



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**RAQUEL AHNERT AGUIAR EVANGELISTA**

**SENSORIAMENTO ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO  
RENAL**

VITÓRIA, ES

2020

**RAQUEL AHNERT AGUIAR EVANGELISTA**

**SENSORIAMENTO ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO  
RENAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

VITÓRIA, ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

E92s Evangelista, Raquel Ahnert Aguiar, 1994-  
Sensoriamento óptico aplicado à descelularização renal / Raquel  
Ahnert Aguiar Evangelista. - 2020.  
60 f. : il.

Orientador: Breno Valentim Nogueira.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Rins - Transplante. 2. Biotecnologia. 3. Órgãos artificiais. I.  
Nogueira, Breno Valentim. II. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

**RAQUEL AHNERT AGUIAR EVANGELISTA**

**SENSORIAMENTO ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO  
RENAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 14 de Dezembro de 2020.

**Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientador(a)**

**Prof. Dr. Teodiano Freire Bastos Filho**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Profa. Dra. Airlane Pereira Alencar**  
**Universidade de São Paulo**

VITÓRIA, ES

2020

## DEDICATÓRIA

A minha admiração e necessidade pela busca pelo conhecimento certamente foi influenciada por meu pai, Walker Vesterine de Aguiar, por isso dedico especialmente a ele este trabalho.

De forma especial, também dedico este trabalho a minha mãe, Nilzelene Ahnert Aguiar e ao meu esposo, Renan Evangelista Rangel, cujo apoio foi essencial, revigorante e acalentador.

A todos os meus familiares, que oraram por este trabalho e estavam juntos comigo para tudo o que eu precisasse.

Finalmente, ao meu criador e pai celestial, Deus, que me deu força, sabedoria e inteligência para enfrentar este desafio, a Ele toda honra e glória.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Breno Valentim Nogueira, que me concedeu a oportunidade de ser sua aluna de mestrado, pela confiança e atenção e orientação durante minha formação.

Aos professores Dr. Teodiano Freire Bastos Filho e Dra. Airlane Pereira Alencar por aceitarem compor a banca de avaliação deste trabalho.

Agradeço aos técnicos e alunos do laboratório LUCCAR, Rayssa, Júlia, Luiza, Gabriel, Tadeu, Marcos e demais colegas, que ampliaram meu conhecimento e apoiaram a execução desta pesquisa. De forma especial, agradeço a aluna de iniciação científica Julia Fardin, que esteve comigo na execução dos experimentos e me ajudou durante todo o trabalho.

Especialmente, meu muito obrigado, à professora Dra. Airlane que com seu vasto conhecimento e simpatia, me ajudou nas análises estatísticas e fez considerações importantes para o mesmo.

Ao professor Dr. Adilson, que auxiliou a montagem do sistema de sensoriamento e dedicou tempo para sanar minhas dúvidas.

Ao Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio que possibilitou a realização das análises de DNA, e ao Dr. Oeber, que me ajudou durante a utilização do Nanodrop®.

Agradeço a UFES e ao seu programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pela estrutura, materiais e oportunidade de ser aluna de Mestrado em Biotecnologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (Processo nº 142788/2018-0) e contribuição através do edital MCTIC/CNPq Nº 28/2018 - Universal/Faixa B; Processo: 439439/2018-3; título: “Desenvolvimento de Sensor Óptico aplicado à Bioengenharia de Tecidos”.

## EPÍGRAFE

“Bem sei que tudo podes, e nenhum dos teus planos pode ser frustrado”. (*Jó 42:2 ARA*)

## RESUMO

EVANGELISTA, R. A. A. **Sensoriamento óptico aplicado à descclularização renal**. 2020. 60f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O rim é o órgão mais solicitado para transplantes no Brasil. Atualmente 68% dos pacientes da lista de espera para transplante aguardam por este órgão. A técnica de descclularização surgiu como uma alternativa promissora para o aumento da oferta e diminuição das taxas de rejeição de transplantes. A concentração do DNA residual é o principal parâmetro para atestar a qualidade do arcabouço descclularizado. No entanto, trata-se de uma técnica invasiva e destrutiva. Com o intuito de possibilitar a avaliação de órgãos em tempo real nas descclularizações sem danificá-los, Pereira et al (2019) desenvolveram um sistema de monitoramento óptico composto por três módulos (fonte luminosa, fotodetector e placa de prototipagem) acoplados a um computador com programação própria. Este sistema registra o perfil óptico dos órgãos na forma de gráficos de tensão ( $v.s^{-1}$ ). Nosso objetivo foi analisar os registros gráficos produzidos pelo sensor após descclularizações renais, com intuito de relacioná-los à qualidade final dos órgãos. Para isto utilizaram-se rins de ratos Wistar adultos com massa média de  $301,8 \pm 44,6$  g. As descclularizações ocorreram dentro do sistema de sensoriamento óptico, e órgãos nativos e descclularizados foram separados para análises de DNA, dosagem de hidroxiprolina e histologia. As curvas produzidas pelo sensor, foram suavizadas para redução de ruído e ajustadas segundo modelo logístico de regressão de quatro parâmetros ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $S$  e  $X_0$ ), descrito por Gadagkar e Call (2000). A análise de DNA confirmou a remoção celular de 95%, e a dosagem de hidroxiprolina confirmou a manutenção do colágeno tecidual. Os perfis ópticos produzidos demonstraram seguir o padrão de curva em  $S$ , e o parâmetro  $X_0$  foi o que obteve melhor correlação com o DNA residual (52%).

Palavras-chave: Sensor óptico, perfil óptico, bioengenharia tecidual, transplante renal.

## OPTICAL SENSING APPLIED TO KIDNEY DECELLULARIZATION

### ABSTRACT

EVANGELISTA, R. A. A. **Optical sensing applied to kidney decellularization**. 2020. 60f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

The kidney is the most requested organ for transplants in Brazil. Currently, 68% of patients on the transplant waiting list are waiting for this organ. Decellularization technique has emerged as a promising alternative for increasing supply and decreasing transplant rejection rates. The concentration of residual DNA is the main parameter to certify the quality of the scaffold. However, it is an invasive and destructive technique. To follow the process during decellularization without damaging, Pereira et al (2019) developed an optical monitoring system composed of three modules (light source, photodetector and prototyping plate) coupled to a computer with own programming. This system records the organs optical profile in the form of voltage graphs (v.s-1). Our objective was to analyze the graphic records produced by the sensor after renal decellularization, and relate them to the final organ quality. We used kidneys of adult wistar rats with average mass of  $301.8 \pm 44.6$  g. Decellularizations occurred within the optical sensor and native and decellularized organs were separated for DNA analysis, hydroxyproline dosage and histology. The curves produced by the sensor were smoothed to reduce noise and adjusted according to a four-parameter logistic regression model (A1, A2, S and X0), described by Gadagkar and Call (2000). DNA analysis confirmed 95% of cell removal and the hydroxyproline dosage confirmed the maintenance of tissue collagen. The optical profiles produced an S curve pattern, and the parameter X0 was the one that obtained the best correlation with the residual DNA (52%). Keywords: Optical sensor, optical profile, tissue bioengineering, transplantation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do sistema urinário superior humano, evidenciando os rins.....	16
Figura 2. Ilustração de um tecido antes e após o processo de descelularização.....	19
Figura 3. Componentes da Matriz Extracelular.....	22
Figura 4. Representação da molécula de colágeno e suas ligações peptídicas.....	24
Figura 5. Representação de uma molécula de proteoglicano.....	25
Figura 6. Etapas para o procedimento de recelularização.....	27
Figura 7. Representação do protocolo utilizado para a descelularização.....	31
Figura 8. O sistema de sensoriamento óptico. A fonte luminosa de LED posicionada diametralmente ao Fotodiodo. A Placa de prototipagem está localizada no lado direito externo da câmara do Sensor e está conectada a um computador por uma porta USB.....	32
Figura 9. Exemplo de registro de tensão, feito pelo sistema de monitoramento óptico.....	33
Figura 10. Aspecto visual do rim de rato adulto wistar antes e após o processo de descelularização: aspecto de um rim nativo, descelularizado e com descelularização incompleta.....	38
Figura 11. Imagem de microscopia óptica do tecido renal corado por H&E (A e B) e Picrossírius (C e D).....	40
Figura 12. Curva padrão de hidroxiprolina.....	41

Figura 13. Quantificação de hidroxiprolina representados em $\mu\text{g}/\text{peso total renal}$ liofilizado.....	42
Figura 14. Gráfico de barras de porcentagem de DNA no tecido renal liofilizado nativo e descelularizado.....	43
Figura 15. Imagem do rim dentro do sistema de monitoramento óptico, no início e após a descelularização. Registro Gráfico completo, após uma descelularização. Monitoramento da fonte luminosa isolada, por um período de 20h.....	45
Figura 16. Tensão suavizada observada e ajustada segundo modelo logístico, ao longo do tempo, para cada descelularização.....	47
Figura 17. Dispersão entre estimativa de $A_2$ e o percentual de DNA removido.....	50
Figura 18. Dispersão entre a estimativa de $s$ e o percentual de DNA removido.....	50
Figura 19. Dispersão entre a estimativa de $X_0$ e o percentual de DNA removido.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
ALH	Antígeno Leucocitário Humano
CNCDO	Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos
CTU	Cadastro Técnico Único
DCNT	Doenças Crônicas não-transmissíveis
DCV	Doenças Cardiovasculares
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DRC	Doença Renal Crônica
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
FFR	Falência Funcional Renal
FG	Filtração Glomerular
GAG	Glicosaminoglicanos
Gly	Glicina
GODT	Observatório Global de Doação e Transplante (do inglês <i>Global Observatory of Donation and Transplantation</i> )
HA	Ácido Hialurônico (do inglês <i>Hyaluronic acid</i> )
MEC	Matriz Extracelular
NKF	Fundação Nacional dos Rins (do inglês <i>National Kidney Foundation</i> )
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> )

PG	Proteoglicanos
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
TRS	Terapia Renal Substitutiva

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	15
1.2 DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS.....	19
1.2.1 Métodos de Descelularização.....	20
1.3 A MATRIZ EXTRACELULAR.....	21
1.3.1 Colágeno.....	23
1.3.2 Proteoglicanos e Glicosaminoglicanos.....	25
1.4 ANÁLISE DO ARCABOUÇO DESCELULARIZADO.....	26
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>3 MÉTODOS</b> .....	31
3.1 ANIMAIS.....	31
3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	31
3.3 PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO.....	32
3.4 O SISTEMA DE SENSORIAMENTO ÓPTICO.....	33
3.5 ESTATÍSTICA.....	34
3.6 ANÁLISE HISTOQUÍMICA.....	35
3.6.1 Coloração por Hematoxilina e Eosina.....	36
3.6.2 Coloração por Picrossírius.....	36
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	37
3.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DE HIDROXIPROLINA.....	38
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	40
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO.....	42
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	44
4.4 SISTEMA DE MONITORAMENTO ÓPTICO.....	45
4.4.1 Modelo matemático ajustado ao perfil óptico renal.....	47
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	53

**REFERÊNCIAS**

**APÊNDICES**

**ANEXOS**

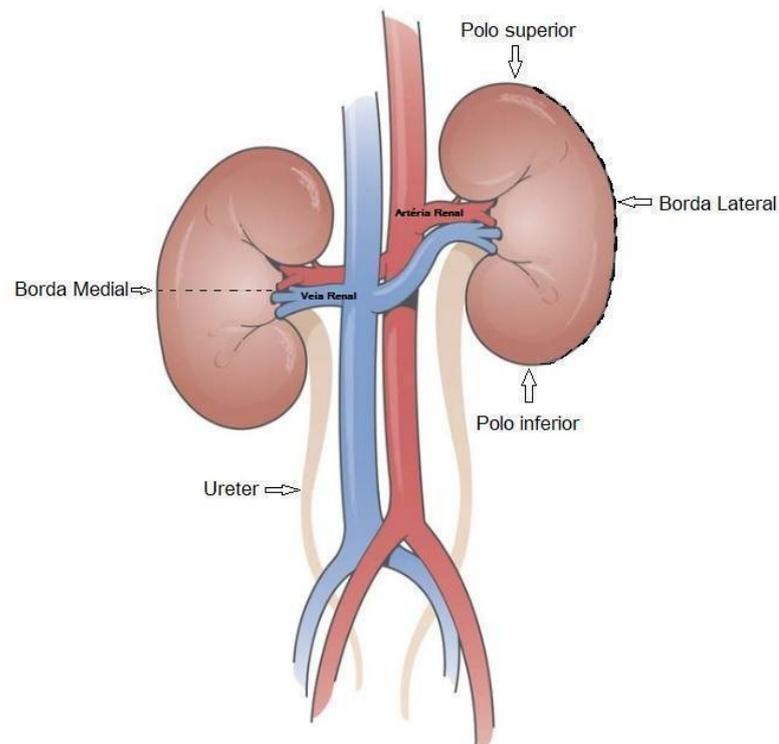
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 EPIDEMIOLOGIA

As doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) chamam a atenção mundial por serem responsáveis por cerca de 60% das mortes ao redor do mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Dentre este vasto grupo, as doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis por 30% das mortes mundiais; apenas em 2016 levaram 17,9 milhões de pessoas a óbito (WHO, 2018; MALTA et al., 2019). Atualmente, alguns estudos vêm demonstrando a relação entre as DCV e a Doença Renal Crônica (DRC). Esta última, tem sido descrita como o fator de risco principal para o desenvolvimento de DCV. A associação é tão significativa que pacientes portadores de DRC possuem maior risco de mortalidade por causas cardiovasculares (BRUCHARLES et al., 2010).

A DRC é destacada como um problema de saúde mundial, pelo aumento da sua prevalência e o alto custo de tratamento (BARSOUM R. S., 2006). O diagnóstico normalmente é tardio e o tratamento feito de forma inadequada, conseqüentemente, estes pacientes lidam com desfechos indesejados, decorrentes do efeito secundário da falência funcional renal (FFR), como anemia, desnutrição, acidose metabólica, óbito (predominantemente por causas cardiovasculares), dentre outros (BASTOS et al., 2010).

Os rins estão localizados posteriormente ao peritônio parietal, em sua fissura na borda medial, chamada de Hilo Renal. Veias, artérias, vasos linfáticos, nervos e ureter entram e saem do órgão como representado na Figura 1 (DANGELO E FATTINI, 2002). Dentre suas diversas funções, a principal e mais conhecida é a filtração sanguínea que, posteriormente, origina a urina (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008). Como resultado desse processo, as substâncias provenientes do metabolismo celular e as que estão em excesso, além de componentes tóxicos, são excretados do organismo, promovendo a manutenção da homeostase corporal.



**Figura 1.** Representação do sistema urinário superior humano, evidenciando os rins. Na figura pode-se observar o rim direito e esquerdo, a artéria renal (em vermelho), veia renal (em azul) e o ureter (em bege). FONTE: Adaptado de Fresenius Medical Care Ltda, 2020.

A melhor forma de avaliar o funcionamento renal é através da filtração glomerular (FG) (BASTOS et al., 2010). De acordo com a publicação *DIRETRIZES CLÍNICAS PARA O CUIDADO AO PACIENTE COM DOENÇA RENAL CRÔNICA – DRC NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE* do Ministério da Saúde (2014), a FG é calculada matematicamente e leva em consideração o sexo, a idade, etnia (negros/não negros) e o valor da creatinina sérica do paciente.

O documento intitulado *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI)*, da National Kidney Foundation Americana (NKF) definiu a DRC como uma lesão no parênquima renal, que leva à alterações histológicas ou de marcadores de lesão renal, com diminuição ou não da FG, por um período igual ou superior a três meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; BASTOS et al., 2010). De forma objetiva, a K/DOQI sugeriu alguns estágios de classificação para a DRC, indicados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Estágios da DRC, de acordo com a K/DOQI.

<b>Estágios</b>	<b>Características</b>	<b>FG</b>
1	Presença de Lesão Renal com FG normal ou aumentada	≥ 90
2	Presença de Lesão Renal com FG levemente reduzida	60 - 89
3	Presença de Lesão Renal com FG moderadamente reduzida	30 - 59
4	Presença de Lesão Renal com FG drasticamente reduzida	15 - 29
5	Falência Renal associada ou não com TRS	< 15

\*FG = Filtração glomerular; \*TRS = Terapia Renal Substitutiva

Em casos onde a DRC evolui e alcança a falência renal, é necessário o início de uma modalidade terapêutica denominada “Terapia Renal Substitutiva (TRS)”. A TRS é uma modalidade de tratamento oferecida para pacientes classificados no estágio 5 da DRC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Como o próprio nome sugere, esta é uma modalidade de substituição da função renal, podendo ser por hemodiálise, diálise peritoneal ou transplante renal. Esta última é considerada a mais completa alternativa de tratamento, pois melhora a rotina e aumenta a sobrevida dos pacientes, de modo geral (SBN, 2020).

Para se realizar um transplante no Brasil, o paciente deve ser inscrito na Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos (CNCDO), onde é realizado o seu Cadastro Técnico Único (CTU). Após ter a sua inscrição aceita, o paciente deve aguardar o órgão solicitado, que é distribuído de acordo com o Sistema de Lista Única do Ministério da Saúde. Entre janeiro e setembro de 2018 foram efetivados 6.419 transplantes de órgãos sólidos no Brasil, revelando um crescimento de 18% em 10 anos (RBT, 2018).

Especificamente para o transplante de rins, a fila de espera aumentou de 29.268 pacientes em 2016 para 31.266 em 2017, um crescimento de 6,8% em um ano. De

acordo com a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), o rim é o órgão mais solicitado visto que 64,8% dos pacientes da lista de espera para transplante aguardam por esse órgão, o que corresponde a 23.630 pacientes (ABTO, 2019).

A maioria dos rins destinados para transplante tem origem de doadores falecidos. No primeiro trimestre de 2020, cerca de 87% dos rins originaram desta fonte de doador (RBT, 2020). Entretanto, apenas nos Estados Unidos, do total de rins provenientes de doadores falecidos, mais de 2600 são descartados anualmente, devido a alterações anatômicas e outros fatores como atrofia tubular, mudanças vasculares, necrose cortical, fibrose intersticial, dentre outras.

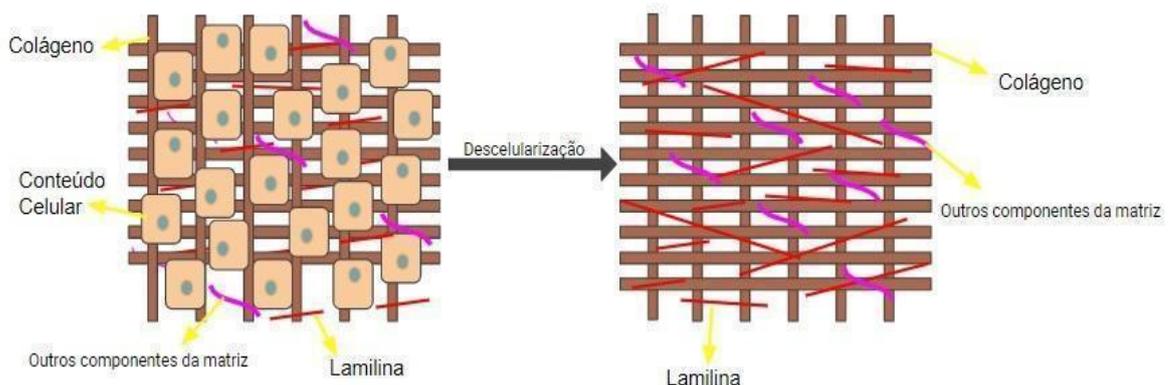
Esses dados revelam um grande problema, que é a alta demanda de rins para transplantes e o déficit de doadores, resultando numa fila de espera muito longa para os pacientes que sofrem com doenças renais. Outro problema é a dificuldade de encontrar doadores compatíveis, já que diversos fatores devem ser verificados entre o doador e o receptor, tais como tipagem sanguínea ABO, teste de ALH (Antígenos Leucocitários Humanos) e prova cruzada (realizada com linfócitos totais), além da investigação clínica e de exames físicos nos pacientes (SBN e SBU, 2006). Caso o paciente consiga realizar o transplante, ainda existe a possibilidade de ocorrer reações autoimunes, responsáveis pela rejeição do enxerto (FRIEND, 1995). Com o intuito de controlar as reações autoimunes, são administrados medicamentos imunossupressores. Esta manobra auxilia no tratamento e possibilita o contorno da rejeição, porém aumenta o risco de infecções, tornando necessária a administração concomitante de antibióticos de amplo espectro, dentre outros medicamentos (CONITEC, 2014).

Entretanto, cerca de 40 - 50% dos transplantes ainda são perdidos entre 10 e 12 anos após a cirurgia; o percentual restante sofre com efeitos colaterais relacionados à imunossupressão (BAAN et al., 2016). Neste contexto, a medicina regenerativa e a engenharia tecidual buscam alternativas capazes de solucionar esses desafios. Estudos sobre descelularização e recelularização de órgãos ampliaram as possibilidade de uso de tecidos e órgãos bioartificiais, principalmente quanto à aplicação em transplantes (DESTEFANI et al., 2017; CRAPO et al., 2011; SONG et

al., 2013), surgindo como alternativa promissora para diminuição do déficit de órgãos e das taxas de rejeição de transplantes (SCARRITT, PASHOS, BRUNNELL, 2015).

## 1.2 DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS

A descелularização de órgãos e tecidos é uma técnica da bioengenharia tecidual que objetiva retirar todo o componente celular do material enquanto preserva sua composição e estrutura, obtendo-se ao final um arcabouço bio-derivado (GILBERT et al., 2006; SOMUNCU, 2018). Este último é composto pela Matriz Extracelular (MEC) e possui a estrutura tridimensional do tecido/órgão original, destacando-se por suas propriedades não-imunogênicas e a capacidade de transmitir sinais de conexão para posterior realocação, propagação, sustentação e diferenciação celular (RANA et al., 2017).



**Figura 2.** Representação de um tecido antes e após o processo de descелularização. Fonte: próprio autor.

A MEC de alguns tecidos já está sendo estudada para aplicações clínicas como as de bexigas urinárias, válvulas cardíacas, pele, veias, nervos, entre outras (GILBERT et al., 2006; GILPIN e YANG, 2017). A técnica de descелularização deve ser ajustada para cada tipo de material biológico a ser trabalhado, já que a eficiência deste processo em diferentes órgãos e tecidos depende de características intrínsecas do

material, como, a espessura, composição, quantidade de lipídios, celularidade e densidade do material (CRAPO et al., 2011; GILBERT et al., 2006).

### 1.2.1 Métodos de Descelularização

Os métodos de descelularização podem ser divididos em químicos, enzimáticos e físicos; este último também pode ser denominado mecânico. Todos os métodos possuem o mesmo objetivo, remover o máximo de conteúdo celular e material genético do tecido, porém, nem sempre conseguem atingi-lo isoladamente. Os estudos normalmente realizam associações para obter maior eficiência na descelularização (SOMUNCU, 2019; BOURGINE et al., 2013). Cada tipo de agente descelularizante alterará a composição da matriz e causará a degradação da sua estrutura, portanto, é necessário o controle de cada processo, de modo que esse dano seja minimizado ao máximo (CRAPO et al., 2011).

Os métodos físicos são representados por procedimentos como congelamento, “thawing”, pressão, agitação, dentre outros. São capazes de romper as membranas celulares, porém, são insuficientes se utilizados isoladamente. Por isso, normalmente estão associados a outros métodos, principalmente os químicos (GILBERT et al., 2006).

Os métodos químicos utilizam ácidos, bases e surfactantes na descelularização. Os surfactantes são os mais comuns, e provocam o desarranjo da bicamada lipídica levando ao rompimento celular (GILPIN; YANG, 2017). Nesse grupo, o dodecil sulfato de sódio (SDS) se destaca. Diversos estudos, como os de Schmitt et al (2017), Remuzzi et al (2017), utilizaram esse surfactante e obtiveram remoção satisfatória do conteúdo genético de válvulas aórticas suínas e rins de ratos (GILPIN e YANG, 2017). Porém, alguns estudos demonstraram que o uso do SDS pode danificar a microestrutura da MEC, compactando as moléculas de colágeno e produzindo uma matriz mais fibrosa. Essas alterações podem interferir na qualidade e,

consequentemente, nos processos posteriores de repovoamento do arcabouço, sendo necessário a otimização do protocolo para que esse dano seja minimizado ao máximo (GILPIN; YANG, 2017; SCHMITT et al., 2017)

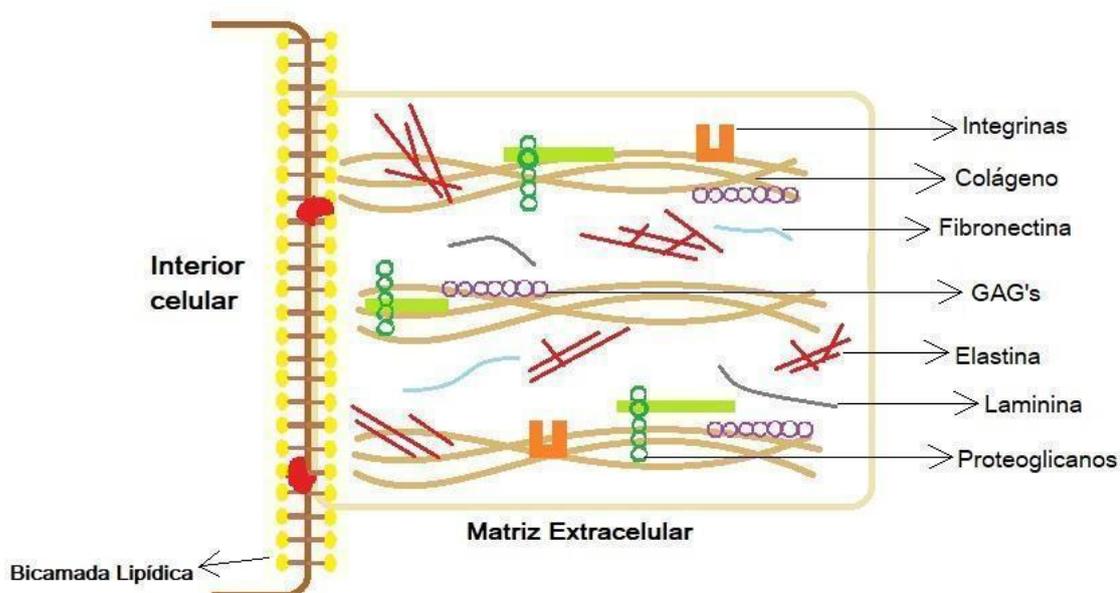
Os ácidos, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ácido peracético, agem provocando a degradação hidrolítica das biomoléculas, além de solubilizar as membranas celulares devido às suas cargas eletrônicas (CRAPO et al., 2011; GILPIN; YANG, 2017). Os resultados da descelularização por esses agentes demonstram aumento da rigidez do tecido e remoção dos glicosaminoglicanos (GAG's), portanto, não são comumente utilizados em tecidos que necessitam de expansibilidade (GILPIN; YANG, 2017). As bases possuem o mecanismo parecido com o dos ácidos, porém, podem remover totalmente os fatores de crescimento do tecido, assim como alterar as propriedades mecânicas do material por induzir cargas negativas nas moléculas de colágeno, separando ou rompendo suas cadeias (GILPIN; YANG, 2017; CRAPO et al., 2011).

Nos métodos enzimáticos, a tripsina é a enzima mais comumente utilizada. Esse método é capaz de romper as ligações peptídicas de proteínas ou entre uma proteína ligada a uma estrutura celular. Por não serem seletivos, podem afetar as proteínas da MEC, removendo moléculas de colágeno, laminina, fibronectina e GAGs, consequentemente alterando a ultraestrutura do material (BOURGINE et al., 2013).

### **1.3 A MATRIZ EXTRACELULAR**

Os tecidos e órgãos biológicos são constituídos por células e componentes não celulares. Estes se organizam e formam uma estrutura denominada Matriz Extracelular (MEC), classificada em dois tipos: Intersticial e pericelular. A MEC intersticial é aquela que rodeia as células, normalmente em maior quantidade, enquanto a pericelular é a que está em contato direto com as células, como por exemplo a membrana basal celular (THEOCHARIS et al., 2016).

A MEC é resultado da secreção das células residentes no tecido e está em reciprocidade com elas, sendo responsável por características físicas do material, como sua bioconformação, rigidez e sustentação das células, além de ser capaz de regular processos de crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência, homeostase e morfogênese celular (CRAPO et al., 2011; THEOCHARIS et al., 2016). As moléculas que a constituem (vide Figura 3) podem ser divididas em duas classes, polissacarídeos de cadeia e proteínas fibrosas. Como exemplo, estão os glicosaminoglicanos e o colágeno, respectivamente (DESTEFANI et al., 2017; THEOCHARIS et al., 2016).



**Figura 3.** Componentes da Matriz Extracelular. Fonte: próprio autor.

Essa variedade de moléculas é diferente em cada tecido, porém, a composição das moléculas permanece, sofrendo pouca ou nenhuma modificação, característica que permite às MECs serem bem toleradas quando submetidas a transplantes ou xenotransplantes (BADYLAK et al., 2009; CRAPO et al., 2011). Hoje existem alguns materiais em uso clínico derivados de MEC, como derme, bexiga urinária, intestino delgado, pericárdio, válvulas cardíacas, dentre outras (CRAPO et al., 2011).

Nos rins, a MEC é diversificada em cada região do órgão. No caso da região intersticial, a composição é variada, entretanto, predominam-se moléculas de colágeno do tipo I, III, V, VI, VII e XV, além de glicosaminoglicanos sulfatados e não-

sulfatados, glicoproteínas e polissacarídeos (GENOVESE et al., 2014; DESTEFANI et al., 2017). Já na membrana basal glomerular, que é responsável por filtrar os componentes indesejáveis do sangue para região urinária, os componentes principais da MEC são laminina, colágeno do tipo IV, proteoglicanos do tipo heparan sulfato e nidogênio (GENOVESE et al., 2014; SUH e MINER, 2013).

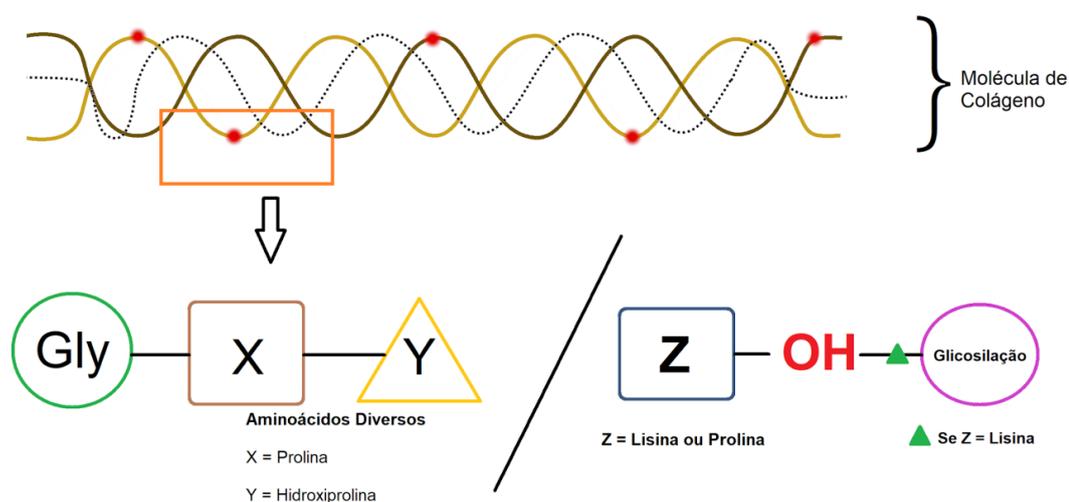
Diante da grande variedade na composição das MEC, é inevitável que após o processo de descelularização a MEC original tenha sua composição alterada, produzindo assim um biomaterial diferente, porém com composição semelhante à nativa. Portanto, para se garantir a qualidade do arcabouço, alguns parâmetros devem ser avaliados, dentre eles estão a verificação da eficiência da remoção do conteúdo celular e genéticos, a preservação das proteínas de matriz, e a manutenção das propriedades mecânicas do material (GILBERT et al., 2006).

### 1.3.1 Colágeno

No organismo humano, a quantidade de colágeno representa 30% das proteínas totais. Sua produção é feita, majoritariamente, por fibroblastos (THEOCHARIS et al., 2016). A organização das fibras colágenas tem relação direta com a características biomecânicas do tecido. Alguns tipos de colágeno podem se associar e formar estruturas denominadas, fibrilas, fibras e feixes. Por exemplo, no caso de tecidos como tendões, as fibras tendem a ser alongadas e alinhadas em relação ao eixo do material, conferindo a ele alta resistência e força mecânica (BADYLAK et al., 2009). Entretanto, essas características mecânicas não são as únicas funções desta molécula, mas também demais eventos, como migração, diferenciação e adesão celular, quimiotaxia, dentre outras (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2001; THEOCHARIS et al., 2016).

A molécula de colágeno é composta por três cadeias  $\alpha$ , trançadas de forma helicoidal, formando uma tripla hélice. As três cadeias são denominadas como  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ ,

entretanto, uma molécula de colágeno pode ter mais de uma cadeia  $\alpha$  igual, como no caso do colágeno I. As cadeias  $\alpha$  são compostas por sequências de aminoácidos, em sua maioria, repetições de uma trinca constituída pela glicina (Gly) ligada a mais dois aminoácidos. Os mais comuns são a prolina e hidroxiprolina, como representado na Figura 4 (ROBERTIS e HIB; 2006; THEOCHARIS et al., 2016). Por essa variedade estrutural, existem 28 tipos de colágeno descobertos. O colágeno do tipo I é o mais abundante na maioria dos tecidos e está presente nos ossos, na derme e nos tendões (THEOCHARIS et al., 2016).



**Figura 4.** Representação da molécula de colágeno e suas ligações peptídicas. Fonte: próprio autor.

Algumas alterações na molécula são importantes do ponto de vista estrutural e fisiológico, como a hidroxilação da lisina e da prolina. No caso da hidroxilação da prolina, o resultado é a estabilização da estrutura da molécula, enquanto a da lisina é importante para a ocorrência de glicosilações, formações de galactosilidroxilisina, glicosilgalactosilidroxilisina e derivado aldeídico hidroxilisina. Este último é muito importante para formação das ligações cruzadas do colágeno com a MEC e outras moléculas (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2001).

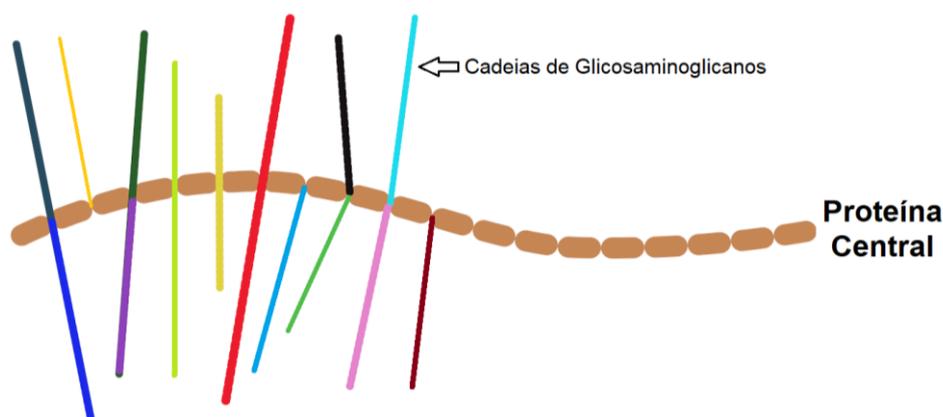
As ligações intermoleculares também estão presentes e, uma muito importante, é a ligação do hidrogênio da cadeia lateral da glicina entre aminoácidos das demais

cadeias  $\alpha$ . Essa ligação aproxima as cadeias, o que favorece o empacotamento e a formação da tripla hélice (THEOCHARIS et al., 2016).

### 1.3.2 Proteoglicanos e Glicosaminoglicanos

Os proteoglicanos (PG) são moléculas constituídas por uma proteína central, ligada a uma ou mais moléculas de GAG's, vide figura 5. São classificados em quatro tipos, de acordo com a sua localização. Os PG intracelulares, de superfície celular, pericelulares e extracelulares (THEOCHARIS et al., 2016). São moléculas de alto peso molecular, negativamente carregadas e hidrofílicas. Essas características associadas criam um microambiente rico em íons e de viscosidade alterada. Por outro lado o aumento da viscosidade cria uma substância de consistência gelatinosa, onde as proteínas fibrosas estão imersas (ALBERTS et al., 2002).

A consistência parecida com a de um gel confere ao local onde os PG estão, resistência a forças de compressão. A porosidade do gel é importante para facilitar o transporte de substâncias, além de permitir o transporte de nutrientes, hormônios, metabólitos, dentre outras substâncias entre o sangue e as células dos tecidos (ALBERTS et al., 2002).



**Figura 5.** Representação de uma molécula de proteoglicano. Fonte: próprio autor.

Os GAGs são polissacarídeos não-ramificados. Estruturalmente são compostos por repetições de um tipo de dissacarídeo específico. A estrutura dissacarídica normalmente é composta por um ácido urônico (ácido glicurônico ou idurônico), que pode ser ou não sulfatado, e um amino açúcar (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina) (ALBERTS et al., 2002; THEOCHARIS et al., 2016). Essas moléculas são tidas como as mais aniônicas produzidas por células animais (ALBERTS et al., 2002).

Existem seis tipos de GAG: Ácido hialurônico (HA), galactosaminoglicanos sulfato de condroitina e dermatan sulfato, glicosaminoglicanos heparan sulfato, heparina e keratan sulfato (THEOCHARIS et al., 2016). O HA é o único GAG que possui todas as unidades dissacarídicas idênticas (D-ácido glicurônico e N-acetil-D-glicosamina) e não sulfatadas, além disso, não se liga, majoritariamente, a uma proteína central. É produzido por um complexo enzimático localizado na membrana celular e é o constituinte principal da matriz pericelular de vários tipos celulares (ALBERTS et al., 2002; THEOCHARIS et al., 2016).

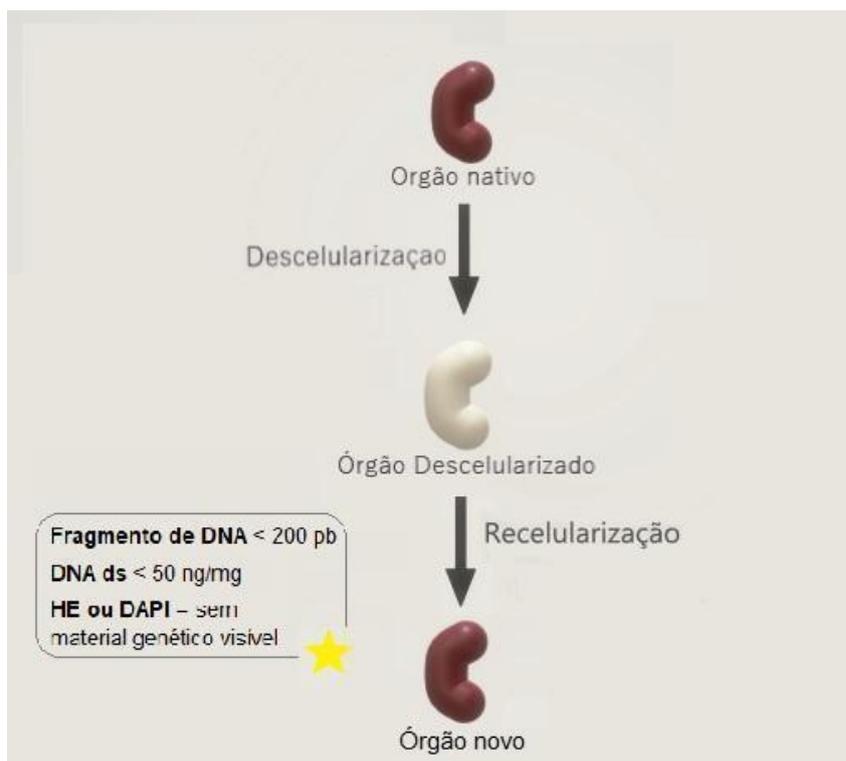
#### 1.4 ANÁLISE DO ARCABOUÇO DESCELULARIZADO

Após a descelularização algumas características devem ser avaliadas no arcabouço. De acordo com Crapo et al (2011), os critérios mínimos para se considerar uma descelularização satisfatória são: quantidade de DNA residual fita dupla inferior a 50 ng.mg<sup>-1</sup> de MEC seca, fragmentos inferiores a 200 pares de base (pb) e coloração com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ou hematoxilina e eosina (HE), sem visualização de material genético. Outros autores descrevem que a redução acima de 90% do DNA total é suficiente para que a descelularização seja considerada satisfatória (SONG et al., 2013; GILPIN E YANG, 2017; SHIRAKIGAWA e IJIMA, 2017). A divergência na expressão dos resultados entre os pesquisadores é clara, e a forma como é feita a normalização dos resultados também gera controvérsias. Já foram

encontradas na literatura cerca de 11 formas de normalização dos resultados de DNA, sendo os principais a expressão na forma de peso de DNA por tecido úmido ou tecido seco (BRUYNEEL e CARR, 2017).

Além do material genético, Parmaksiz et al (2016) enfatiza a importância da manutenção dos componentes da MEC, como dos diferentes tipos de colágeno, glicosaminoglicanos e fatores de crescimento celular (ex. Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- $\beta$ )), pois desempenham um papel essencial no desenvolvimento do novo órgão/tecido bioartificial. Entretanto, cerca de 48% dos artigos não expressam quantitativamente a preservação da MEC, expondo apenas resultados de histologia (BRUYNEEL e CARR, 2017).

Os critérios de qualidade citados anteriormente visam garantir a eficiência da reconstrução tecidual na etapa de recelularização (Figura 6), produzindo um órgão funcional não imunogênico (GILBERT et al., 2006; DESTEFANI et al., 2017). Entretanto, esses critérios de qualidade não podem ser aplicados sem ocasionar a destruição parcial ou total do tecido, portanto, ao término da descelularização desses casos, avalia-se apenas se o material está translúcido, com aparência límpida e se possui a rede vascular preservada (GUYETTE et al., 2014; PEREIRA et al., 2019). Por isso, protocolos buscam otimizar suas metodologias para garantir a reprodutibilidade dos resultados do material biológico que seguirá para as etapas que visam o uso clínico (GUYETTE et al., 2014).



**Figura 6.** Etapas para o procedimento de recelularização. Fonte: próprio autor.

Entretanto, os parâmetros de reprodutibilidade e previsibilidade da eficiência da descelularização são influenciados diretamente por fatores individuais do material (KAWECKI et al., 2017). Por isso, a garantia destes parâmetros ainda é um desafio para as pesquisas de descelularização de órgãos e tecidos. Desta forma, não existe ainda um método capaz de avaliar se uma descelularização foi satisfatória em órgãos intactos destinados à recelularização (PEREIRA et al., 2019). Este fato gera um novo desafio, já que não faltam evidências de que materiais residuais celulares geram respostas adversas no hospedeiro e diminuem ou interrompem completamente o remodelamento tecidual construtivo nos arcabouços descelularizados *in vivo* e provocam problemas de citocompatibilidade *in vitro*. (CRAPO et al., 2011).

O material genético residual foi descrito como um fator determinante para desencadear respostas imunes no hospedeiro (CRAPO et al., 2011; KAWECKI et al., 2017; KEANE et al., 2011). O estudo de Keane et al (2011) analisou a consequência da descelularização ineficiente da submucosa de intestino delgado suíno e concluiu que a presença de DNA remanescente e de *debris* celulares ocasionaram resposta

inflamatória, na grande maioria mediada por macrófagos. Entretanto, após 28 dias no experimento, onde se observou menor quantidade de material genético residual, os macrófagos estavam bem distribuídos e em menor quantidade no tecido, indicando a possível diminuição da resposta pró-inflamatória.

Diante desses fatos, é evidente a necessidade de estudos a fim de desenvolver metodologias que consigam analisar esses parâmetros e, assim, garantir a qualidade e reprodutibilidade de cada descelularização. É neste contexto que este trabalho busca se diferenciar dos demais. Espera-se que com o uso de um sensor óptico consiga-se padronizar a avaliação de arcabouços descelularizados, através de um acompanhamento simultâneo do processo, utilizando as propriedades ópticas dos tecidos biológicos para registro e, mediante cálculos estatísticos, correlacioná-los de modo a obter informações sobre a qualidade final do material. Este método, além de ser de baixo custo, interfere minimamente no objeto de estudo e proporciona dados de cada etapa realizada, em tempo real.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir registros gráficos do processo de descclularização renal em sistema de sensoriamento óptico, com o intuito de relacioná-los à qualidade final do arcabouço descclularizado.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proceder à descclularização de rins no interior do sistema óptico, de modo a produzir registros gráficos individuais;
- Realizar análises histológicas de rins nativos e descclularizados;
- Realizar dosagens de DNA e Colágeno em amostras nativas e descclularizadas.
- Definir um modelo matemático capaz de modelar as curvas de tensão produzidas pelo sistema de monitoramento óptico;
- Avaliar se as estimativas dos parâmetros  $A_2$ ,  $p$  e  $X_0$  se correlacionam com o DNA remanescente tecidual.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados 16 ratos adultos *Wistar*, fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde localizado no campus da UFES em Maruípe (Vitória-ES), com 60 a 90 dias de vida, com massa média de  $301,8 \pm 44,6$  g. Os animais foram mantidos em gaiolas em ambiente com regime de ciclo claro/escuro (12h/12h), com temperatura e umidade controladas, água e ração comercial para animais experimentais *ad libitum*.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA), tendo o nº de registro 01/2020.

#### 3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

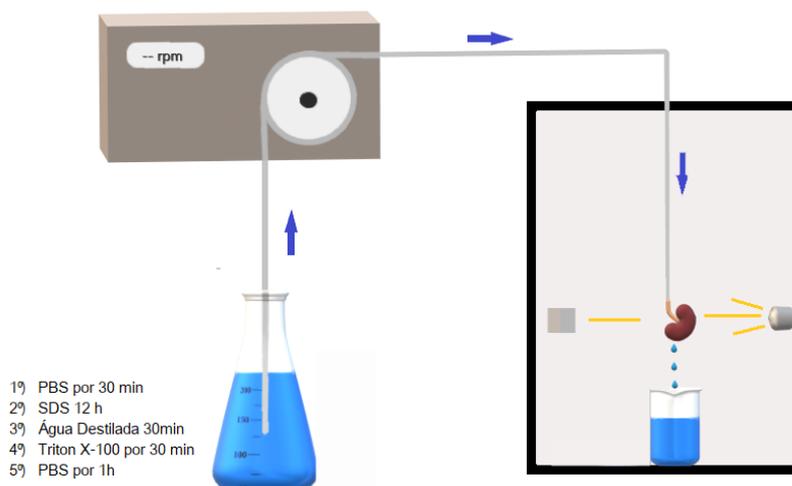
Os animais foram anestesiados com sobredose de solução anestésica de Quetamina (100 mg/kg Ketamine-Vetnil®) e Xilazina (10mg/kg Rompun-Bayer®), administrados por via intraperitoneal (i.p.). Após a completa indução anestésica, os animais foram heparinizados (25 U.I.) e realizou-se a laparotomia seguida de nefrectomia. Um rim foi destinado imediatamente para a descélularização e o segundo armazenado para as demais análises do estudo (quantificação de DNA e colágeno e histologia).

### 3.3 PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO

Após a remoção cirúrgica, os rins foram acoplados ao sistema de monitoramento óptico pelo canhão de uma agulha sem bisel, fixada na artéria renal. Deste modo, foram posicionados entre o fotodiodo e a fonte luminosa (LED), permanecendo centralizado entre estes dois módulos. A descelularização foi realizada segundo o protocolo de Guyette et al (2014).

As soluções foram perfundidas com o auxílio de uma bomba peristáltica (Gilson ®). Inicialmente, realizou-se a perfusão de Tampão Fosfato-salino ou *Phosphate Buffered Saline* (PBS, pH 7,4) por 30 minutos (min), seguido pela perfusão de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1% por 12 horas (h), um detergente iônico comumente utilizado em descelularização que atua como um surfactante, rompendo as membranas celulares. Após este tempo, foi perfundido água destilada seguida de solução de Triton X-100 (1% v/v), por 30 min cada. Ao final, o órgão foi submetido a 1h de perfusão com PBS (Figura 7).

Durante todo o processo, a pressão foi regulada para os níveis fisiológicos, permanecendo entre 80 - 120 mmHg. Os órgãos foram identificados e armazenados em freezer a -80°C para os procedimentos de dosagens de DNA e colágeno. Para a análise histológica, foram fixados em solução de Paraformaldeído 4% em PBS (pH 7,4), a 4°C.



**Figura 7.** Representação do protocolo utilizado para a descelularização. Fonte: próprio autor.

### 3.4 O SISTEMA DE SENSORIAMENTO ÓPTICO

O sistema de sensoriamento óptico é um equipamento eletrônico desenvolvido por Pereira et al (2019), capaz de isolar a luz do ambiente e avaliar o processo de descelularização pelo padrão óptico de cada órgão. A Figura 8 representa esquematicamente o equipamento.

O sensor possui dois módulos, uma fonte luminosa (composta por um LED - *Light emitting diode*) e um sistema de aquisição de dados, desenvolvido em parceria com o Departamento de Engenharia de Controle e Automação do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES- campus da Serra-ES), composto por um fotodiodo (fotodetector com intervalo espectral de 320 nm a 1100 nm) e uma placa de prototipagem de *hardware* livre e de placa única, conectada a um computador.



**Figura 8.** O sistema de sensoriamento óptico. A fonte luminosa de LED (1) posicionada diametralmente ao Fotodiodo (2). A Placa de prototipagem (3) está localizada no lado direito externo da câmara do Sensor e está conectada a um computador por uma porta USB. Fonte: próprio autor.

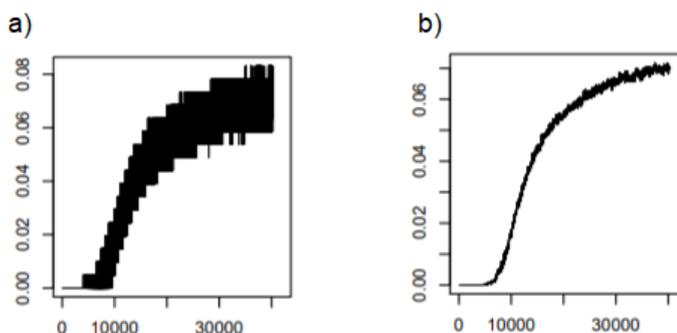
A parte central interna do sensor possui um suporte fixo, onde o órgão é acoplado para a perfusão dos reagentes. Numa das paredes laterais está posicionada

paralelamente ao órgão a fonte luminosa e, do lado oposto encontra-se o fotodiodo, suportado por uma base ajustável nos três eixos x, y e z, de modo a facilitar seu alinhamento com o órgão. A placa de prototipagem está localizada na parede externa do equipamento, conectada a um computador através de uma porta USB.

Os fótons captados pelo fotodetector são processados pela placa de prototipagem e convertidos em valores de tensão que são registrados utilizando o software Matlab®, que os representa na forma de voltagem (v) versus o tempo (s), graficamente. Estes registros são feitos durante todo o período do experimento e para cada descelularização, individualmente.

### 3.5 ESTATÍSTICA

As análises de DNA e Colágeno foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® 8. Foi aplicado o teste *t* de Student não pareado para a comparação entre os grupos, e os resultados foram considerados significativos quando  $*p < 0,05$ . Para a tensão registrada ao longo do tempo, foram calculadas médias móveis a cada 100 registros, com o intuito de produzir curvas suavizadas. Esse tratamento permitiu gerar gráficos com menos ruídos, sem alterar o padrão de cada descelularização (Figura 9).



**Figura 9.** Exemplo de registro de tensão, feito pelo sistema de monitoramento óptico. **(a)** Curva de D11, sem tratamento estatístico **(b)** Curva de D11, após o tratamento estatístico.

Para a análise da tensão suavizada, foi ajustado o modelo logístico de regressão com quatro parâmetros utilizado em Pereira et al (2019) e descrito por Gadagkar e Call (2000), de curva em S, definido a seguir:

$$y = \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^s} + A2$$

Sendo os quatro parâmetros definidos como: tensão inicial (**A1**); assíntota máxima ou tensão máxima (**A2**); **s** corresponde à inclinação da curva, e **x0** ao ponto de inflexão entre os valores de tensão mínima e máxima, sendo a relação entre essas variáveis igual a tensão típica (**y**), expressa em voltagem (v) x tempo (s).

Esse modelo não linear foi ajustado pelo método de mínimos quadrados (Bates e Chambers, 1992), utilizando-se o comando nls do programa estatístico R (R software®).

### 3.6 ANÁLISE HISTOQUÍMICA

Os órgãos fixados na solução de Paraformaldeído 4% em PBS foram cortados em pequenos fragmentos. Inicialmente, as amostras passaram pela etapa de desidratação. Esta etapa foi realizada em tubos *ependorf*, onde o material foi submerso em solução de álcool etílico 70° *overnight*. No dia seguinte, prosseguiu-se com dois banhos sequenciais em álcool etílico 95° e quatro banhos em álcool absoluto, com tempo de 30 minutos cada.

A segunda etapa é de inclusão do tecido. Para isto, utilizou-se Histoiresina histológica (Histoiresin Embedding Kit - Jung, Germany). O tecido desidratado foi acondicionado em solução 1:1 de álcool etílico absoluto e histoiresina 2-hidroxietil metacrilato

(Solução A) por 12 h sob refrigeração (entre 4 - 8°C). Passado este tempo, o material foi imerso em Solução A pura por 24 horas, sob refrigeração.

Para a preparação dos blocos de histologia, as amostras foram adicionadas em formas plásticas contendo a Solução A acrescida de solução para solidificação (Solução B - Hardner), de acordo com especificações do fabricante. Os blocos foram aderidos a cortes cilíndricos de madeira e seguiram para a microtomia, onde utilizou-se um micrótomo manual (Leica Biosystems, German) e obtiveram-se cortes de 5 µm de espessura. Os cortes foram aderidos em lâminas de vidro e ficaram em repouso por 24h, antes da coloração.

### 3.6.1 Coloração por Hematoxilina e Eosina

As lâminas histológicas foram submersas em hematoxilina de Harris por 3 min, e em seguida procedeu-se a lavagem em água corrente por 10 min. Adicionou-se o segundo corante, eosina hidroalcoólica, por 5 min e repetiu-se o procedimento de lavagem em água corrente por 10 min. A secagem foi feita em estufa (37 °C por 24h), seguida por montagem em p-xylene-bis-(N-pyridinium bromide) (DPX, Sigma-Aldrich).

### 3.6.2 Coloração por Picrossírus

As lâminas histológicas foram submersas em corante Picrossírus e incubadas em estufa (37°C) por 24h. No dia seguinte, foram retiradas e realizou-se o procedimento de lavagem, em água corrente, até a remoção do excesso de corante. A secagem foi feita em estufa (37 °C por 24h), seguida por montagem em DPX (Sigma-Aldrich).

### 3.7 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A quantificação do DNA de cada grupo foi realizada segundo o protocolo de extração salina descrito anteriormente por Bruford et al (1992). Os rins foram retirados do freezer a -80°C, liofilizados e retornaram ao freezer a -80°C até o momento da análise. Ao serem retirados, foram cortados em pequenos fragmentos de, aproximadamente, 10 mg. Os fragmentos foram colocados em tubos microtubos estéreis de 1,5 mL contendo 410 µL *Buffer* de extração (1% TRIS - 1M, 2% NaCl - 5M, 2% EDTA - 0,5M e água ultrapura), 80 µL de SDS 10% e 10 µL de Proteinase K (20 µg.µL<sup>-1</sup>), incubados a 55 °C, overnight.

No dia posterior, os tubos foram centrifugados a 13.700 rpm, e cada sobrenadante foi transferido para novos microtubos estéreis contendo 180 µL de solução de NaCl (5M). Após homogeneização foram centrifugados a 13.700 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos de 1,5 mL estéreis, contendo 800 µL de isopropanol (previamente refrigerado a -20°C). Repetiu-se a etapa de homogeneização e centrifugação. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 250 µL de etanol 80° ao precipitado. O tubo foi homogeneizado e centrifugado a 13.700 rpm, descartou-se o sobrenadante, e o etanol residual foi retirado por evaporação em estufa estéril a 55°C por 30 min.

Os pellets do grupo controle controle e descelularizado foram ressuspensos em 100 µL de água ultrapura e armazenados sob refrigeração (4 - 8°C). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop<sup>®</sup> 2000 - Therm Scientific) e a concentração final de DNA expressa em ng por peso total liofilizado.

### 3.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DE HIDROXIPROLINA

A análise quantitativa de hidroxiprolina teve seu protocolo adaptado e realizado baseando-se em trabalhos previamente descritos na literatura, de EDWARDS e O'BRIEN (1980) e REDDY e ENWEMECA (1996).

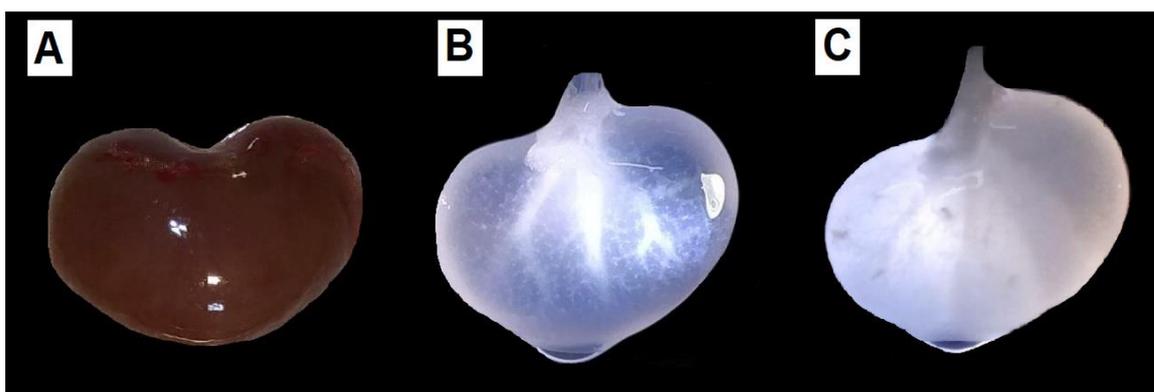
Foi confeccionada uma curva padrão de hidroxiprolina por diluição seriada, com intervalo de concentrações entre 4,8 e 78,12  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para o branco, utilizou-se água destilada. Foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de cada concentração em eppendorfs de 2 mL, contendo 450  $\mu\text{L}$  de Cloramina T (0,0025 M). Os microtubos permaneceram em repouso por 30 minutos, seguidos por adição de 500  $\mu\text{L}$  do Reagente de Erlich (0,5 M) e repouso em banho maria (60°C) por 15 minutos.

Os fragmentos dos rins liofilizados foram transferidos para tubos falcon de 15 mL contendo 50  $\mu\text{L}$  de solução de NaOH (7 M), para hidrólise. Como branco, foi utilizado apenas 50  $\mu\text{L}$  de NaOH (7 M). Posteriormente, adicionou-se em cada tubo 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3,5 M). A partir da solução anterior, alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  foram retiradas e transferidas para novos eppendorfs, contendo 450  $\mu\text{L}$  de Cloramina T (0,0025 M), onde reagiu por 25 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  do reagente de Erlich (0,5 M) a cada microtubo, que seguiram para o banho maria (60°C), por 15 minutos.

Finalmente, foi realizada a leitura em triplicatas de cada amostra e da curva padrão, no comprimento de onda de 560 nm, em espectrofotômetro (Varioskan Flash Model, Thermo Fisher). Os valores de absorbância obtidos foram utilizados na equação da reta  $Y = 0,02241 \cdot X + 0,04447$ , onde X corresponde à concentração de hidroxiprolina e Y à absorbância. Assim, determinou-se a concentração do aminoácido em cada amostra.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aspecto visual renal antes e após a descclularização estão exemplificados na Figura 10. Os órgãos selecionados para o estudo tinham aspecto homogêneo, translúcido e a rede vascular preservada (Figura 10B). Em casos onde ocorreram a modificação desses aspectos, o rim foi excluído do estudo (Figura 10C). A eficiência da descclularização depende de vários fatores que podem ser relacionados ao tecido/órgão escolhido, como o tamanho, forma, rigidez, celularidade, complexidade, morfologia vascular, dentre outros ou ao procedimento, como o tipo de método de descclularização, a pressão de perfusão, tempo, concentração dos reagentes, profundidade da cânula, etc. Esta variedade de fatores torna cada descclularização única (CRAPO et al., 2011; KAWECKI et al., 2017; GUYETTE et al., 2014).



**Figura 10.** Aspecto visual do rim de rato adulto Wistar antes e após o processo de descclularização: A) aspecto de um rim nativo. B) aspecto de um rim descclularizado, selecionado para o estudo. C) aspecto de uma descclularização incompleta renal.

Apesar da utilização do mesmo protocolo, pequenas alterações durante a descclularização pode gerar diferentes resultados. O estudo de Crawford et al (2012) demonstrou a importância do fluxo e da pressão durante a descclularização de corações de ratos, onde o aumento de ambas melhorou a eficiência do processo. Em Guyette et al (2014) foi demonstrado que a descclularização, em diferentes órgãos

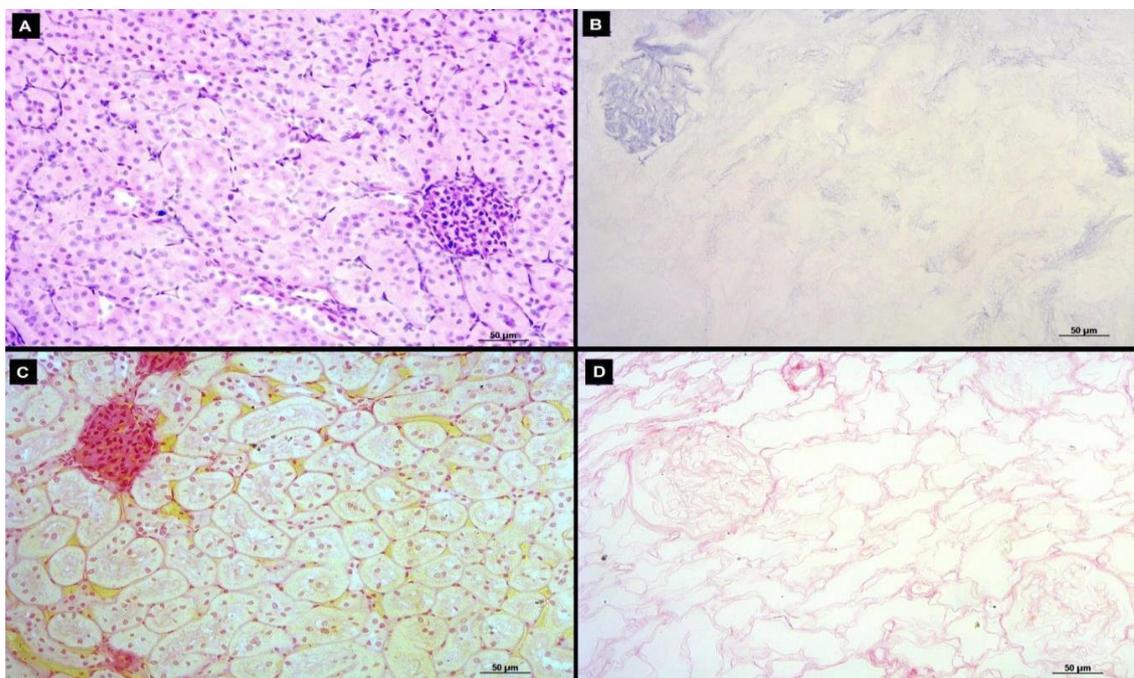
apesar da utilização dos mesmos reagentes, pode ser mais rápida (em pulmão, cerca de 2h) ou lenta (coração e rim, cerca de 12h). Estes fatores associados a diferenças anatômicas, presença de microcoágulos derivados de uma heparinização mal sucedida, dentre outros, podem modificar o resultado da descclularização, que pode ser observado pela mudança do aspecto visual do órgão (como exemplificado na Figura 10C) (CHOI et al., 2014) ou detectadas apenas na etapa de quantificação de DNA do material (PARTINGTON et al., 2013).

#### 4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As análises histológicas dos rins nativos e descclularizados foram realizadas por coloração de H&E e Picrossírius (Figura 11). A análise por H&E evidenciou estruturas renais e a MEC. Os núcleos celulares estão destacados pela coloração roxo/azulada e a MEC pela coloração rosada (Figura 11A). A ausência de núcleos no grupo descclularizado foi confirmada (Figura 11B), assim como a preservação da MEC intersticial e a glomerular. Diversos autores obtiveram resultados semelhantes, apesar da utilização de diferentes protocolos (BONANDRINI et al., 2014; SCHMITT et al., 2017; CHANI et al., 2016). Por outro lado, Caralt et al (2016) testaram diferentes protocolos de descclularização renal e verificou a presença de núcleos na histologia no grupo que utilizou apenas Triton X-100, indicando uma descclularização ineficaz. Vale ressaltar que a utilização isolada de SDS tem gerado resultados controversos e demonstrado efeito deletério sobre a MEC compactando as moléculas de colágeno e removendo significativamente os GAGs (POORNEJAD et al., 2016; GILPIN e YANG, 2017).

A escolha do método de descclularização depende do tecido/órgão. Em casos de órgãos complexos e densos como o rim, normalmente opta-se pelo uso de detergentes mais fortes como o SDS ou a combinação de detergentes, buscando a

remoção completa dos debris celulares e moléculas imunogênicas (GILBERT et al., 2006; GILPIN e YANG, 2017; DESTEFANI et al., 2017).



**Figura 11.** Imagem de microscopia óptica do tecido renal corado por H&E (A e B) e Picrosirius (C e D). As figuras A e C representam o tecido nativo, enquanto B e D correspondem ao descelularizado.

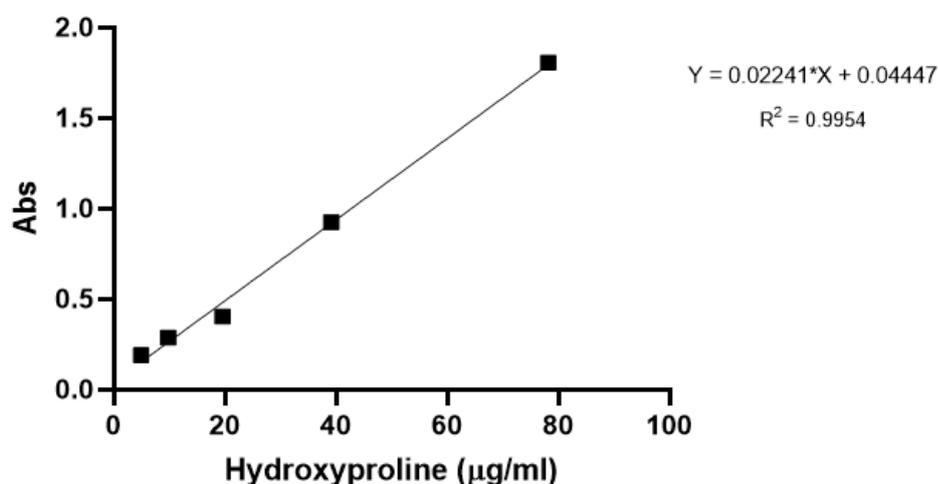
A coloração por Picrosirius é utilizada para a avaliação do colágeno tecidual, no que diz respeito à sua preservação e disposição no tecido. O rim nativo corado por Picrosirius (Figura 11C) revela uma matriz rica em colágeno (localizado entre as bordas celulares e com cor avermelhada), e o glomérulo parece possuir uma rede molecular mais emaranhada, adquirindo uma coloração mais forte. Após a descelularização (Figura 11D), observa-se a preservação das fibras colágenas.

O colágeno é uma molécula com grande variedade estrutural, porém, o tipo I é o mais abundante nos tecidos (THEOCHARIS et al., 2016). A MEC renal intersticial é rica em colágeno tipo I, III, V, VI, VII e XV, enquanto a glomerular, em colágeno tipo IV (DESTEFANI et al., 2017). Estas moléculas são importantes para processos de diferenciação, migração e proliferação celular (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL,

2001; THEOCHARIS et al., 2016). Portanto, é de extrema importância que a descelularização não remova este componente de forma significativa.

## 4.2 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO

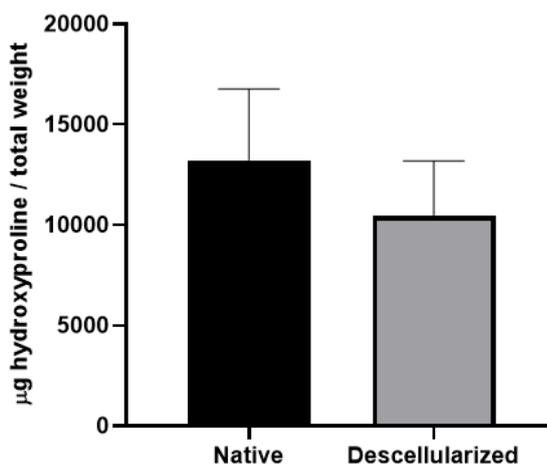
A hidroxiprolina é um aminoácido presente em poucas proteínas, porém está em grande quantidade nas moléculas de colágeno. Nesta molécula, a hidroxiprolina compõe as cadeias  $\alpha$ , sendo um dos fatores principais responsáveis pela estrutura secundária. Por isso, sua quantidade pode ser relacionada diretamente com a quantidade de colágeno. Foi elaborada uma curva padrão de hidroxiprolina (Figura 12), com concentrações entre 4,8 e 78,12  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $R=0,9954$ ). Após a análise espectrofotométrica, calculou-se a concentração em cada amostra nativa ( $n = 5$ ) e descelularizada ( $n = 4$ ).



**Figura 12.** Curva padrão de hidroxiprolina.

Como sugerido anteriormente pela coloração de picrossírus, confirmou-se que não houve diferença significativa entre a quantidade de colágeno do grupo nativo ( $13222 \pm 3537 \mu\text{g/peso seco total}$ ) e descelularizado ( $10433 \pm 2741 \mu\text{g/peso seco total}$ )

(Figura 13). Este dado demonstra que mesmo após a descclularização ocorreu a preservação do colágeno tecidual, como também demonstram os resultados de Song et al (2013) e Bonandrini et al (2014), que avaliaram a manutenção desta proteína por imunohistoquímica e confirmaram a similaridade entre o tecido nativo e o descclularizado.

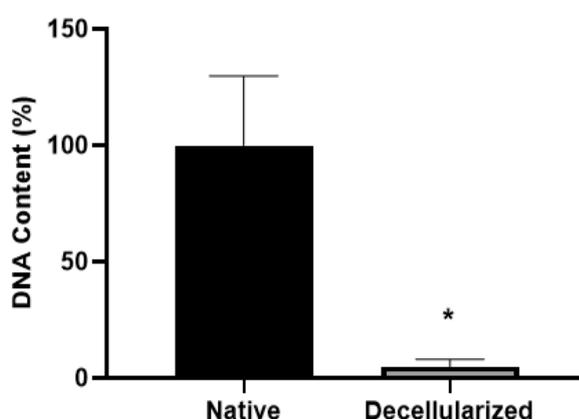


**Figura 13.** Quantificação de hidroxiprolina representados em µg/peso total renal liofilizado. Valores médios ± DP. (NS,  $p=0,2376$ ).

O SDS é um detergente aniônico e tem sido utilizado em muitos estudos de descclularização renal (SONG et al., 2013; CARALT et al., 2015; SCHMITT et al., 2017; CHANI et al., 2017). Por ser um detergente forte, indica a dificuldade encontrada para a remoção dos materiais celulares neste órgão (SHIRAKIGAWA e IJIMA, 2017). Estudos onde a descclularização com SDS afetou a estrutura da MEC de rins suínos, como o de Choi et al (2014) e Poornejad et al (2016), utilizaram concentrações de 1% e 0,5%, respectivamente, por um tempo muito superior ao de nosso estudo (DESTEFANI et al., 2017). O efeito deste detergente sobre a matriz extracelular é controverso. Outros estudos também demonstraram que a descclularização por este agente químico ocasionou perdas significativas de proteínas de matriz em córneas e válvulas aórticas suínas (GONZÁLEZ-ANDRADES et al., 2015; SAMOUEILLAN et al., 1999; KASIMIR et al., 2003). Apesar destes resultados, demonstramos em nosso estudo que a utilização deste detergente não reduziu significativamente a quantidade do colágeno tecidual renal.

### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Os resultados de quantificação de DNA mostraram uma redução de cerca de 95% do DNA total das amostras descelularizadas frente às nativas, sendo a porcentagem média de DNA residual no grupo descelularizado de 4,91% (Figura 14). Nosso resultado corrobora com resultados demonstrados na literatura por Song et al (2013) e Caralt et al (2015), que utilizaram semelhantemente o surfactante SDS em seus protocolos de descelularização e reduziram o percentual de DNA total para menos de 10% e 5%, respectivamente.



**Figura 14.** Gráfico de barras de porcentagem de DNA no tecido renal liofilizado nativo e descelularizado. Valores médios  $\pm$  DP. Nativo:  $100 \pm 29,87$  (n = 8), Descelularizado:  $4,91 \pm 3,14$  (n = 12) \*p < 0,0001.

É improvável que uma descelularização consiga remover 100% do material genético (GILBERT et al., 2009; KAWECKI et al., 2017; GARCÍA-GARETA et al., 2020). Por isso, a quantidade limite de DNA remanescente não é um consenso entre os pesquisadores (SHIRAKIGAWA e IJIMA, 2017). Diversos estudos sobre descelularização (SONG et al., 2013; CARALT et al., 2015; CHANI et al., 2017; GEERTS et al., 2016) expressam os resultados de forma diferente do que foi descrito por Crapo et al (2011), onde sugeriu-se que em tecidos descelularizados o DNA residual deveria ser inferior a  $50 \text{ ng.mg}^{-1}$  de MEC seca. Alguns estudos sugerem que

não existe evidência suficiente para considerar este critério e que a remoção acima de 90% do DNA total sugere uma descelularização bem sucedida (SONG et al., 2013; GILPIN e YANG, 2017; GARCÍA-GARETA et al., 2020; SHIRAKIGAWA e IJIMA, 2017).

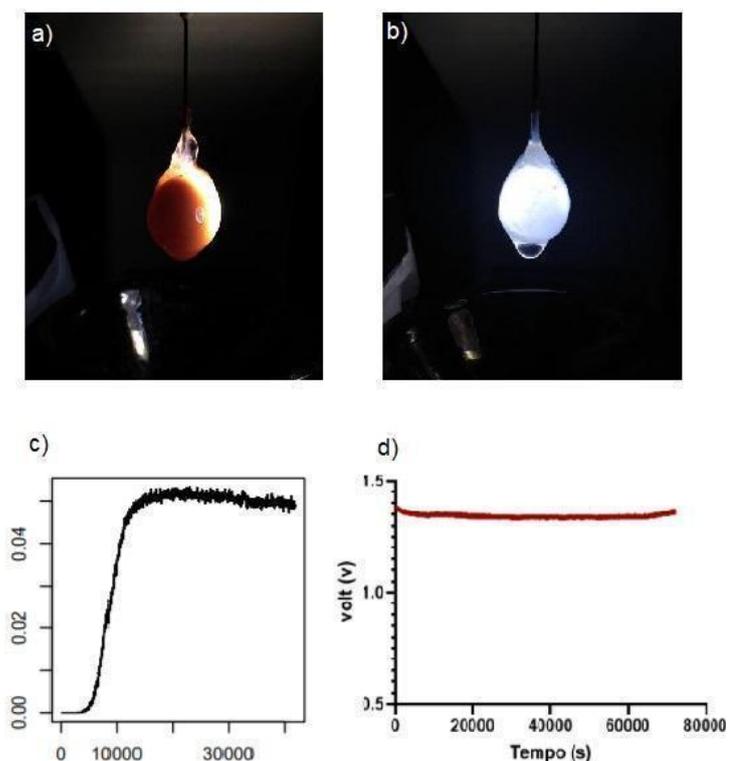
A presença de materiais celulares residuais tem sido descrita como fator limitante para o transplante de arcabouços descelularizados, devido à indução da resposta imune sobre o enxerto (GILBERT et al., 2009; KEANE et al., 2012). Normalmente, implantes induzem uma resposta inflamatória inicial que pode regredir ou evoluir para uma resposta inflamatória crônica, mediada por anticorpos (AAMODT; GRAINGER, 2016). Cerca de 20% dos pacientes transplantados sofrem com o episódio de rejeição aguda ao transplante em até 5 anos e, aproximadamente, 40% dos transplantes são perdidos em 10 anos após a cirurgia (SONG et al., 2013).

Diante disso, é notável a importância de se garantir que a MEC descelularizada contenha o mínimo de moléculas imunogênicas possíveis. Dentre as moléculas consideradas imunogênicas, os antígenos, o RNA e DNA são as principais moléculas que desencadeiam a resposta imune no paciente, uma vez que dentre eles a quantificação de DNA vem sendo a mais explorada na literatura para avaliar a eficiência de descelularização e, conseqüentemente, a capacidade imunogênica do órgão descelularizado (GILPIN e YANG, 2017; AAMODT e GRAINGER, 2016).

#### 4.4 SISTEMA DE SENSORIAMENTO ÓPTICO

Através de uma pequena abertura na estrutura do sensor, foi possível fazer o acompanhamento visual de todo o processo de descelularização, como é demonstrado na Figura 15. Ao iniciar o protocolo, foi possível notar que apenas um lado do rim estava iluminado, o lado posicionado em frente ao LED (Figura 15A). No decorrer da descelularização o órgão fica mais iluminado, devido ao aumento da sua translucência, e o fotodiodo passa a registrar a tensão recebida, que aumenta

gradualmente. Ao final do protocolo, o órgão se encontra completamente iluminado, translúcido e com aparência esbranquiçada (Figura 15B). Nas últimas horas, a curva de tensão registra a formação de um platô, ou seja, uma tensão máxima com o passar do tempo (Figura 15C).



**Figura 15.** (a) Imagem do rim dentro do sistema de sensoriamento óptico, no início da descélularização; (b) Imagem do rim dentro do sistema de sensoriamento óptico, ao final da descélularização; (c) Registro Gráfico completo, após uma descélularização; (d) Monitoramento da fonte luminosa isolada, por um período de 20h.

O perfil óptico produzido pela interação da luz branca com o tecido renal, sugere inicialmente a completa contenção da luz, demonstrada pela ausência de registro elétrico. Este comportamento é esperado, devido o tecido renal possuir componentes capazes de interagir com a luz visível nos diversos comprimentos de onda (PEREIRA et al., 2019). No decorrer da descélularização, o excesso de sangue e componentes oriundos da ruptura celular como organelas, ácidos nucleicos, gorduras, dentre outros, são removidos do órgão pela perfusão constante do surfactante. A retirada destes

componentes e de cromógenos, como a hemoglobina (400-600 nm), diminui a interação da luz com o tecido, permitindo sua transmissão. Esta transmissão é registrada graficamente pelo aumento gradual da voltagem, até o alcance do platô, momento em que o órgão atinge sua translucência máxima (PEREIRA et al., 2019).

A tensão máxima registrada após a descelularização, quando comparada com a fonte, isoladamente, é inferior. Esse fato demonstra que acontecem outros fenômenos ópticos, além da transmissão, que o sensor não pôde detectar (PEREIRA et al., 2019). Isto é devido a atividade óptica resultante da interação da luz com um tecido biológico é baseada em princípios físicos, dependentes dos comprimentos de onda, como fenômenos de espalhamento, transmissão, absorção, reflexão e fluorescência. Este último, por exemplo, pode ser utilizado para avaliar moléculas envolvidas no metabolismo celular, como NADH ( $\lambda_{exc}$  em 290/340 e  $\lambda_{em}$  em 350 440/450) e mudanças no estado de oxidação da hemoglobina (EFIMOV et al., 2004).

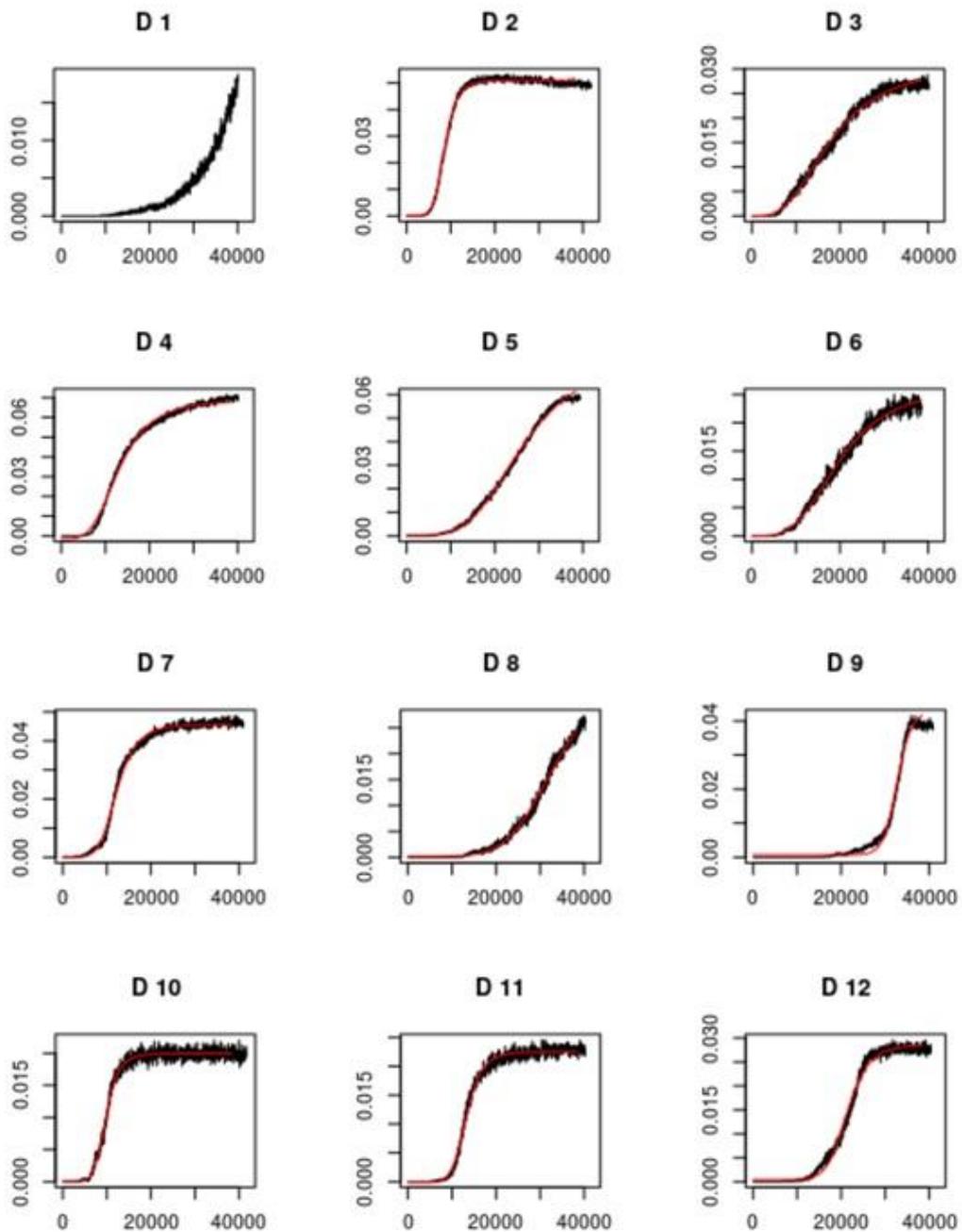
Diante disso, a utilização de luzes com comprimentos de ondas definidos, além da associação com outros dispositivos eletrônicos (ex. espectrofotômetros) podem ajudar com informações mais seletivas sobre os componentes biológicos durante o acompanhamento temporal das descelularizações no sensor (PEREIRA et al., 2019).

#### 4.4.1 Modelo matemático ajustado ao perfil óptico renal

A partir dos gráficos suavizados, foi ajustado o modelo logístico de quatro parâmetros, descrito por Gadagkar e Call (2000), de curva em S, conforme a seguir:

$$y = \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^s} + A2$$

Este modelo matemático se mostrou apropriado para modelagem das curvas geradas pelo sistema de monitoramento óptico, conforme Figura 16. As curvas foram ajustadas individualmente, entretanto, não foi possível a modelagem da curva correspondente à descelularização 1 (Figura 16D1), por não apresentar o formato em S com ponto de inflexão.



**Figura 16.** Tensão suavizada observada e ajustada segundo modelo logístico, ao longo do tempo, para cada descelularização.

Nota-se que algumas curvas registraram o aumento da tensão antes de 20.000 segundos (Figura16D2, Figura16D3, Figura16D4, Figura16D6, Figura16D7, Figura16D10 e Figura16D11), sugerindo que o início da translucência nesses órgãos aconteceu primeiro. A inclinação da curva indica a velocidade com que o órgão fica translúcido até atingir a translucência máxima, no platô. Diversos fatores podem provocar essas modificações, dentre eles diferenças entre as morfologias vasculares dos rins, alterações no fluxo de perfusão, composição tecidual, alterações na pressão interna renal, dentre outros (CRAWFORD et al., 2012; PEREIRA et al., 2019). Portanto, o sensor óptico foi capaz de detectar mudanças sutis entre as descelularizações e registrá-las graficamente. Apesar dessas variações, todas as curvas puderam ser ajustadas pelo mesmo modelo matemático.

Os parâmetros da equação para cada descelularização (Figura 16D1 a Figura16D12) foram calculados e estão expostos na Tabela 2. Devido ao modelo matemático não poder ser ajustado para D1, seus parâmetros não foram estimados. Por isto, não estão expressos na tabela e nos gráficos que os relacionam com o percentual de DNA removido de cada rim (Figuras 17, 18 e 19).

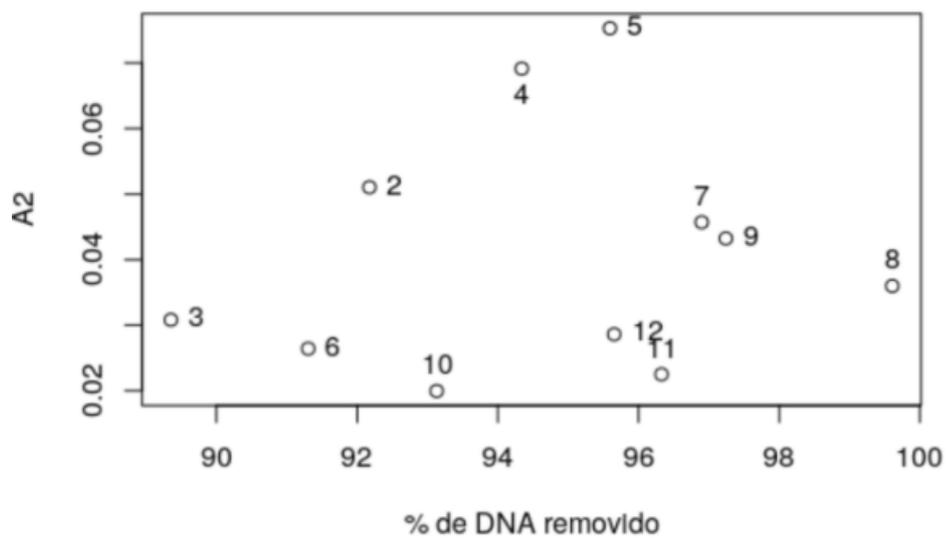
**Tabela 2** - Estimativas dos parâmetros do modelo para cada órgão.

Nome da Curva	A1	A2	s	X0
D1	Não estimado	Não estimado	Não estimado	Não estimado
D2	0,0000903	0,051	6,535	8670,95
D3	-0,0001167	0,031	2,885	17927,23
D4	-0,0015547	0,069	3,652	13118,44
D5	0,0001992	0,075	3,892	26133,85
D6	-0,0000928	0,026	3,387	19795,64
D7	0,0000369	0,046	5,571	12280,98
D8	0,0001671	0,036	5,642	33602,94
D9	0,0006914	0,043	20,092	32681,05
D10	0,0000751	0,020	6,887	9808,32
D11	-0,0001592	0,022	7,453	13227,92
D12	0,0004202	0,029	8,738	21432,08

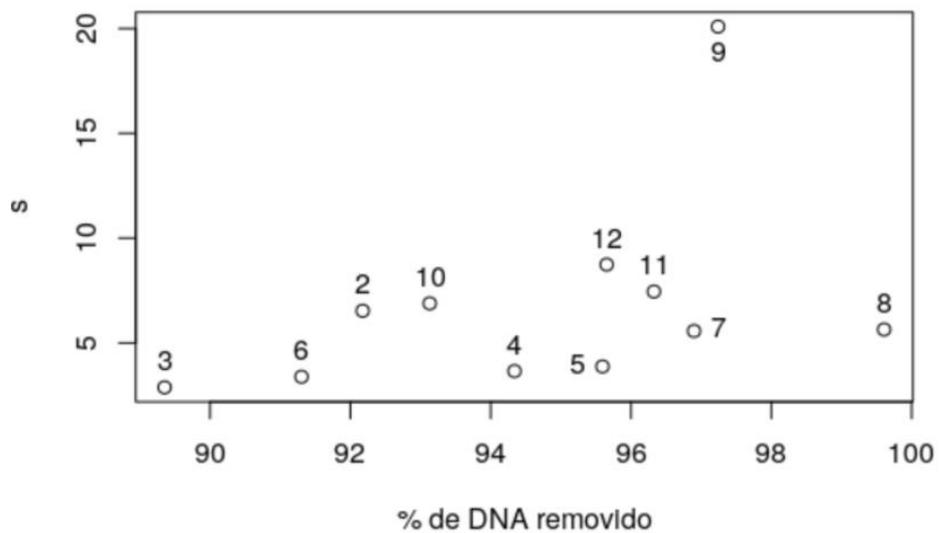
Para avaliar eventual correlação entre os parâmetros A2, s e X0 com o percentual de DNA residual dos rins, produziram-se gráficos de dispersão expostos abaixo. O intuito dessa análise estatística foi avaliar se as estimativas destes parâmetros podem ser utilizados para prever e/ou quantificar o DNA residual renal e, conseqüentemente, estimar a eficiência da descclularização sem a necessidade de ocasionar dano ao tecido ou órgão em questão.

O gráfico da relação dos parâmetros de A2 e s com o percentual de eficiência de remoção do DNA é representado pelas Figuras 17 e 18, respectivamente. Visualmente, observa-se que no gráfico de A2 os dados estão bem distribuídos,

enquanto no gráfico de  $s$ , os pontos se encontram concentrados na área inferior, sugerindo menor variação destes valores entre as descelularizações. Na Figura 18 pode-se observar um valor de  $s$ , referente à descelularização 9, muito superior aos demais (20,092). Neste caso, o aumento da tensão inicia-se rapidamente e durante um curto espaço de tempo, após 20.000 s, porém, parece ser um comportamento atípico. Apesar das diferenças, após a análise dos gráficos parece não haver relação dos parâmetros  $s$  e  $A_2$  com o percentual de remoção de DNA do tecido.



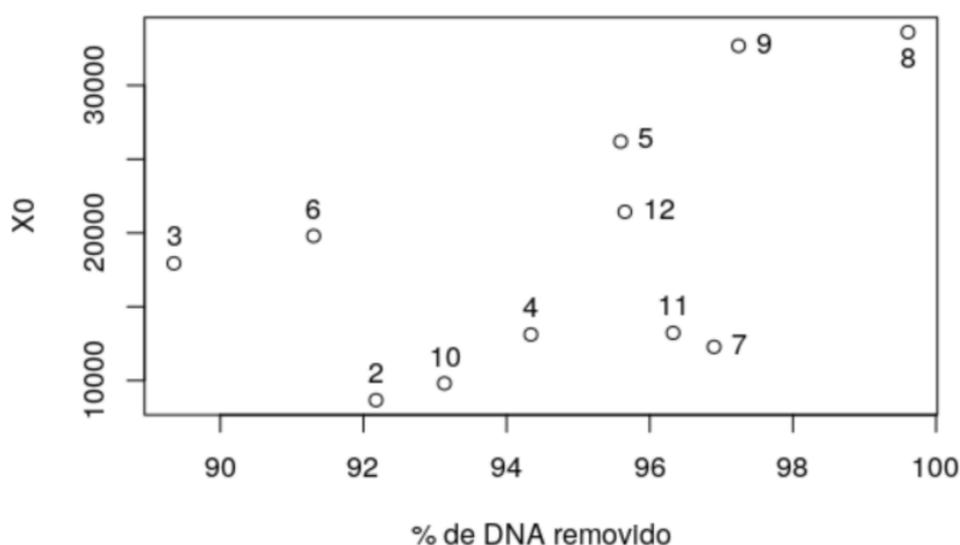
**Figura 17.** Dispersão entre estimativa de  $A_2$  e o percentual de DNA removido.



**Figura 18.** Dispersão entre a estimativa de  $s$  e o percentual de DNA removido.

A relação entre a queda percentual de DNA e a estimativa de X0 (Figura 19) aponta uma tendência de que à medida que X0 aumenta, o percentual de DNA removido também cresça. Esta relação foi a que mais diferenciou as curvas. Apesar de alguns dados não seguirem esse comportamento, a correlação entre as variáveis demonstrou ser de 52%.

Pereira et al (2019) utilizara pela primeira vez um sistema de monitoramento óptico em descelularizações cardíacas. Os resultados do estudo também identificaram o padrão óptico de curva em S, e o parâmetro X0 permitiu diferenciar os perfis de descelularização cardíacos e prever a eficiência da descelularização, qualitativamente (PEREIRA et al., 2019). Semelhantemente em nosso estudo, o parâmetro X0 foi o mais promissor para a análise da relação do perfil óptico renal com a qualidade tecidual, entretanto, a correlação foi apenas de 52%. Apesar desta correlação poder ser considerada inicialmente baixa, espera-se que com o aumento de amostragens as variações entre as estimativas de X0 diminuam, e permitam uma melhor correlação deste parâmetro com o percentual de DNA removido renal.



**Figura 19.** Dispersão entre a estimativa de X0 e o percentual de DNA removido.

Apesar da composição do tecido renal e suas estruturas serem diferentes do tecido cardíaco, o perfil óptico é semelhante. Isto sugere que outros órgãos também expressem o mesmo tipo de curva, possibilitando a aplicação do sensor em outros órgãos. Entretanto, são necessários novos estudos para confirmação desta hipótese.

## 5 CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou que, apesar da utilização do mesmo protocolo de descclularização, os rins apresentaram variabilidade no critério de classificação visual. Essa variação pode ser devido a diferenças na altura de inserção da cânula no órgão, alterações intrínsecas da vasculatura renal, modificações da pressão durante a perfusão, dentre outras. A caracterização histológica revelou a preservação da estrutura renal e a ausência de núcleos celulares, preservação do colágeno foi confirmada pela análise quantitativa de hidroxiprolina, demonstrando que não houve diferença significativa entre os grupos nativos e descclularizados, sugerindo a manutenção da estrutura e composição da MEC. A análise de DNA confirmou a descclularização dos órgãos, onde foi constatada uma remoção média superior a 95% do DNA.

O sistema de monitoramento óptico foi capaz de registrar graficamente o perfil óptico renal, demonstrando que cada descclularização produz um tipo de registro único de curva em S. O modelo matemático proposto por Gadagkar e Call (2000) modelou satisfatoriamente as curvas, e o parâmetro  $X_0$  foi o que obteve melhor correlação (52%) com o percentual de DNA removido. Entretanto, este ainda não pode ser utilizado isoladamente para prever a qualidade do órgão mas o aumento do número de registros ópticos renais e estimativas de  $X_0$  podem ajudar a diminuir as variações entre os valores e, conseqüentemente, melhorar a relação entre este parâmetro e o DNA residual.

Vale ressaltar que os resultados deste trabalho destacam a possibilidade de aplicação do sensor óptico em técnicas de descclularização renal, visto que a adição de novos tipos de detectores e fontes monocromáticas pode ajudar na aquisição de novas informações, visando a quantificação de outros componentes da MEC, por exemplo, colágeno, GAG's, dentre outros, de modo a permitir a avaliação da qualidade do órgão de forma não invasiva.

## REFERÊNCIAS

AAMODT Joseph. M.; GRAINGER David. W.; Extracellular Matrix-based Biomaterial Scaffolds and the Host Response. **Biomaterials**, v. 86, p. 68-82, 2016.

ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4 ed. New York. Garland Science. 2002. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/>>; Acesso em: 14 abr 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS (ABTO). Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período de janeiro a setembro de 2019. **Registro Brasileiro de Transplantes**, v. Ano XXV, n. 3, p. 1–23, 2019. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2019/RBT-2019-jan-set-leitura.pdf>>; Acesso em: 04 fev 2020.

BADYLAK, Stephen F.; FREYTES, Donald O.; GILBERT, Thomas W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.013>>.

BAAN, C. C. Basic Sciences in Development. Transplantation 100, 2507–2511 (2016).

BARSOUM, Rashad S. Chronic kidney disease in the developing world. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 10, p. 997–999, 2006.

BASTOS, Marcus Gomes; BREGMAN, Rachel; KIRSZTAJN, Gianna Mastroianni. Doença renal crônica: Frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 248–253, 2010.

BATES, D. M. and Chambers, J. M. **Nonlinear models**. Chapter 10 of Statistical Models in S eds J. M. Chambers and T. J. Hastie, Wadsworth & Brooks/Cole, 1992.

BRUFORD, et al. Single locus and multilocus DNA fingerprinting A.R. Hoelzel (Ed.), **Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach**, IRL Press, Oxford 270, 225–269 (1992).

BONANDRINI, Barbara et al. Recellularization of well-preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells. **Tissue Engineering - Part A**, v. 20, n. 9–10, p. 1486–1498, 2014.

BOURGINE, Paul E. et al. Tissue decellularization by activation of programmed cell death. **Biomaterials**, v. 34, n. 26, p. 6099–6108, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.058>>.

BRUYNEEL, Arne A.N.; CARR, Carolyn A. Ambiguity in the Presentation of Decellularized Tissue Composition: The Need for Standardized Approaches. **Artificial Organs**, v. 41, n. 8, p. 778–784, 2017.

BUCHARLES, Sérgio Gardano Elias et al. [Assessment and management of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease]. **Jornal brasileiro de nefrologia: 'orgão oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v. 32, n. 1, p. 118–125, 2010.

CARALT et al. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. **American Journal of Transplantation**. v. 15, n. 1, p. 64–75, 2015.

CARVALHO H. E.; RECCO-PIMENTEL S. M.; **A célula**. 1 ed. São Paulo. Editora Manole Ltda., 2001.

CHANI, Baldeep et al. Decellularized scaffold of cryopreserved rat kidney retains its recellularization potential. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–20, 2017.

CRAPO, Peter M.; GILBERT, Thomas W.; BADYLAK, Stephen F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, 2011.

CRAWFORD, Bredon et al. *Peripheral Blood Progenitor Cells* †,‡. v. 9999, p. 1–8, 2012.

CHOI, Seock Hwan et al. Development of a porcine renal extracellular matrix scaffold as a platform for kidney regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 103, n. 4, p. 1391–1403, 2015.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Básica**. 2 ed. São Paulo. Editora Atheneu, 2002.

DESTEFANI, Afrânio Côgo; SIRTOLI, Gabriela Modenesi; NOGUEIRA, Breno Valentim. Advances in the Knowledge about Kidney Decellularization and Repopulation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. June, 2017.

DIMITROVA, Nadya et al. Public Access NIH Public Access. **PLoS ONE**, v. 32, n. 7, p. 736–740, 2017. GEERTS, Sharon et al. Nondestructive Methods for Monitoring Cell Removal During Rat Liver Decellularization. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 22, n. 7, p. 671–678, 2016.

EDWARDS, C. A.; O'BRIEN, W. D. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. **Clinica Chimica Acta**, v. 104, n. 2, p. 161–167, 1980.

EFIMOV, Igor R.; NIKOLSKI, Vladimir P.; SALAMA, Guy. Optical imaging of the heart.

**Circulation Research**, v. 95, n. 1, p. 21–33, 2004.

FRIEND, P. J. Rejection reactions to different organ transplants. **Eye (Basingstoke)**, v. 9, n. 2, p. 190–191, 1995.

GEERTS, Sharon et al. Nondestructive Methods for Monitoring Cell Removal During Rat Liver Decellularization. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 22, n. 7, p. 671–678, 2016.

GADAGKAR, S. R. & CALL, G. B. Computational tools for fitting the Hill equation to dose-response curves. **J. Pharmacol. Toxicol Methods** 71, 68–76 (2015).

GARCÍA-GARETA, Elena et al. Decellularised scaffolds: just a framework? Current knowledge and future directions. **Journal of Tissue Engineering**, v. 11, 2020.

GENOVESE, Federica et al. The extracellular matrix in the kidney: A source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? **Fibrogenesis and Tissue Repair**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2014.

GILBERT, Thomas W.; SELLARO, Tiffany L.; BADYLAK, Stephen F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675–3683, 2006.

GILPIN, Anna; YANG, Yong. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

GONZÁLEZ-ANDRADES, Miguel et al. Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas With Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences. **Translational Vision Science & Technology**, v. 4, n. 2, p. 13, 2015.

GUYETTE, Jacques P. et al. Perfusion decellularization of whole organs. **Nature Protocols**, v. 9, n. 6, p. 1451–1468, 2014.

JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A, 2008.

KASIMIR et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. **The International Journal of Artificial Organs**. v. 26, n. 5, p. 421–427, 2003.

KAWECKI, Marek et al. A review of decellurization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix' scaffolds and their role in regenerative medicine. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 106, n. 2, p. 909–923, 2018.

KEANE, Timothy J. et al. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1771–1781, 2012.

MALTA, Deborah Carvalho et al. Probability of premature death for chronic non-communicable diseases, Brazil and Regions, projections to 2025. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes Clínicas para o cuidado ao paciente com Doença Renal Crônica – DRC no Sistema Único De Saúde**. Brasília, 2014. Disponível em <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes\\_clinicas\\_cuidado\\_paciente\\_renal.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_clinicas_cuidado_paciente_renal.pdf)>; Acesso em: 28 fev 2020.

PARTINGTON, L. et al. Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 2, p. 5251–5261, 2013.

PEREIRA, Rayssa Helena Arruda et al. A non-linear mathematical model using optical sensor to predict heart decellularization efficacy. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

POORNEJAD, Nafiseh et al. The impact of decellularization agents on renal tissue extracellular matrix. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 31, n. 4, p. 521–533, 2016.

PARMAKSIZ, Mahmut et al. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 11, n. 2, 2016.

RANA et al. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. **J Tissue Eng Regen Med**. v.11, n. 4, p. 942–965, 2017.

RBT. Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: JANEIRO / MARÇO – 2020. **Registro Brasileiro De Transplantes**. Ano XXVI Nº 1. 2020.

REMUZZI, Andrea et al. Experimental Evaluation of Kidney Regeneration by Organ Scaffold Recellularization. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep43502>>.

ROBERTIS E.; HIB J.; **De Robertis Bases da Biologia Celular e Molecular**. 4 ed. São Paulo. Editora Guanabara Koogan, 2006.

S., REDDY G. K; ENWEMEKA C. **A Simplified Method for the Analysis of Hydroxyproline in Biological Tissues**. [S.l: s.n.], 1996.

SAMOUILLAN et al. Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve bioprostheses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 46, n. 4, p. 531–538, 1999.

SANTOS, Guilherme Palhares Aversa et al. Kidney transplantation with donors in

severe acute kidney injury. Should we use these organs? Retrospective Case Series. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 41, n. 4, p. 534–538, 2019.

SCHMITT, A. et al. Optimized protocol for whole organ decellularization. **European Journal of Medical Research**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 2017.

SHIRAKIGAWA, Nana; IJIMA, Hiroyuki. **Decellularized tissue engineering**. [S.l.: s.n.], 2017. v. 66.

SONG et al. Regeneration and Experimental Orthotopic Transplantation of a Bioengineered Kidney. **Nat Med**. v. 19, n. 5, p. 646–651, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **SBN 2017 Censo**. São Paulo, v. 25, n. 114, 2018. Disponível em: <<https://sbn.org.br/app/uploads/sbninforma114-2.pdf>>; Acesso em: 28 fev 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Transplante renal**. Disponível em: <<https://sbn.org.br/publico/tratamentos/transplante-renal/>>; Acesso em: 10 mar 2020.

SOMUNCU, Özge Sezin. Decellularization Concept in Regenerative Medicine. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1212, p. 71–85, 2020.

SUH, Jung Hee; MINER, Jeffrey H. The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. **Nature Reviews Nephrology**, v. 9, n. 8, p. 470–477, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2013.109>>.

THEOCHARIS, Achilleas D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016. Disponível em:

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Heal. Stat. Monit. Heal. SDGs, Sustain. Dev. goals**. Geneva: [s.n.], 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Health Statistics: Monitoring Health for the SDGs, sustainable development goals**. 2019. ed. Geneva: [s.n.], 2019.



Universidade Federal  
do Espírito Santo



ANEXOS

# CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **SENSOR ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO DE RINS**

Registrada sob o n.º **01/2020** sob a responsabilidade de **BRENO VALENTIM NOGUEIRA**

que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia **21 de agosto de 2020**

Vigência da autorização: **setembro/2020 a agosto/2024**

Finalidade: **Pesquisa**

Espécie(s): **Rato (Rattus norvegicus)**

Linhagem(ns)/raça(s): **Wistar**

Peso: **250 a 300 gramas**

Idade: **60 a 90 dias**

Sexo: **Macho**

Número de animais: **40**

Origem: **Biotério Central, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Maruipé, Vitória-ES**

**21 de setembro de 2020**  
Vitória-ES, 10 de setembro de 2020

*Breno S. Salgado*

Breno Souza Salgado

Coordenador da CEUA-Ufes

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Avenida Marechal Campos, 1468 – Maruipé – Vitória/ES – CEP 29043-910 - Telefone: (27) 3335-7026 – ceua@ufes.br – www.ceua.ufes.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**RAQUEL AHNERT AGUIAR EVANGELISTA**

**SENSORIAMENTO ÓPTICO APLICADO À  
DESCELULARIZAÇÃO RENAL**

VITÓRIA, ES

2020