação da MEC endometrial e coriônica, envolvendo interações entre componentes da MEC e proteoglicanos extracelulares (GUILLMOT *et al.*, 2014).

A placenta humana é uma fonte de componentes de matriz extracelular que inclui colágeno tipo I, II, III, IV, V, VI, fibronectina e laminina (AMENTA,

1986), dos quais alguns têm fatores primordiais no desenvolvimento embrionário e na manutenção da prenhez (FRANCZYK *et al.*, 2016).

O colágeno é uma família de proteínas helicoidais triplas que conferem resistência à tração à MEC (KADLER & BALDOCK, 2007), podendo se ancorar entre si ou se ligar aos receptores de integrina (PFARRER, 2006). O colágeno do tipo I apresenta múltiplas e fortes ligações entre as fibras e é responsável pelo arcabouço estrutural e elástico de vários tecidos, encontrado nas carúnculas, cotilédones, especialmente na superfície alantocoriônica (PFARRER, 2006; FRANCZYK *et al.*, 2016; BARRETO *et al.*, 2017). O colágeno tipo III é encontrado em tecidos que alteram seu volume e forma com frequência, entre eles, vasos e musculatura lisa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005;). O colágeno tipo IV é encontrado na membrana basal e nas paredes dos vasos dos cotilédones e carúnculas; forma uma estrutura de aspecto rendilhado, unindo as estruturas por extremidades, conferindo um fator de estabilidade (PFARRER, 2006; FRANCZYK *et al.*, 2016; BARRETO *et al.*, 2017).

A fibronectina é responsável pela adesão das células não epiteliais à MEC e à laminina, que, por sua vez, é responsável pela adesão das células epiteliais na lâmina basal, presente nas paredes dos vasos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005; KULAR, BASU & SHARMA, 2014; BARRETO *et al.*, 2017).

Os componentes estruturais, colágenos, elastina, fibronectina e laminina atuam com a interação das proteínas proteoglicanos e glicosaminoglicanos durante a gestação, tanto em seres humanos como em bovinos, garantindo a implantação adequada e o desenvolvimento placentário (AMENTA, 1986; FRANCZYK *et al.*, 2016). As glicosaminoglicanas e as proteoglicanas formam um gel hidrófilo, que permite a circulação de nutrientes, hormônios e outros componentes bioquímicos nos tecidos conjuntivos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005; KULAR, BASU & SHARMA, 2014).

Ainda, mesmo não pertencentes à MEC, mas associadas a ela, as integrinas são glicoproteínas transmembranárias heterodiméricas, que servem como receptores de adesão na superfície celular, interagindo com uma variedade de ligações, incluindo glicoproteínas da matriz extracelular e moléculas na superfície das células vizinhas (PFARRER, 2006). No estroma endometrial e no mesênquima está presente um conjunto de integrinas, que

podem estar envolvidas na regulação da proliferação e diferenciação trofoblástica (PFARRER, 2006).

Alguns autores observam que alterações na expressão da laminina, decorina, colágenos e fibronectina coincidem com alterações na distribuição do trofoblasto, crescimento anormal do placentônio e aumento no período gestacional de bovinos clonados (GUILLMOT et al., 2014; LEONEL, 2016).

### **3.0 HIPÓTESE**

Placentônios bovinos, derivados de diversas idades e fontes gestacionais, podem ser usados para produção de "scaffold" biológico.

### **4. JUSTIFICATIVA**

Tratando-se de questões éticas e da falta de órgãos para transplante, este trabalho pretende desenvolver "scaffolds" biológicos derivados de placenta bovina, visto que esse material é rico em matriz extracelular e possui um complexo sistema vascular, além de ser facilmente obtido sem danos ao doador. Ainda, trabalhos vêm mostrando o uso de "scaffolds" xenólogos para produção de biomateriais para enxertos parciais de órgãos.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver "scaffolds" biológicos, utilizando placentas bovinas descelularizadas de animais clonados e não clonados.

#### **5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Verificar a presença ou não de células nos placentônios descelularizados.
- Descrever a morfologia dos "scaffolds" biológicos derivados de placentônios bovinos.
- Verificar a presença e quantificar as principais macromoléculas da MEC encontradas nos "scaffolds" biológicos, derivadas de placentônio bovino.



## **6. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.1 COLETAS DAS AMOSTRAS**

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) (nº 2043140817). As amostras de placentônios bovinos clonados (TNCS) foram obtidas por remoção cirúrgica no centro de reprodução assistida “In Vitro Brasil”. No total, foram coletados 15 placentônios de animais de diferentes raças, provenientes de cinco gestações a termo. As amostras controle foram obtidas em abatedouros frigoríficos conveniados com a instituição. A idade gestacional dos fetos foi estimada por mensuração de Crown-rump (CR) (EVANS & SACK, 1973). Um total de 18 placentas controle foram coletadas, com idades aproximadas de 4, 7 e 9 meses de gestação. Tanto as amostras TNCS como as amostras controle foram acondicionadas em gelo e transportadas para o Laboratório de Biologia Tecidual no Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP.

### **6.2 PROTOCOLO DE DESCELULARIZAÇÃO POR PERFUSÃO (BIORREATOR)**

Para as placentas controle, após incisão na linha anti-mesometrial do perimétrio e miométrio, no terço médio do corno uterino gestante se expôs as membranas fetais, endométrio e feto. O saco alantocoriônico foi individualizado e as artérias umbilicais canuladas com cateteres nº 14 e acopladas ao biorreator ORCA (Harvard Apparatus, EUA). Inicialmente, foi realizada perfusão com solução tampão fosfato (PBS: 136,9 mM de NaCl, 26,8 mM de KCl, 14,7 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 8,1 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; PH 7,2) com volume constante de 0,5 ml/min até completa limpeza do sistema vascular, o que levou aproximadamente 24 horas. Em seguida, foi perfundida a solução de 0,01% de dodecil sulfato de sódio (SDS) em água destilada também sob 0,5 ml/min por 24 horas. Subsequentemente, a solução foi alterada para 0,1% de SDS durante dois dias; a 0,25% por dois dias; a 0,5% por 3 dias, e a 1,0% por um dia, respectivamente. O saco alantocoriônico descelularizado foi então perfundido com 1% de Triton X-100 (# 0694-1L, Amresco-Solon, EUA) durante três horas. Por fim, foram lavados com PBS durante 24 horas, perfazendo um total de 10 dias aproximadamente.

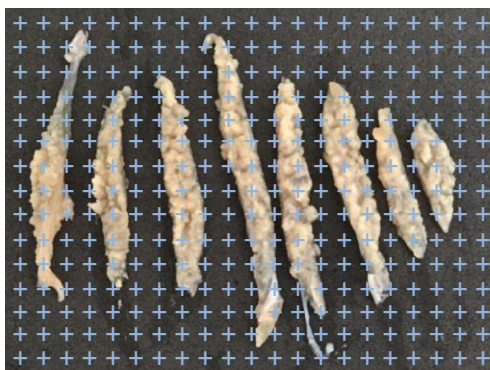
### 6.3 PROTOCOLO DE DESCELULARIZAÇÃO POR PERFUSÃO (MANUAL)

Para as amostras provenientes de gestações TNCS, uma vez que foram coletados placentônios da região média do corno gestante (ao invés do saco gestacional por completo), estes foram canulados por um cateter urinário nº8 via vasos alantocoriônicos, via similar às amostras controle. Semelhantemente, os cotilédones foram perfundidos com PBS para limpeza do sistema vascular, seguido de perfusão com soluções de SDS a 0,01%, 0,1%, 0,25%, 0,5% e 1% por cerca de 24 horas em cada concentração. Finalmente, sob agitação, os cotilédones foram lavados com PBS (3 vezes de 15 minutos), com 1% de Triton X-100 durante duas horas e novamente com PBS (3 vezes de 15 minutos), perfazendo um total de 5 dias.

### 6.4 AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA

**Estimativa do volume total do cotilédone da placenta:** O volume total do cotilédone da placenta (Figura 1) foi estimado dividindo-se o peso seco, em gramas, pela densidade do cotilédone (0,864 g/cm<sup>3</sup>). Para o cálculo da densidade foi utilizado o Princípio de Arquimedes, em que um fragmento de cotilédone foi pesado em balança digital de precisão e posteriormente imerso em coluna de água. A diferença do deslocamento da coluna de água indicou o volume. A densidade, então, foi calculada dividindo-se a massa do fragmento pelo seu volume.

**Figura 1** - Volume total do cotilédone bovino clone a termo, a partir do princípio de Cavalieri.

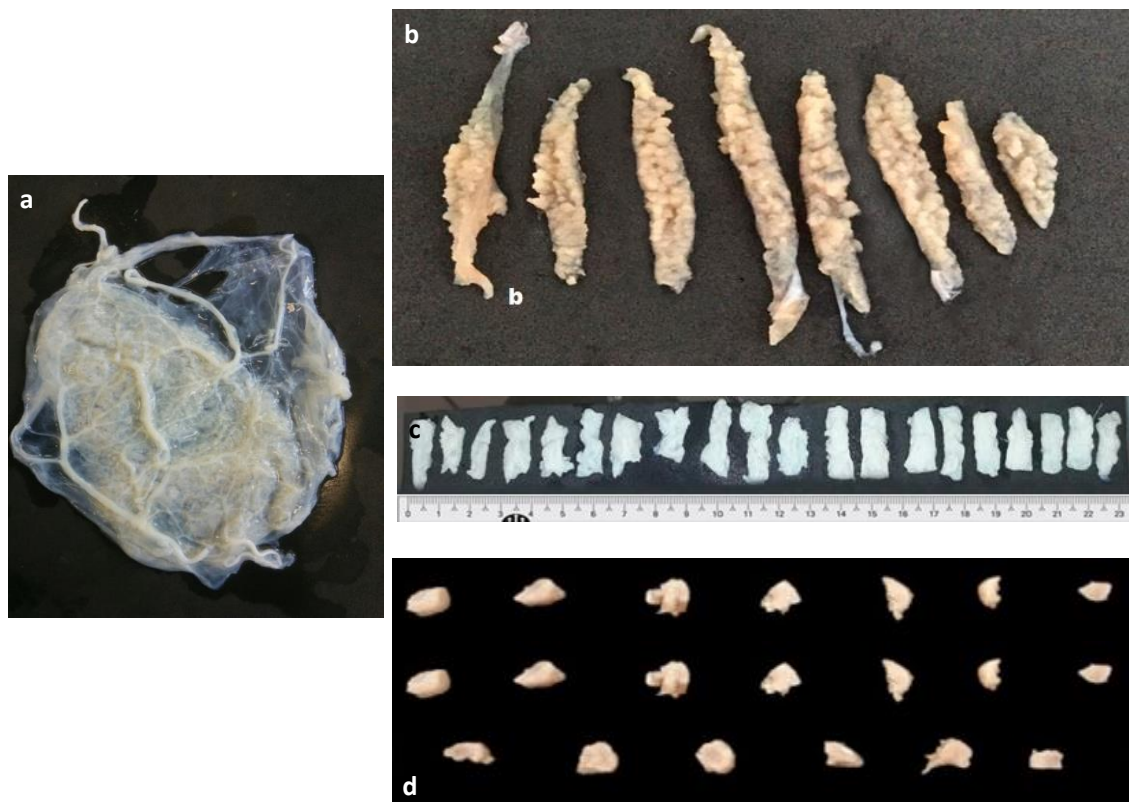


**Fonte:** ALVES, A.A.S., (2019, f. 25).

**Legenda:** Amostras do cotilédone bovino clone a termo. Sistema de pontos utilizado para a estimativa do volume do cotilédone, a partir do princípio de Cavalieri.

**Amostragem:** Os cotilédones, controles e descelularizados (Figura 2 A, D) foram seccionados em fatias de aproximadamente 1cm. As fatias foram amostradas seguindo o padrão de amostragem, sistemática, uniforme e aleatória (SURS) (GUNDERSEN *et al.*, 1999). As fatias amostradas foram, então, seccionadas em fragmentos de diferentes tamanhos. Esses fragmentos foram organizados em ordem crescente de tamanho seguindo o princípio do “Smooth Fractionator” (GUNDERSEN, 2002), e amostrados de acordo com o SURS. Os fragmentos selecionados foram alocados em três conjuntos. O primeiro conjunto destinado aos procedimentos de histologia, o segundo conjunto à microscopia eletrônica de varredura e o terceiro conjunto à imunohistoquímica. Os procedimentos de quantificação da matriz extracelular foram realizados a partir dos fragmentos do primeiro conjunto.

**Figura 2** - Amostragem do cotilédone bovino TNCS descelularizado a termo

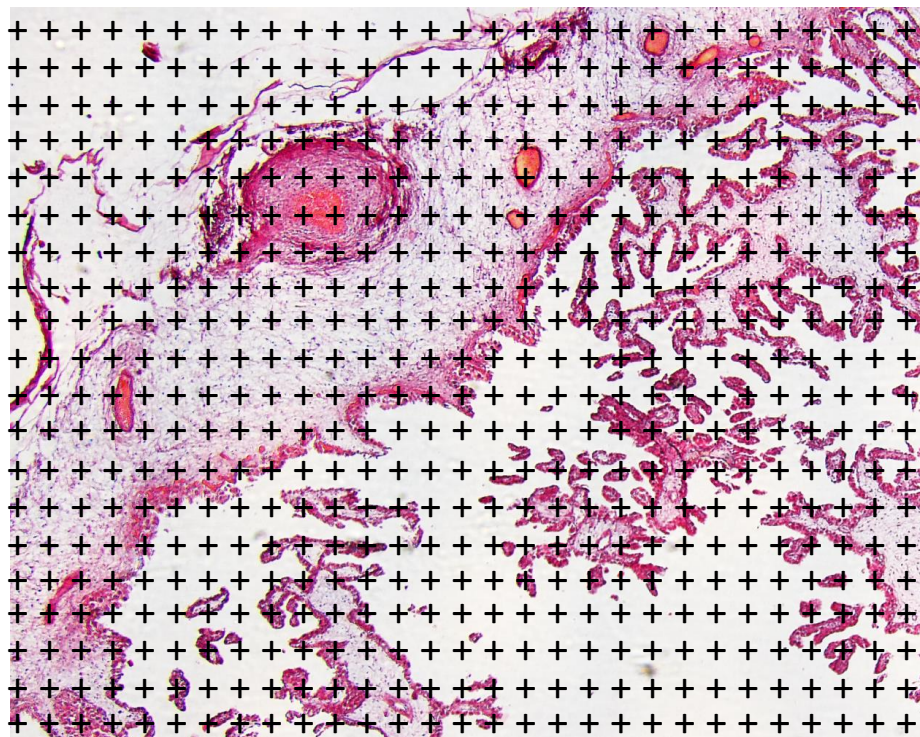


**Fonte:** ALVES, A.A.S., (2019, f. 26).

**Legenda:** Em (A): Amostragem do cotilédone bovino a termo. Em (B): Fatias do cotilédone a termo. Em (C): Fragmentos de diferentes tamanhos do cotilédone, organizado em ordem decrescente. Em (D): Fragmentos do cotilédone a termo, separado em três conjuntos após o sorteio na tabela de números randômicos.

**Estimativa da fração de volume da matriz extracelular, ocupada por colágeno (Vcol):** Para a estimativa do volume total de colágeno da matriz extracelular, foi calculada primeiramente a fração de volume de colágeno (col) a partir da fórmula:  $V_v(\text{col}) = \Sigma P_{\text{col}} / \Sigma P_{\text{cot}}$ . Onde:  $\Sigma P_{\text{col}}$  = somatório de pontos que tocaram a área de colágeno;  $\Sigma P_{\text{cot}}$  = somatório de pontos que tocaram todo o cotilédone (Figura 3). Em seguida, multiplicou-se a fração de volume do colágeno pelo volume total do cotilédone:  $V(\text{col}) = V_v(\text{col}) \times V_{\text{ref cot}}$ .

**Figura 3** - Estimativa do volume total de fibras de colágeno. Princípio de Cavalieri



**Fonte:** ALVES, A.A.S., (2019, f. 27).

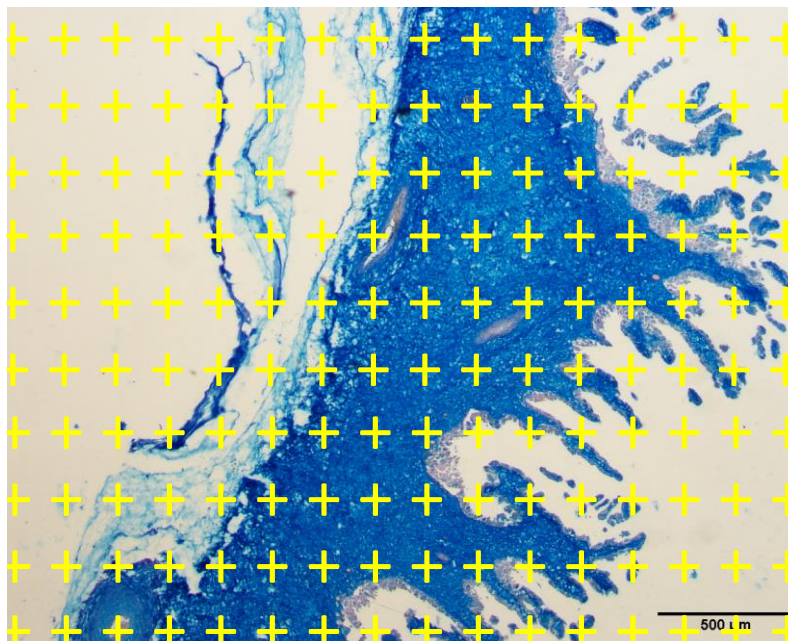
**Legenda:** Fibras de colágenos de cotilédones bovinos com 7 meses de gestação. Sistema de pontos utilizado para a estimativa do volume de fibras de colágenos.

**Estimativa da fração de volume da matriz extracelular ocupada por proteoglicano (Vprot):** Para a estimativa do volume total de proteoglicano da matriz extracelular, foi calculada primeiramente a fração de volume de proteoglicano (prot) a partir da fórmula:  $V_v(\text{prot}) = \Sigma P_{\text{prot}} / \Sigma P_{\text{cot}}$ . Onde:  $\Sigma P_{\text{prot}}$  = somatório de pontos que tocaram a área de proteoglicanos;  $\Sigma P_{\text{cot}}$  = somatório de pontos que tocaram todo o cotilédone (Figura 4). Em seguida, multiplicou-se



a fração de volume de proteoglicano pelo volume total do cotilédone:  $V(\text{prot}) = V_v(\text{prot}) \times V_{\text{ref cot.}}$

**Figura 4** - Estimativa do volume total de proteoglicano. Princípio de Cavalieri



**Fonte:** ALVES, A.A.S., (2019, f. 28).

**Legenda:** Fibras de proteoglicano de cotilédones bovinos com 7 meses de gestação. Sistema de pontos utilizado para a estimativa do volume de fibras de proteoglicanos.

## 6.5 HISTOLOGIA

As amostras de cotilédones controle e TNCS, tanto nativas como descelularizadas, foram submetidas a processamento histológico. Inicialmente, foram rotineiramente desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Os blocos foram então seccionados em micrótomos manuais (Leica RM2125 RT) em cortes com 5  $\mu\text{m}$  de espessura e transferidos para lâminas histológicas. Seguindo os preceitos de amostragem estereológica (item 6.3), as lâminas foram divididas e coradas em Hematoxilina e Eosina (H&E), Picrosirius red e Ferro coloidal, para avaliar a presença de núcleos e componentes da matriz extracelular, como colágenos e proteoglicanos, respectivamente.

## 6.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As amostras de cotilédones controle e TNCS, tanto nativas como descelularizadas, foram fixadas em solução de Karnovsky, durante 48 horas. Após esse período, foram lavadas com PBS sob pressão manual durante 15

minutos. As amostras foram desidratadas em uma série crescente de álcool (70 a 100%) sob agitação vigorosa, depois passaram pelo processo de secagem automatizado no aparelho de ponto crítico (MSCPD 300, Leica), e metalizadas com ouro (#K550, Emitech- Ashford, Reino Unido). As amostras foram analisadas e fotografadas em um microscópio eletrônico Leo 435VP.

### **6.7 QUANTIFICAÇÃO DE DNA REMANESCENTE**

O DNA genômico foi extraído de três amostras de cada grupo controle e três amostras de cada grupo de cotilédones descelularizados através da precipitação salina, adaptada de Olerup e Zetterquist (1992). Foi realizada a maceração e digestão das amostras [80 µL de tampão de proteinase K (0,375 M de NaCl e 0,12 M de EDTA), 10 µL de 20% de SDS, 8 µL de proteinase K (25 mg / mL) e 280 µL de água ultrapura] por 3 horas a 56°C. Em seguida, elas foram resfriadas, adicionado 120 µL de NaCl 5 M e centrifugadas à temperatura ambiente durante 10 minutos, a 13000 rpm. Os sobrenadantes foram recuperados e a eles foi adicionado 1 mL de etanol 100% e incubados a -80°C, por 15 minutos. A seguir, foram centrifugados a 4°C, por 10 minutos, a 14000 rpm, e mantidos a -80°C por mais 20 minutos. Os sobrenadantes foram removidos, sendo adicionado 1 mL de etanol 70% nos pellets de DNA, seguido de nova centrifugação. Os sobrenadantes foram removidos novamente e as amostras foram secas ao ar e eluídas em 30 µL de água ultrapura. Em seguida, o DNA genômico foi quantificado usando o reagente dsDNA Quant-iT PicoGreen®™ (# P7581, Invitrogen-Eugene, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

### **6.8. IMUNOHISTOQUÍMICA**

As amostras dos cotilédones foram inseridas em parafina, sendo seccionadas em microtomo (# RM2265, Leica) e transferidas para lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina (# p8920, Sigma - Saint Louis, EUA). Em seguida, as lâminas foram reidratadas e o passo de recuperação antigênica foi realizada através do banho-maria a 95°C em Tris EDTA Buffer para fibronectina, laminina e perlecan. Posteriormente a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido

de hidrogênio 3% em água destilada durante 30 minutos no escuro. A interação da proteína não específica foi bloqueada com albumina de soro bovino 2% (BSA) em solução tampão de fosfato (PBS, NaCl 136,9 mM, KCl 4, 8 mM, 14,8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e NaOH 8,7 mM, pH 7,2) por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpos primários: subunidade anti-laminina alfa-2 (# bs-0821r, 1: 100, Bioss Antibodies - Woburn, EUA), anti-fibronectina (# LS-C353995 NBP1-91258, 1: 150, LifeSpan BioSciences – Seattle, EUA) e anti-perlecan (LS-C294461, 1:100, LifeSpan BioSciences – Seattle, EUA) durante a noite em câmara úmida a 4 graus Celsius. Para a realização dos controles negativos, foi utilizado anti-mouse IgG irrelevante (# M5284, Sigma) ou anti-rabbit IgG (# ab27478, Abcam-Cambridge, Reino Unido) nas mesmas condições para substituir o anticorpo primário. A reação foi detectada por um kit Dako EnVision FLEX, high pH (Link) que incluiu um anticorpo secundário (# SM802, Dako - EUA) e a cor desenvolvida com DAB (# SM803, Dako). Por fim as lâminas foram rapidamente contra-coradas com hematoxilina. Entre cada passo após a incubação do anticorpo, as lâminas foram enxaguadas em PBS contendo 0,2% de BSA. Finalmente, as lâminas foram montados e visualizados em microscópio Nikon Eclipse 80I (43)

## 7. RESULTADOS

Os primeiros indícios de sucesso no processo de descelularização se deram durante o próprio processo. Era possível observar a mudança de coloração de avermelhado para branco translúcido. Apesar da estrutura macroscópica ser mantida, conforme o avanço da descelularização, as amostras foram se tornando mais gelatinosas, porém, ainda era possível observar, macroscopicamente, a integridade dos grandes vasos (Figura 5).

Sob microscopia de luz, foi possível confirmar o aspecto descelularizado observado macroscopicamente, tanto nas gestações TNCS a termo (Figura 6), como nas gestações controle com 4 meses (Figura 7), com 7 meses (Figura 8), e com 9 meses (Figura 9). Sob a coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E), foi possível observar a ausência de núcleos celulares tanto na superfície alantocoriônica, na parede dos grandes e pequenos vasos, no mesênquima e no trofoblasto, independentemente da idade ou origem gestacional (Figuras 6 a 9).

Pela coloração de Picrosirius, foi observada a presença de fibras de colágenos de cor vermelha, tanto nas amostras TNCS nativas, como nas descelularizadas (Figura 6 C e D), também vistas nas placentas controle nativas e descelularizadas de 4 meses (Figuras 7 C e D), 7 meses (Figuras 8 C e D), 9 meses (Figuras 9 C e D), junto ao mesênquima, vasos, superfície alantocoriônica e vilos.

A coloração de Ferro coloidal foi utilizada para evidenciar as fibras colágenas pela cor avermelhada, e as glicoproteínas e glicosaminoglicanos pela cor azulada, assim como o citoplasma pelo tom amarelado. Nos cotilédones TNCS nativo e descelularizado a termo (figuras 6 E, F), foram evidenciadas fibras de colágeno junto à parede dos vasos, e glicoproteínas de forma difusa no mesênquima e mais levemente na parede dos vasos. Nas placentas de gestações controle com 4 meses (Figuras 7 E, F), 7 meses (Figuras 8 E, F) e 9 meses (Figuras 9 E, F), foi observada a presença de fibras de colágenos em cor vermelha e glicoproteínas em cor azul claro, nas regiões da superfície alantocoriônica, nos vasos, no mesênquima e nos vilos, confirmando a preservação da matriz extracelular.



Sob microscopia eletrônica de varredura nos cotilédones controle nativos com 4, 7 e 9 meses de gestação (Figura 10), foi possível observar as células trofoblásticas na superfície da árvore vilosa, enquanto que nos cotilédones controle descclularizados, com as mesmas idades, foi possível identificar apenas fibras da matriz extracelular com ausência completa de células (Figura 10 A). O mesmo pode ser observado para as amostras TNCS a termo nativa e descclularizada, com o adendo de que as amostras descclularizadas apresentavam grande quantidade de fibras com maior espessura em comparação com as outras amostras (Figura 11).

Por meio da quantificação de DNA genômico remanescente, foi possível observar ausência de núcleo celular nas amostras descclularizadas quando comparadas com as amostras nativas (Gráfico 1).

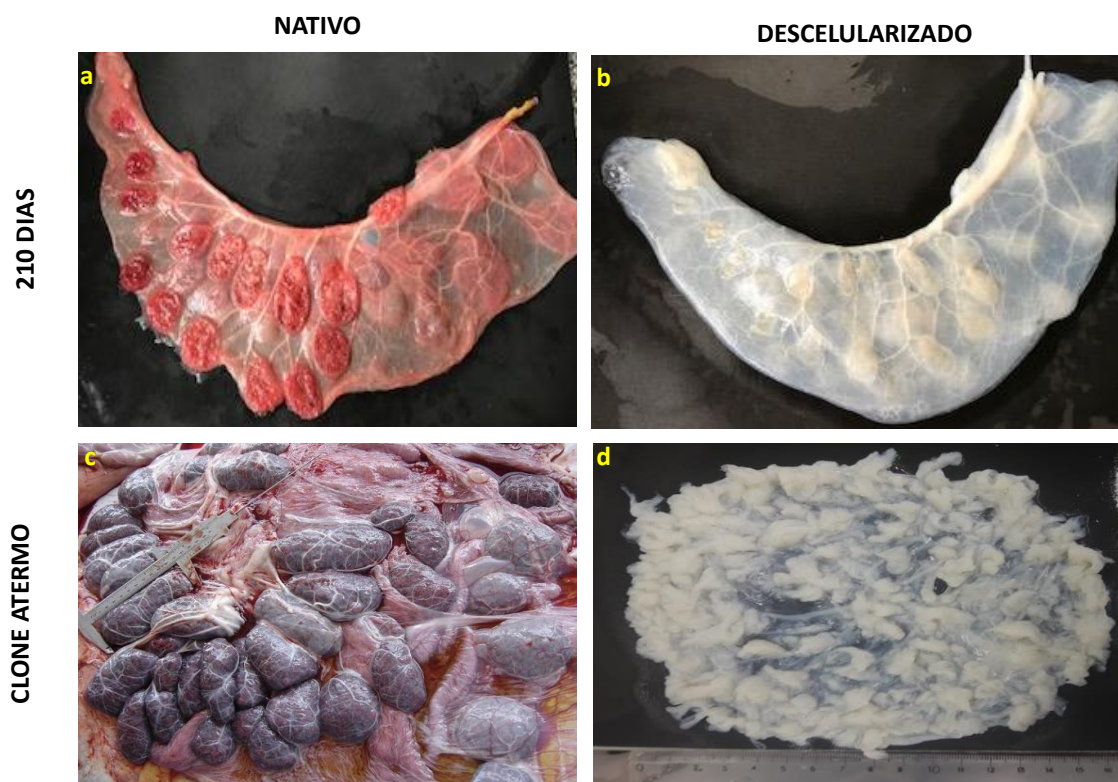
Por meio da quantificação estereológica, foi possível determinar em centímetros cúbicos o porcentual de proteínas presentes na matriz extracelular do placentônio bovino clonado e não clonado; determinar, por meio de gráficos, a presença de cada proteína junto ao placentônio; observar que, de fato, existe o aumento gradativo das proteínas presentes na matriz extracelular (Gráfico 2). Além disso, foi possível determinar que a matriz extracelular do placentônio do clone nativo é rica em proteoglicano, com uma concentração superior à do colágeno. Já o clone descclularizado, comparado com o clone nativo, apresentou níveis elevados de colágeno em relação ao proteoglicano, o que corrobora as com os dados anteriores de que a descclularização remove de forma expressiva o proteoglicano da matriz extracelular (Gráfico 2). Em comparação com outras idades gestacionais (4, 7 e 9 meses), os cálculos estereológicos apresentaram os mesmos resultados, mantendo os níveis de colágeno e proteoglicano bem próximos entre os placentônios bovinos nativos e descclularizados, independente da idade gestacional (Gráfico 3).

Em geral, a imunomarcção da laminina foi observada na porção fetal, com cor marrom claro, predominando em regiões como mesênquima, e ao redor dos vasos, tanto nas placentas nativas como nas placentas descclularizadas, mudando apenas o grau de intensidade; nas placentas descclularizadas, a marção teve um tom levemente marcado em relação à placenta nativa, independentemente da idade gestacional e da origem (Figura 12).

A imunomarcção da fibronectina foi observada, junto à região do mesênquima, vasos, vilos e porção alantocoriônica de distribuição difusa, com marcações em cor marrom, sendo visualizada com maior intensidade de cor junto às placentas nativas de 4, 7 e 9 meses em relação às placentas descelularizadas, independentemente da origem gestacional (Figura 13).

A imunomarcção com o perlecan foi observada de forma não muito expressiva, junto à região da superfície alantocoriônica, mesênquima, e sim em regiões junto as paredes dos vasos e região vilosa, predominando uma intensidade leve à moderada com a cor marrom, tanto nas placentas descelularizadas de clones e não clones, como também nas placentas nativas, independentemente da idade e origem gestacional (Figura 14).

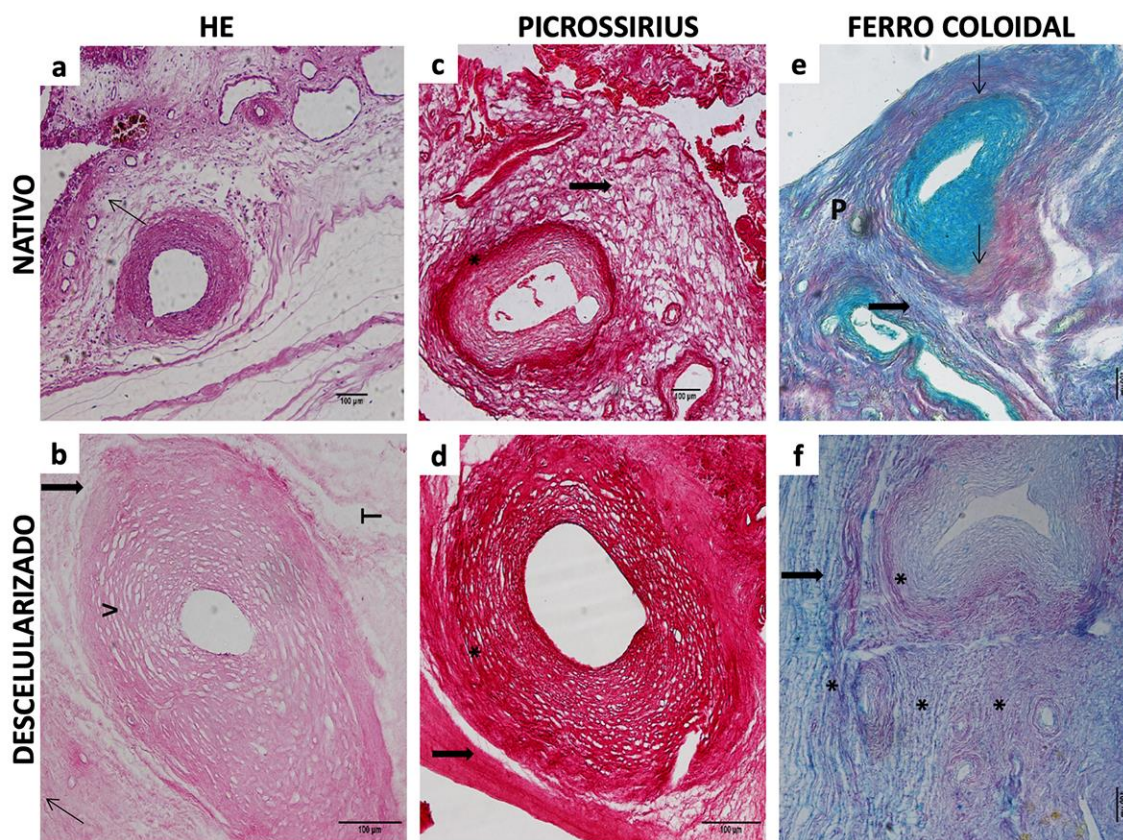
**Figura 5** - Imagens macroscópicas de placentas bovinas nativas e descelularizadas, onde são observados placentônios de clone atermo e placentônios não clone com 7 meses de gestação



**Fonte:** ALVES, A.A.S., (2019, f. 34).

**Legenda:** Em **A**, placenta bovina nativa, com a presença de vasos e cório. Em **B**, placenta descelularizada, observar os cotilédones descelularizado, vasos descelularizado e o cório. Em **C**, placenta nativa de clone atermo. Em **D**, observar o cotilédone em processo final de descelularização, observar material translúcido.

**Figura 6 – Fotomicrografias de cotilédones bovinos TNCS a termo**

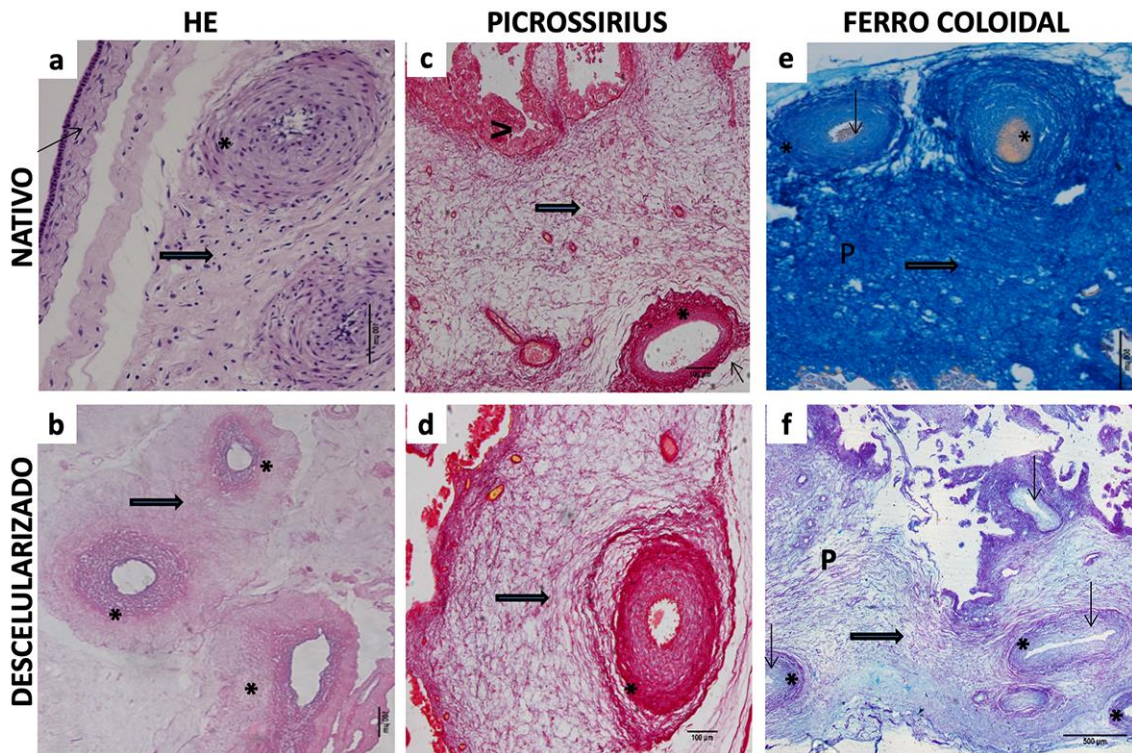


**Fonte:** ALVES, A.A.S., (2019, f. 35).

**Legenda:** **A** nativo, H&E. Observar a presença de células trofoblásticas na região do mesênquima (seta) e junto ao vaso (\*). Em **B** descelularizado, H&E. Ausência completa de núcleos celulares tanto na face alantocoriônica (seta), no mesênquima (seta grossa), parede dos vasos (V) e no trofoblasto (T). Em **C**, cotilédone nativo a termo. Picrossirius. Observar fibras de colágeno de cor vermelho, predominando a região do mesênquima (seta cheia) e vasos (\*). Em **D**, cotilédone descelularizado a termo. Observar fibras de colágeno junto ao mesênquima (seta cheia) e vasos (\*). Em **E**, cotilédone nativo a termo. Observar pela coloração de Ferro Coloidal, glicosaminoglicano, com marcação em azul (P), junto aos vasos (seta) e mesênquima (seta cheia), presença de fibras de colágeno, cor vermelho, junto a periferia do vaso e mesênquima (seta cheia). Em **F**, cotilédone descelularizado a termo. Observar presença de glicoproteínas em cor azul claro, junto ao mesênquima (seta cheia) e vasos (\*).



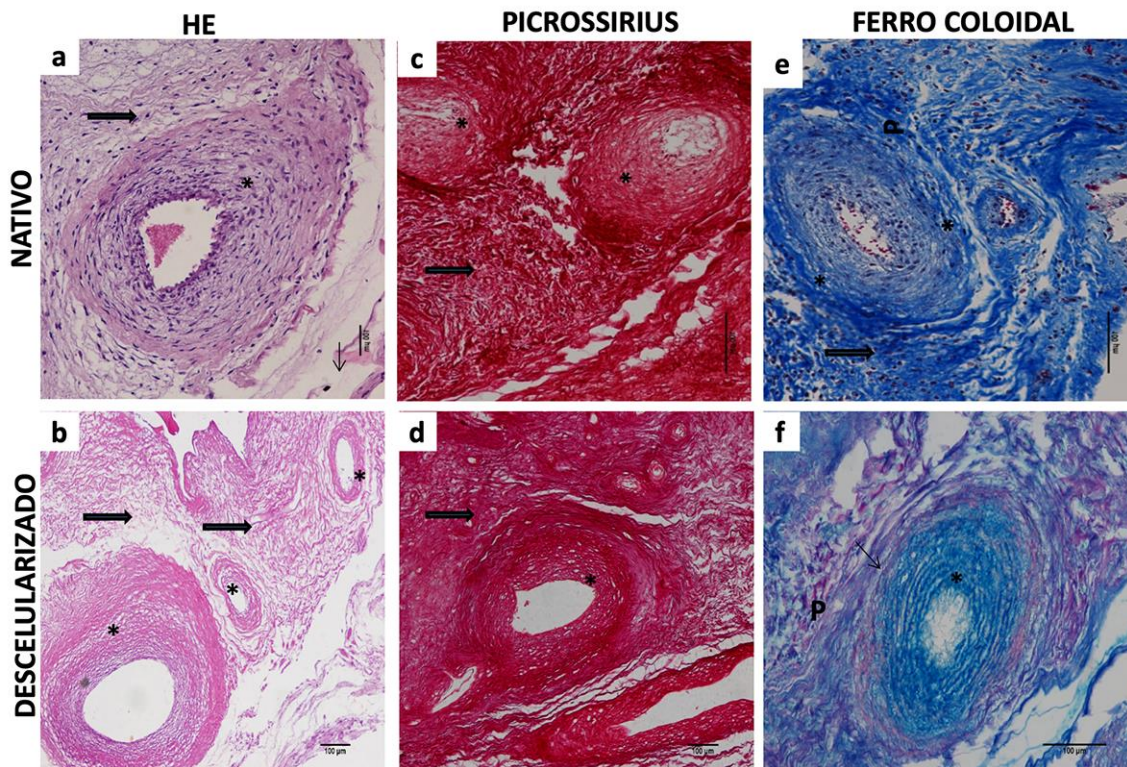
**Figura 7** – Fotomicrografias de cotilédones bovinos nativos e descelularizados, com 4 meses de gestação.



Fonte: ALVES, A.A.S., (2019, f. 36).

**Legenda:** **A** nativo, H&E. Observar as células trofoblásticas na superfície alantocorionica (seta), mesênquima (seta cheia) e vasos (\*). Em **B** descelularizado, H&E. Ausência completa de núcleos celulares tanto no mesênquima (seta grossa) e vasos (\*). Em **C**, cotilédone nativo. Picrosirius. Observar fibras de colágeno de cor vermelho, predominando a região da superfície alantocoriônica (seta), mesênquima (seta cheia), vasos (\*) e vilos (v). Em **D**, cotilédone descelularizado. Observar fibras de colágeno junto ao mesênquima (seta cheia) e vasos (\*). Em **E**, cotilédone nativo. Observar pela coloração de Ferro Coloidal, presença de glicoproteína, com marcação em azul (P), junto aos vasos (\*) e mesênquima (seta cheia) e presença de fibras de colágeno, cor vermelho claro, junto a luz do vaso (seta). Em **F**, cotilédone descelularizado. Observar presença de glicoproteínas em cor azul claro, junto ao mesênquima (P) e vasos (\*), e fibras de colágeno em vermelho claro no mesênquima (seta cheia) e periferia do vasos(v).

**Figura 8** – Fotomicrografias de cotilédones bovinos nativos e descelularizados, com 7 meses de gestação.

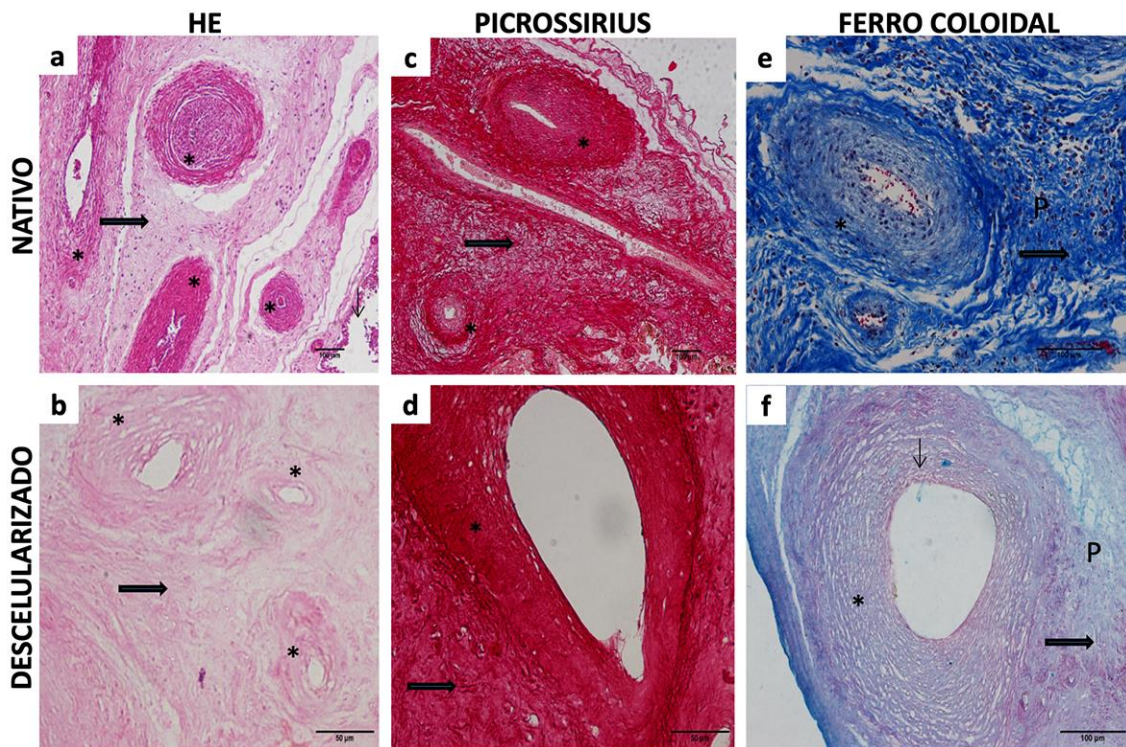


Fonte: ALVES, A.A.S., (2019, f. 37).

**Legenda:** **A** nativo, H&E. Observar as células trofoblásticas na superfície alantocoriônica (seta), mesênquima (seta cheia) e vasos (\*). **B** descelularizado, H&E. Ausência completa de núcleos celulares tanto no mesênquima (seta grossa) vasos (\*). Em **C**, cotilédone nativo. Picrosirius. Observar fibras de colágeno de cor vermelho, predominando a região do mesênquima (seta cheia) e vasos (\*). Em **D**, cotilédone descelularizado. Observar fibras de colágeno junto ao mesênquima (seta cheia) e vasos (\*). Em **E**, cotilédone nativo. Observar pela coloração de Ferro Coloidal, proteína glicosaminoglicano, com marcação em azul (P), junto aos vasos (\*) e mesênquima (seta cheia). Em **F**, cotilédone descelularizado. Observar presença de glicoproteínas em cor azul, junto ao mesênquima (P) e vasos (\*), e fibras de colágeno, cor vermelho claro, junto a periferia do vaso (seta).



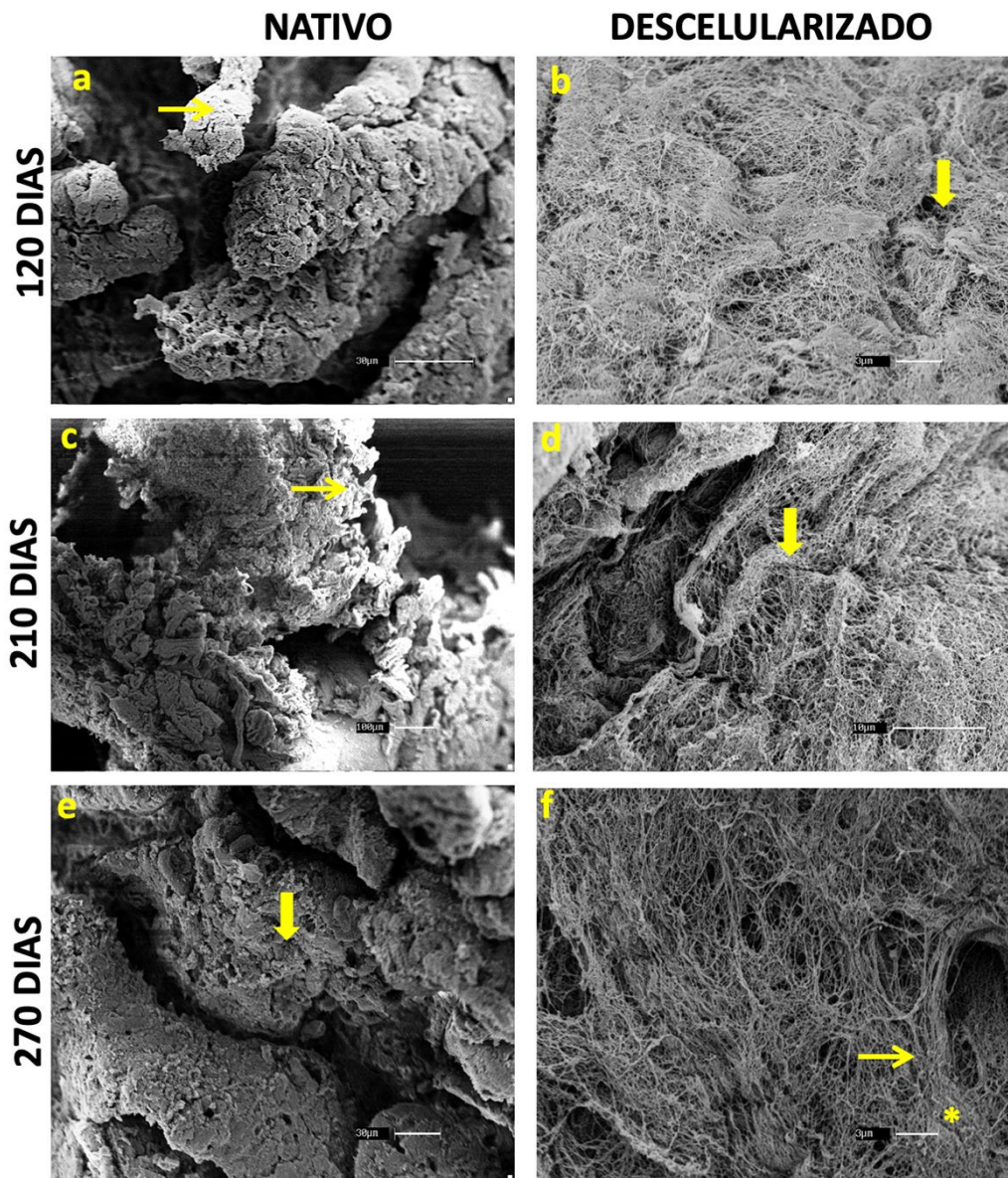
**Figura 9** – Fotomicrografias de cotilédones bovinos nativos e descelularizados, com 9 meses de gestação.



Fonte: ALVES, A.A.S., (2019, f. 38).

**Legenda:** **A** nativo, H&E. Observar as células trofoblásticas na superfície alantocoriônica (seta), mesênquima (seta cheia) e vasos (\*). **B** descelularizado, H&E. Ausência completa de núcleos celulares tanto no mesênquima (seta grossa) vasos (\*). Em **C**, cotilédone nativo. Picrosirius. Observar fibras de colágeno de cor vermelho, predominando a região do mesênquima (seta cheia) e vasos (\*). Em **D**, cotilédone descelularizado. Observar fibras de colágeno junto ao mesênquima (seta cheia) e vasos (\*). Em **E**, cotilédone nativo. Observar pela coloração de Ferro Coloidal, proteína glicosaminoglicano, com marcação em azul (P), junto aos vasos (\*) e mesênquima (seta cheia). Em **F**, cotilédone descelularizado. Observar presença de glicoproteínas em cor azul (P), junto ao mesênquima (seta cheia) e vasos (\*), e fibras de colágeno, cor vermelho claro, junto a periferia do vaso (seta).

**Figura 10** – Imagens de microscopia eletrônica por varredura de cotilédones bovinos nativos e descelularizados com 4, 7 e 9 meses de gestação.

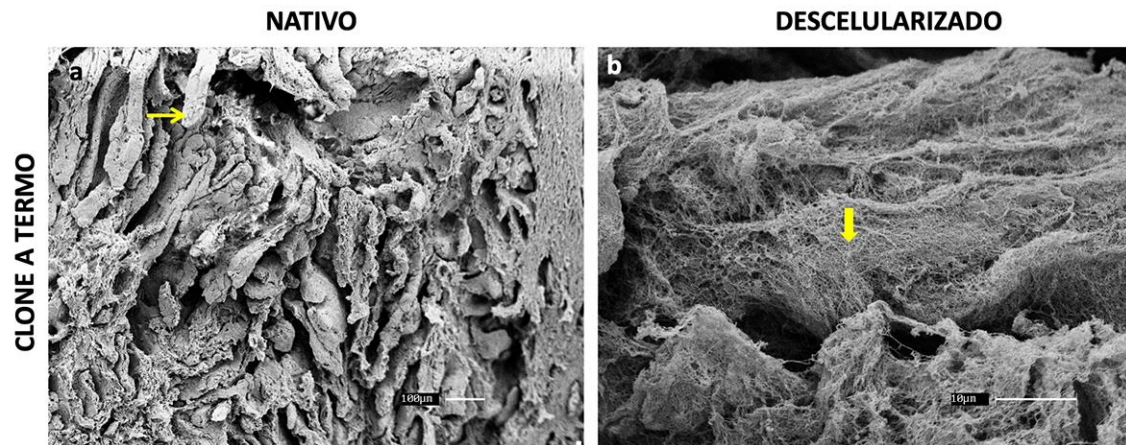


**Fonte:** ALVES, A.A.S., (2019, f 39).

**Legenda:** Em **A**, observar, cotilédone nativo com 4 meses de gestação, superfície alantocoriônica com a matriz extracelular e células trofoblástica (seta). Em **B**, cotilédone descelularizado com 4 meses de gestação, observar, fibras estruturais na matriz extracelular (seta cheia), sem evidência de núcleo celular. Em **C**, cotilédone nativo, com 7 meses de gestação, observar região do mesênquima com células trofoblásticas (seta). Em **D**, cotilédone descelularizado, com 7 meses de gestação, observar ausência de células trofoblástica junto ao mesênquima, matriz extracelular com fibras estruturais (seta cheia). Em **E**, observar, cotilédone nativo com 9 meses de gestação, superfície alantocoriônica com a matriz extracelular e células trofoblástica (seta cheia). Em **F**, cotilédone descelularizado com 9 meses de gestação, observar, fibras estruturais na matriz extracelular (seta cheia), junto à área de transição entre o mesênquima (seta) e o vaso (\*), sem evidências de núcleo celulares.



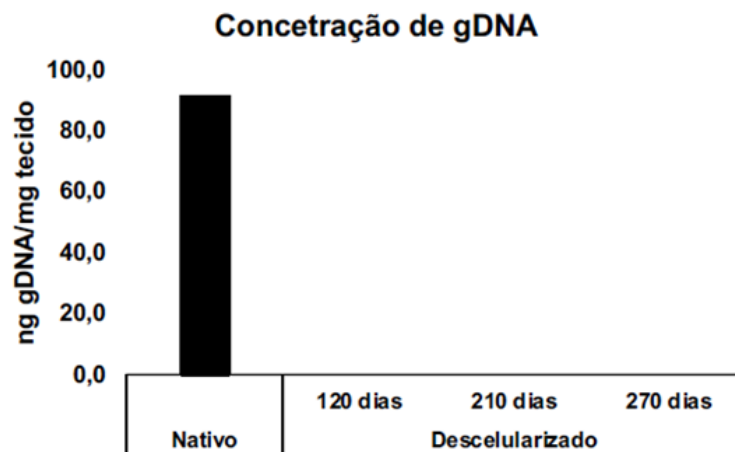
**Figura 11** – Imagens de microscopia eletrônica por varredura de cotilédones bovinos TNCS a termo nativo e descelularizado.



**Fonte:** ALVES, A.A.S., (2019, f 34).

**Legenda:** Em **A**, cotilédone clone nativo a termo, observar mesênquima com células trofoblásticas (seta). Em **B**, cotilédone clone descelularizado a termo, observar ausência de células trofoblástica junto ao mesênquima, matriz extracelular densa com fibras estruturais (seta cheia).

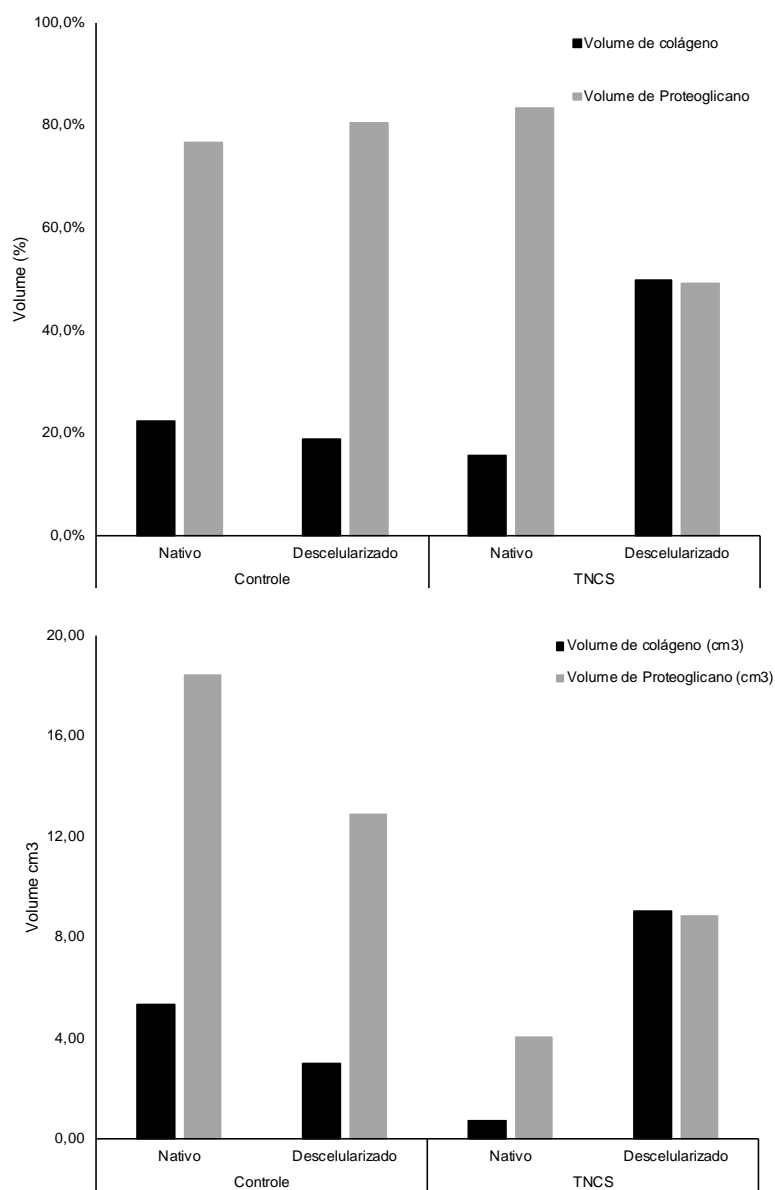
**Gráfico 1** – Quantificação de DNA genômico remanescente



**Fonte:** ALVES, A.A.S., (2019, f.41).

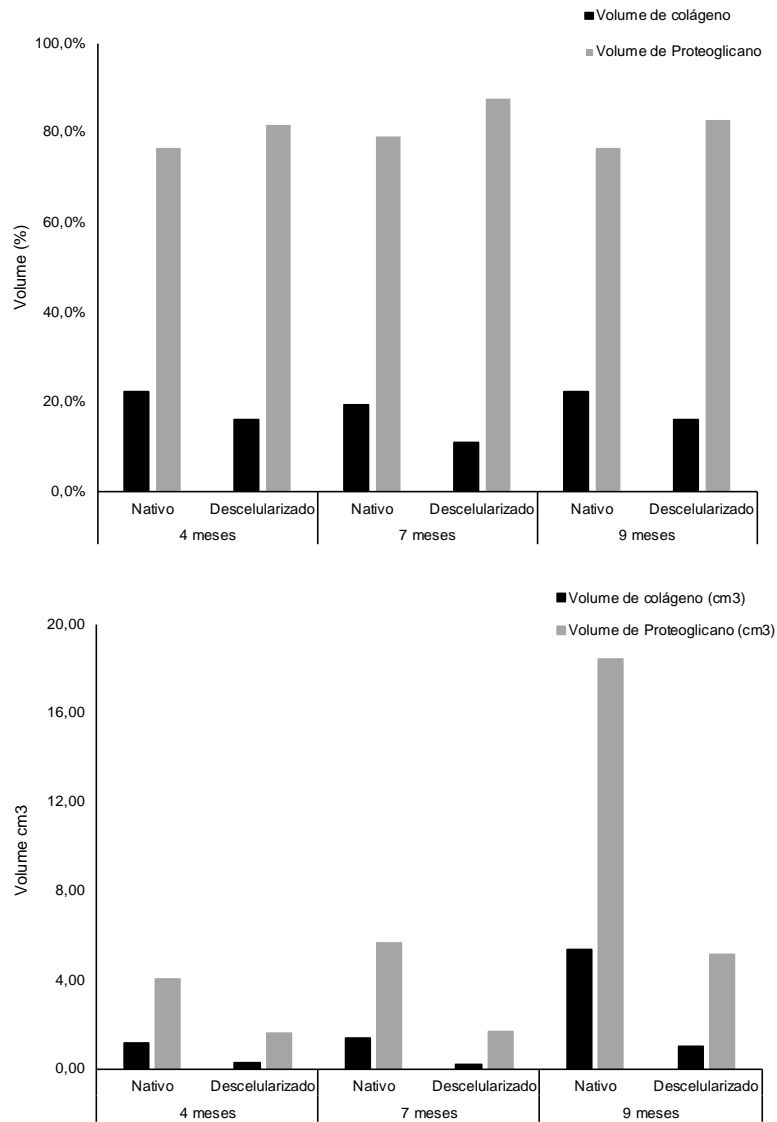
**Legenda:** Concentração de gDNA. O gráfico mostra a quantificação de DNA das amostras placentárias controle e descelularizada das porções fetais.

**Gráfico 2** – Quantificação estereológica de colágeno e proteoglicanos nas gestações TNCS e controle a termo, expressas em volume e em porcentagem.



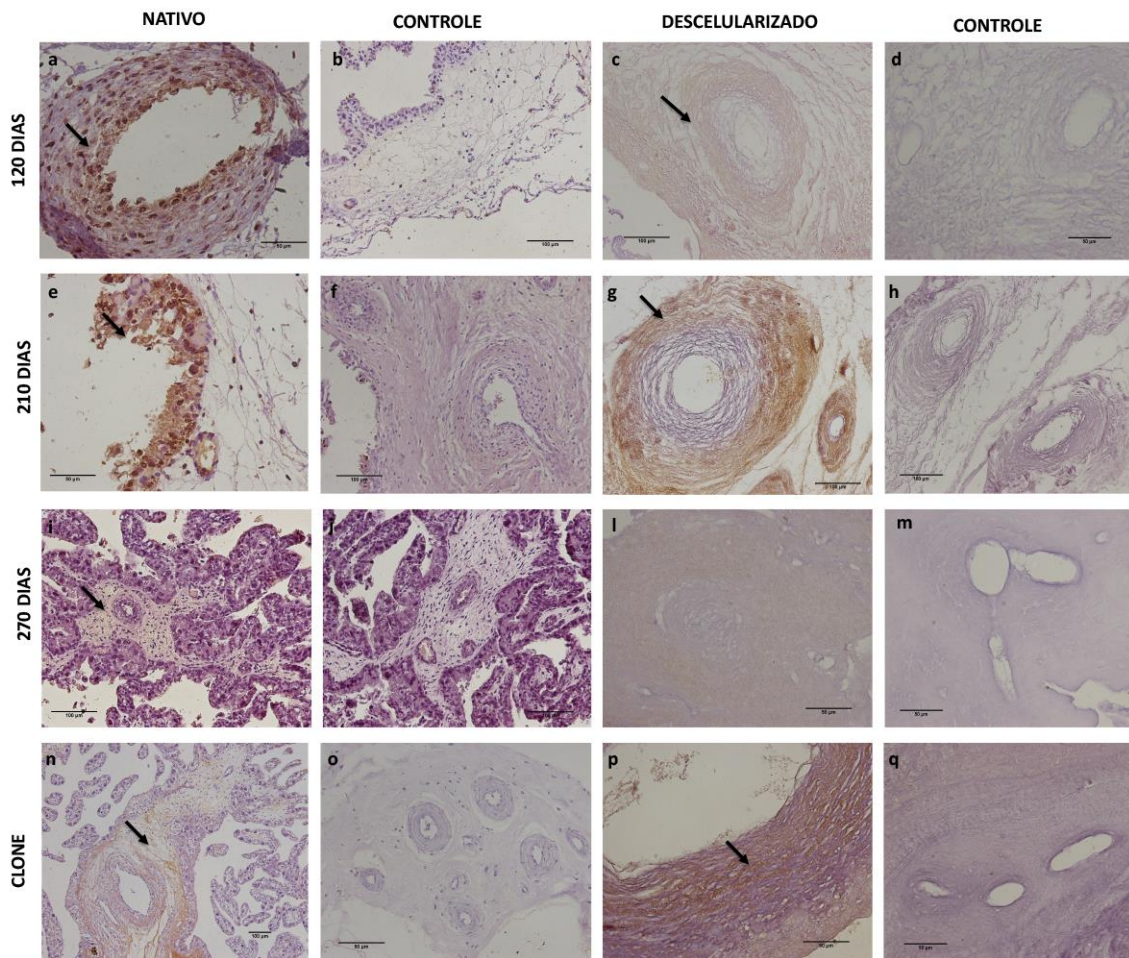
Fonte: ALVES, A.A.S., (2019, f.40).

**Gráfico 3** – Quantificação estereológica de colágeno e proteoglicanos nas gestações controle aos 4, 7 e 9 meses, expressas em volume e em porcentagem.



Fonte: ALVES, A.A.S., (2019).

**Figura 12** – Imunohistoquímica para Laminina em placentas bovinas nativas e descelularizadas.

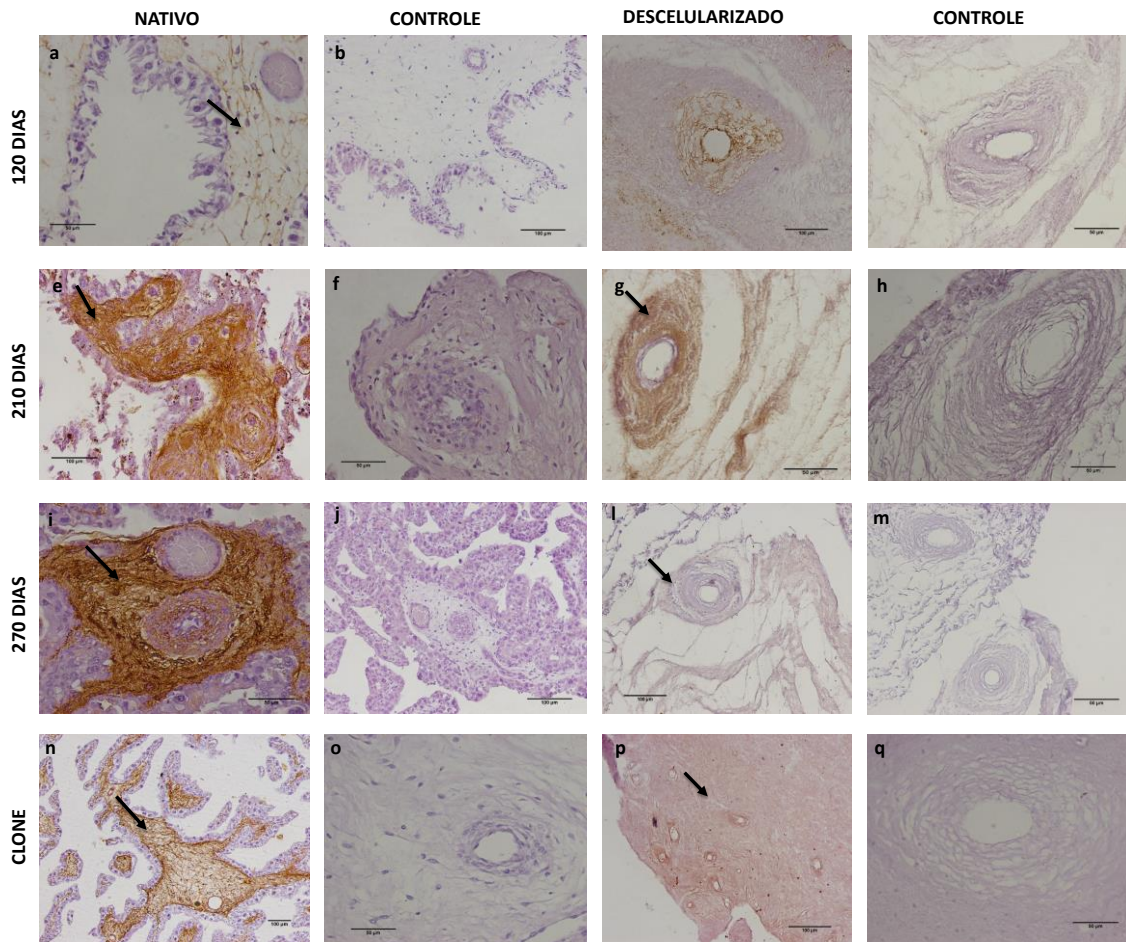


**Fonte:** ALVES, A.A.S., (2019, f.44).

**Legenda:** Imunohistoquímica para laminina. Amostras de placenta bovina nativa e placenta de bovinos descelularizados com idades de 120 dias (a-d), 210 dias (e-h) e 270 dias (i-m) e de clones (n-q). Imunomarcção demonstrada pelas setas.



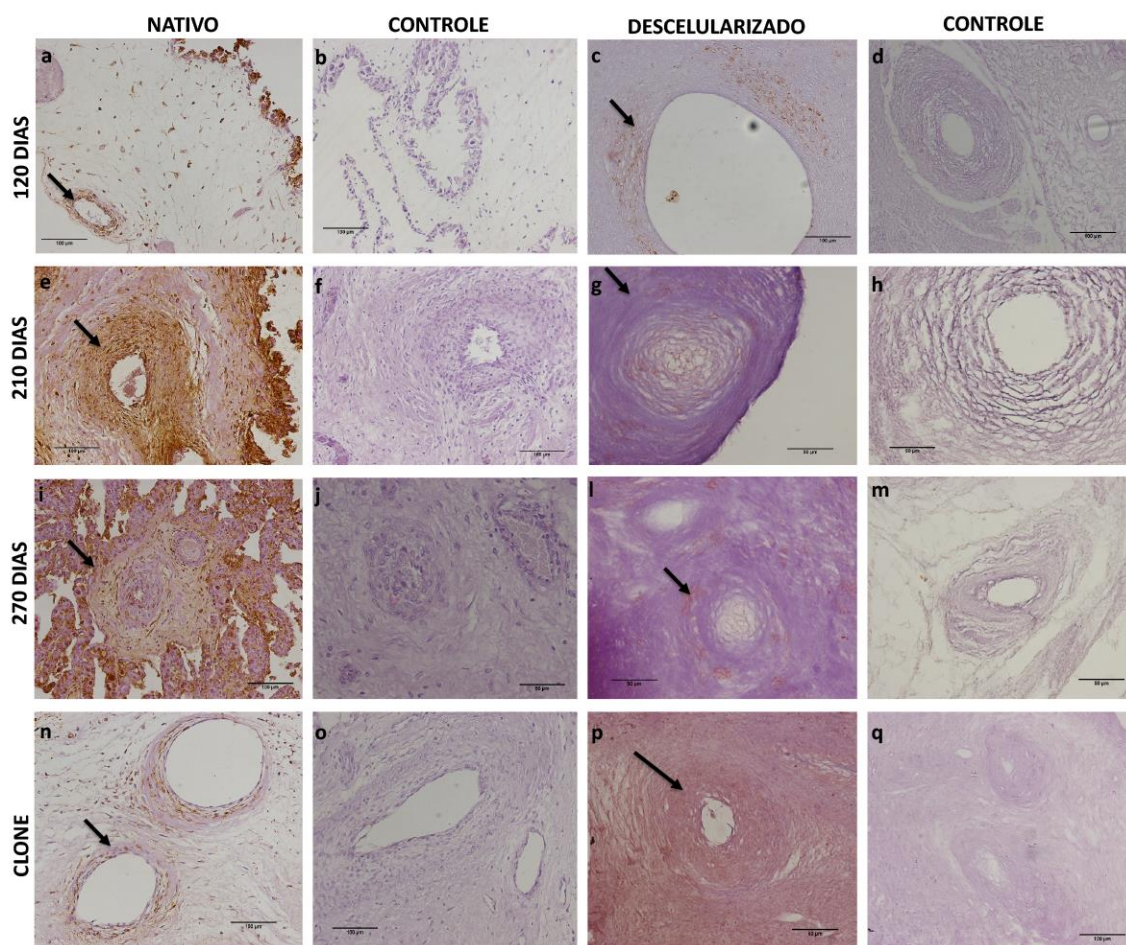
**Figura 13** – Imunohistoquímica para Fibronectina em placentas bovinas nativas e descelularizadas.



**Fonte:** ALVES, A.A.S., (2019, f.45).

**Legenda:** Imunohistoquímica para fibronectina. Amostras de placenta bovina nativa e placenta bovina descelularizada com idades de 120 dias (a-d), 210 dias (e-h) e 270 dias (i-m) e de clones (n-q) . Imunomarcção de fibronectina ao redor dos vasos e na membrana basal pertencente ao trofoblasto de vilosidades terminais demonstrada pelas setas.

**Figura 14** – Imunohistoquímica para Perlecan em placentas bovinas nativas e descelularizadas.



**Fonte:** ALVES, A.A.S., (2019, f.46).

**Legenda:** Imunohistoquímica para perlecan. Amostras de placenta bovina nativa e placenta bovinas descelularizadas com idades de 120 dias (a-d), 210 dias (e-h) e 270 dias (i-m) e de clones (n-q). Imunomarcção demonstrada pelas setas.

## 8. DISCUSSÃO

A descelularização das amostras TNCS e nativas foi confirmada pela macroscopia, histologia, microscopia eletrônica por varredura, e quantificação de gDNA remanescente, de acordo com o preconizado por Crapo et al, (2011).

O agente químico escolhido no protocolo de descelularização foi o SDS, com concentração crescente de 0,01% a 1,0%, sendo esse um detergente iônico capaz de remover as células por interrupção da interação proteína-proteína, incluindo a dissociação da proteína da matriz extracelular (CRAPO, GILBERT & BADYLAK, 2011; FAULK *et al.*, 2014). O segundo detergente (não iônico) utilizado no processo de descelularização foi o Triton x-100 a 1%, visando à diminuição da ação química do SDS, com vistas a uma mínima mudança na composição da matriz extracelular placentária, sendo esse o agente indicado para eliminação de lipídios do tecido, em detrimento de detergentes iônicos como SDS (CRAPO, GILBERT & BADYLAK, 2011; HREBIKOVA, DIAZ & MOKRY, 2013).

A estrutura interna do cotilédone, junto com a matriz extracelular, foi preservada por manutenção da arquitetura vascular e presença de proteínas, como colágeno e proteoglicanos. Foram descritas a localização e distribuição dessas proteínas tanto na placenta nativa como na placenta descelularizada. Para ambas as origens placentárias (TNCS e nativas), como para as diversas idades analisadas, foram atingidos os parâmetros estabelecidos para serem considerados como “scaffolds” biológicos, isto é, ausência de núcleos celulares, menos de 50ng de gDNA por mg de tecido, manutenção e preservação das estruturas da matriz (CRAPO, GILBERT & BADYLAK, 2011; BARRETO *et al.*, 2017).

O processo de descelularização das placentas bovinas foi eficiente, mantendo as características do tecido, com aspecto translúcido, e suas principais características macroscópicas e histológicas após as colorações básicas, como hematoxilina e eosina, com ausência de núcleos celulares. As colorações de picosirius e ferro coloidal demonstraram a presença de proteínas, tais como colágeno e proteoglicano (BARRETO *et al.*, 2017).



O presente estudo estabeleceu que, de fato, a placenta bovina, em comparação à placenta humana, apresenta características semelhantes ou até mesmo superiores, devido ao seu tamanho e arranjo vascular, que permite fácil perfusão dos detergentes. Outro ponto importante é a obtenção da amostra de tecido animal em relação à placenta humana, já que existe toda uma jurisprudência para se trabalhar com material humano. Em contrapartida, há facilidade de aquisição de placentas bovinas descartadas em abatedouros e frigoríficos conveniados (KAKABADZE; KAKABADZE, 2015; KAKABADZE *et al.*, 2017; BARRETO *et al.*, 2017).

Nas placentas descelularizadas, as principais proteínas da matriz extracelular estão presentes, isto é, colágenos, fibronectina, laminina e o perlecam. A laminina estava presente no tecido conjuntivo, na região do mesênquima e na periferia dos vasos, com maior intensidade para o tecido nativo em relação ao tecido descelularizado, de forma semelhante à observada na placenta canina (LEONEL *et al.*, 2016). Diferentemente do colágeno e da laminina, a fibronectina e o perlecam tiveram expressão reduzida nas células de trofoblasto subjacentes e nos vasos sanguíneos.

Os cálculos estereológicos demonstraram em  $\text{cm}^3$  que o volume de proteínas estruturais (colágenos) e amorfas (proteoglicano) teve variações entre as idades gestacionais e entre as técnicas utilizadas. Quando comparadas às placentas nativas e descelularizadas, observou-se alto índice de proteioglicano nas placentas nativas em relação às placentas descelularizadas; já com relação às placentas descelularizadas, constatou-se um padrão entre as fibras colágenas, nas placentas nativas entre 4, 7 e 9 meses; já nas placentas descelularizadas de clones, observou-se aumento nas fibras de colágenos em relação às placentas de clones nativas. Esse aumento se manteve evidente em relação às placentas não clonadas, independentemente da idade gestacional.

A microscopia eletrônica por varredura nas placentas descelularizadas nativas demonstrou ausência de células trofoblásticas em permeio à matriz extracelular preservada; já em comparação com a placenta de animais clonados, foi observado maior número de componentes fibrilares (BARRETO *et al.*, 2017).

As análises feitas nos “scaffolds” biológicos, derivados de cotilédones bovinos descelularizados, resultaram em uma aparência parenquimatosa que se

assemelha a órgãos como fígado, pulmão, e tecidos como músculo, entre outros (BARRETO *et al.*,2017).

## **9. CONCLUSÃO**

O presente estudo revelou que a placenta bovina descelularizada apresenta-se como uma fonte viável na elaboração de “scaffolds” biológicos, apresentando matriz extracelular preservada, vasta arquitetura vascular, e, devido a seu tamanho, pode ser produzida em escala.

## REFERÊNCIAS

- AMENTA, P.S.; GAY S., VAHERI, A.; MARTINEZ-HERNANDEZ A. 1986. The extracellular matrix is an integrated unit: ultrastructural localization of collagen types I, III, IV, 284 V, VI, fibronectin, and laminin in human term placenta. *Collagen and related 285 research*, 6: 125–52.
- ASSIS NETO, A. C.; F. T. V. PEREIRA, T. C. SANTOS; C. E. AMBROSIO, R. LEISER, and MIGLINO, M.A. 2009: Morpho-physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. *Reprod. Domest. Anim.*
- BARRETO, R. D. S. N., ROMAGNOLLI, P., MESS, A. M., & MIGLINO, M. A. Decellularized bovine cotyledons may serve as biological scaffolds with preserved vascular arrangement. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, p. 1–9, 2017.
- BARRETO, R. D. S. N.; MIGLINO, M. A.; MEIRELLES, F. V.; VISINTIN, J. A.; DA SILVA, S. M.; BURIOLI, K.C.; FONSECA, R. ;BERTAN, C.; ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, F. T. V. Caracterização da fusão caruncular em gestações naturais de conceptos bovinos clonados. Characterization of the caruncular fusion in gestations of natural and cloned bovine conceptuses]. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v.29, n.10,p.779-787,2009.
- BOROJEVIC, R. & BALDUINO, A. Terapias Celulares e Bioengenharia Tecidual. In: MIR, L. (Org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.295-310.
- CARVALHO, A. C. A. D., PEREIRA, E. D. S. C., COSTA, C., BARRETO, I. C., MADUREIRA, L. C., & PAIM, F. R. (2010). Estratégias regenerativas da bioengenharia tecidual e aspectos éticos.
- CHEN, C. P. & APLIN, J.D. Placental extracellular matrix: gene expression, deposition and the effect oxygen. **Placenta**, Taiwan, v. 24, n. 4, Apr. 2003.
- CHOI, J. S., KIM, J. D., YOON, H. S., & CHO, Y. W. (2013). Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules. *Tissue Engineering. Part A*, 19, 329–339.
- CRAPO P. M., GILBERT T. W., BADYLAK S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials*, 32: 3233–3243, 2011.
- DARLEY, W. P.; PETERS, S. B. LARSEN, M. **Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine**. *Journal of Cell Science*. V.121, n°3, p.255-264, 2008.
- EVANS, H.E.; SACK, W.O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomy, Histology and Embryology**, v.2, p.11-45, 1973.
- FAULK D.M., CARRUTHERS C.A., WARNER H.J., KRAMER C.R., REING J.E., ZHANG L. The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta biomaterialia*10: 183–93, 2014.
- FLYNN, L., SEMPLE, J. L., & WOODHOUSE, K. A. (2006). Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering, *journal of biomedical materials research. Part A*, 79, 359–369.

- FRANCZYK M, LOPUCKI M, STACHOWICZ N, MORAWSKA D, KANKOFER M. Extracellular matrix proteins in healthy and retained placentas, comparing hemochorial and synepitheliochorial placentas. *Placenta* (2017), doi: 10.1016/j.placenta.2016.12.014.
- FURUKAWA, S.; KURODA, Y.; SUGIYAMA, A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. **Journal of toxicologic pathology**, v. 27, n. 1, p. 11–8, abr. 2014.
- GRIFFITH, L. G., & NAUGHTON, G. (2002). Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *science*, 295(5557), 1009-1014.
- GUILLOMOT, M., CAMPION, E., PRÉZELIN, A., SANDRA, O., HUE, I., LE BOURHIS, D., ... & LEWIN, H. (2014). Spatial and temporal changes of decorin, type I collagen and fibronectin expression in normal and clone bovine placenta. *Placenta*, 35(9), 737-747.
- GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. V.; KIEU, K.; JENSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology—reconsidered. **Journal of Microscopy**, v. 193, p. 199–211, 1999.
- GUNDERSEN, H. The smooth fractionator. **Journal of Microscopy**, v. 207, n. 3, p. 191-210, 2002.
- HAEGER, J. D.; HAMBRUCH, N.; PFARRER, C.. The bovine placenta in vivo and in vitro. **Theriogenology**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.306-312, jul. 2016.
- HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 6-13, 2002.
- HILL, J.R.; BURGHARDT, R.C.; JONES, K., LONG, C.R.; LOONEY, C.R.; SHIN, T.; SPENCER, T.E.; THOMPSON, J.A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. **Evidence for palcental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuse**. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 1787-1794, 2000.
- HILL. J.R. **Incidence of abnormal offspring from cloning and other assisted reproductive technologies**. *The Annual Review of Animal Biosciences* is online at [animal.annualreviews.org](http://animal.annualreviews.org). *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013. 2:16.1–16.15
- HONG, J. W., LEE, W. J., HAHN, S. B., KIM, B. J., & LEW, D. H. (2010). The effect of human placenta extract in a wound healing model. *Annals of Plastic Surgery*, 65, 96–100
- HREBIKOVA, H., DIAZ, D., & MOKRY, J. (2015). Chemical decellularization: A promising approach for preparation of extracellular matrix. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic*, 159, 12–17.
- HYNES, R.O. The extracelular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326, p.1216-1219, 2009.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO. J. **Biologia celular e molecular**. 8.ed.- Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2005.

- KADLER, K. E. & BALDOCK, C., Bella, J. and Boot-Handford, R. P. (2007). **Collagens at a glance**. J. Cell Sci. 120, 1955-1958.
- KAKABADZE A & KAKABADZE Z. 2015. **Prospect of using decellularized human 333 placenta and cow placentome for creation of new organs: targeting the liver 334 (part I: anatomic study)**, Transplantation proceedings, 47: 1222–7.
- KAKABADZE, A., MARDALEISHVILI, K., LOLADZE, G., KARALASHVILI, L., CHUTKERASHVILI, G., CHAKHUNASHVILI, D., & KAKABADZE, Z. (2017). Reconstruction of mandibular defects with autogenous bone and decellularized bovine bone grafts with freeze-dried bone marrow stem cell paracrine factors. *Oncology letters*, 13(3), 1811-1818.
- KAKABADZE, Z., CHAKHUNASHVILI, D., GOGILASHVILI, K., EDIBERIDZE, K., CHAKHUNASHVILI, K., KALANDARISHVILI, K., & KARALASHVILI, L. (2019). Bone Marrow Stem Cell and Decellularized Human Amniotic Membrane for the Treatment of Nonhealing Wound After Radiation Therapy. *Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, 17(Suppl 1), 92-98.
- KULAR, J. K.; BASU, S. & SHARMA, R. I. The extracellular matrix: structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. **Journal of tissue engineering**, v. 5, p. 2041731414557112, 2014.
- LANGER, R. & VACANTI, J. Advances in tissue engineering. **Journal of pediatric surgery**, v. 51, n. 1, p. 8-12, 2016.
- LEISER, R., & KAUFMANN, P. (1994). Placental structure: in a comparative aspect. *Experimental and Clinical Endocrinology*, 102, 122–134.
- LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 102, n. 03, p. 122–134, 15 jul. 2009.
- LEONEL, L.C.P.C. Produção e caracterização de biomateriais acelulares bioativos obtidos a partir da descclularização de placentas. Dissertação (Mestrado em Ciências) – FMVZUSP, São Paulo, 2016.
- LOJUDICE, F. H.; SOGAYAR, M. C. Células-tronco no tratamento e cura do diabetes mellitus. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 19-21, 2008.
- MEIRELLES, F. V., BIRGEL, E. H., PERECIN, F., BERTOLINI, M., TRALDI, A. S., PIMENTEL, J. R. V., ... & POGLIANI, F. C. (2009). Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Reproduction, Fertility and Development*, 22(1), 88-97.
- MIGLINO M.A., PEREIRA F.T.V., Visintin J.A., GARCIA J.M., MEIRELLES F.V., Rumpf R., AMBRÓSIO C.E., PAPA P.C., Santos T.C., Carvalho A.F., LEISER R. & Carter A.M. 2007. **Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture**. *Theriogenology* 68: 604- 617.
- MIGLINO, M. A. **Clonagem animal e placentação**. *Acta Scientiae Veterinariae*. Supl. 32, p.75-78, 2004.
- MOSSMAN, H.W. **Vertebrate Fetal Membranes**. New Brunwisk: Rutegrs University Press,1987,v.1.383p.

- PEREIRA, F. T. V. 2004. **Eritrofagocitose placentria em búfalas** (*Bubalus bubalis bubalis* Simpson, 1945) Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 102p.
- PFARRER, C. D. Characterization of the bovine placenta by cytoskeleton, integrin 411 receptors, and extracellular matrix. *Methods Mol. Med.* 121 (2006) 323–335, p 412.
- Registro Brasileiro de Transplantes de 2017. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=563&c=1102&s=0&friendly=registro-brasileiro-de-transplantes-de-2017>>, acesso em julho de 2019.
- SOUSA, P. A. De; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L.E.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation of Gestational Deficiencies in Cloned Sheep Fetuses and Placenta. **Biology Of Reproduction**, v.65, n.1, p. 23-30,2001.
- TSUCHIYA, T., SIVARAPATNA, A., ROCCO, K., NANASHIMA, A., NAGAYASU, T., & NIKLASON, L. E. Future prospects for tissue engineered lung transplantation. **Organogenesis**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.196-207, 31 jan. 2014.
- UYGUN, B. E. et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. **Nature Medicine**, 2010.
- WELLS, D.N. Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech*, v.24, n.1, p. 251-264, 2005.
- YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 3, p.155-163,1998.