



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA-RENORBIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BRUNO DUARTE BERTULOSO

Orientador: Breno Valentim Nogueira

Vitória

2021



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA-RENORBIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BRUNO DUARTE BERTULOSO

**O EFEITO DA DIETA RICA EM CARBOIDRATO REFINADO
SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR HEPÁTICA APLICADA À
BIOENGENHARIA TECIDUAL**

VITÓRIA

2021

BRUNO DUARTE BERTULOSO

**O EFEITO DA DIETA RICA EM CARBOIDRATO REFINADO
SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR HEPÁTICA APLICADA À
BIOENGENHARIA TECIDUAL**

Exame de defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO) – Ponto focal Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim
Nogueira

VITÓRIA

2021

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

B552e Bertuloso, Bruno, 1986-
O EFEITO DA DIETA RICA EM CARBOIDRATO
REFINADO SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR
HEPÁTICA APLICADA À BIOENGENHARIA TECIDUAL /
Bruno Bertuloso. - 2021.
50 f.

Orientador: Breno Nogueira.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Descelularização Hepática. 2. Bioengenharia. 3. Dieta Rica em Carboidrato Refinado. I. Nogueira, Breno. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

**O EFEITO DA DIETA RICA EM CARBOIDRATO REFINADO
SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR HEPÁTICA APLICADA À
BIOENGENHARIA TECIDUAL**

Exame de defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) – Ponto focal Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Apresentada em: 31/08/2021_.

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Ariana Madeira Álvares da Silva
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira
Instituição: Instituto Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Fernanda Gobbi Amorim
Instituição: Université de Liège

VITÓRIA

2021

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo apoio e incentivo.

Ao professor Breno Valentim Nogueira, orientações e confiança no desenvolvimento desse trabalho.

À equipe do laboratório LUCCAR - laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, por tudo que aprendi e aos bons momentos que compartilhei.

Aos grandes amigos “mestres” Gabriel, Tadeu e Eduardo por compartilhar por dividir conhecimento e me apoiar nesse trabalho,

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES EDITAL FAPES/CAPES Nº 08/2017 - PROCAP – DOUTORADO)

Ao apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PGBiotec) e à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

RESUMO

O déficit entre a necessidade de fígados para transplante e a disponibilidade de órgãos criou caminho para novas alternativas. A descelularização e a recelularização de arcabouço hepáticos surgem como uma técnica promissora e alternativa para transplante de fígados. Contudo, o fígado é um órgão que pode ser acometido por doenças que afetem a estrutura e a composição da matriz extracelular (MEC) como por exemplo em decorrência de dietas ricas em carboidratos refinados (HC), as quais afetam diretamente o fígado. Esse trabalho discute o efeito da dieta HC de 12 semanas na MEC hepática. O fígado foi descelularizado e avaliada a descelularização utilizando análise histológica e de DNA. Também foi utilizado imuno-histoquímica para avaliar glicoproteínas como laminina e fibronectina. A ultraestrutura das fibras da MEC foi avaliada por microscopia de varredura e as possíveis alterações conformacionais do colágeno foram avaliadas por FTIR. Chow e HC tiveram os fígados completamente descelularizados avaliados por histologia e com níveis abaixo de 50ng/mg de DNA. O grupo HC apresentou aumento de colágeno no fígado, característico de DHGNA, perda de laminina e fibronectina, na MEC, bem como alterações na ultraestrutura do arcabouço. Ambos os grupos HC e Chow apresentaram na análise de FTIR picos da banda amida I, característico do colágeno, e redução após deconvolução da estrutura secundária alfa-hélice. Desse modo, tanto os fígados de animais tratados com dieta HC portadores de DHGNA quanto os fígados de animais do grupo Chow apresentaram eficiência no processo de descelularização, contudo o grupo HC demonstrou aumento de colágeno e alteração na malha das fibras do arcabouço, perda de laminina e fibronectina e redução da estrutura secundária do colágeno alfa-hélice. Os efeitos dessas mudanças podem orientar futuros trabalhos de recelularização.

Palavras-chave: Dieta Rica em Carboidrato Refinado, DHGNA, Descelularização

ABSTRACT

The gap between the need for livers for transplantation and the availability of organs paved the way for new alternatives. Decellularization and recellularization of liver scaffold appear as a promising and alternative technique for liver transplantation. However, the liver is an organ that can be affected by pathologies that affect the structure and composition of the extracellular matrix (ECM) as a result high refined carbohydrate-containing diet (HC), which directly affect the liver. This paper discusses the effect of 12-week HC diet on liver ECM. The liver was decellularized and the histological and DNA analysis was used. Immunohistochemistry was also used to evaluate glycoproteins such as laminine and fibronectin. The ultrastructure of the ECM fibers was evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and possible conformational changes of collagen were evaluated by FTIR. Chow and HC had the livers completely decellularized evaluated by histology and with levels below 50ng/mg of DNA. The HC group presented increased collagen in the liver, characteristic of NAFLD, loss of laminine and fibronectin, in ECM, as well as changes in the ultrastructure of the scaffold. Both HC and Chow groups presented in the FTIR analysis peaks of amide band I, characteristic of collagen, and reduction after deconvolution of the secondary alpha-helix structure. Thus, both the livers of animals treated with HC diet, carrier NAFLD of and the livers of animals in the Chow group showed efficiency in the decellularization process, however the HC group showed increased collagen and altered scaffold fiber mesh, loss of laminine and fibronectin and reduction of secondary collagen alpha-helix structure. The effects of these changes may guide future recellularization works.

Keywords: Refined Carbohydrate Rich Diet, DHGNA, De-cellularization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão anatômica dos lobos do fígado.	16
---	----

SUMÁRIO

ESTRUTURA DA QUALIFICAÇÃO DE TESE	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVOS GERAIS:.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	12
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 BIOENGENHARIA TECIDUAL	13
3.2 MATRIZ EXTRACELULAR	13
3.3 DESCELULARIZAÇÃO	14
3.4 FÍGADO	15
3.5 MODELOS DE DIETAS.....	19
3.6 DOENÇAS HEPÁTICAS GORDUROSAS NÃO ALCOÓLICA (DHGNA).....	20
4 CAPÍTULO 1.....	22
REFERÊNCIAS	42
ANEXOS	48
ANEXO I – PROTOCOLO DE ÉTICA	48
ANEXO II - PATENTE REFERENTE AO SISTEMA DE MONTAGEM IN SITU DE FIBRONECTINA EM SCAFFOLDS DESCELULARIZADOS	49

ESTRUTURA DA QUALIFICAÇÃO DE TESE

Para melhor compreensão dos resultados deste trabalho, optamos por estruturar esse documento em formato de artigo, seguindo as normas da Rede Nordeste de Biotecnologia: Introdução, Objetivos, Revisão de Literatura, Artigo Submetido, Conclusão

Artigo I - Effect of the High-refined carbohydrate diet on the hepatic extracellular matrix applied to tissue bioengineering

1 INTRODUÇÃO

A bioengenharia de tecidos e órgãos é uma área emergente, associada à biologia estrutural e à biomimética. Essa área reúne conhecimentos de grandes áreas como a biologia celular e tecidual, biologia do desenvolvimento e da forma, e dos sistemas integradores dos organismos superiores (OLIVEIRA et al., 2010).

A grande importância dessa área é devido ao aumento progressivo da idade média das populações humanas, e em particular das populações urbanas, onde percebe-se a necessidade de garantir cada vez mais a qualidade de vida compatível com custo e carga social aceitáveis. Por outro lado, a faixa etária jovem vive em aglomerações de alta densidade e estão mais expostos a doenças.

Segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, até junho de 2016 existiam 1.353 pacientes ativos aguardando transplante de fígado em todo o Brasil, sendo este o terceiro órgão mais procurado para transplante. Somente no primeiro semestre de 2016 1.579 pacientes ingressaram na lista de espera, entretanto 429 vieram a óbito durante o primeiro semestre. O sexto grupo de mortalidade mais importante é o de doenças do aparelho digestivo. As doenças hepáticas representam quase metade das causas de morte deste grupo e nos homens atinge 57% dos óbitos (TEIXEIRA et al., 2012). Dados da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo evidenciam que o consumo de álcool pelo sexo masculino provoca a longo prazo doenças hepáticas, como a cirrose.

Como alternativa para aumentar o número de órgãos disponíveis e conseqüentemente reduzir o número de óbitos decorrentes das demoradas filas de espera para se conseguir um doador, as técnicas de bioengenharia tecidual estão se desenvolvendo cada vez mais com o intuito de obter órgãos bioartificiais. Uma das novas promessas para o tratamento doenças hepáticas é a utilização da técnica de engenharia tecidual para formação de estruturas orgânicas, que consiste basicamente na descelularização do fígado com a manutenção do arcabouço preservando os constituintes da matriz extracelular (MEC), o qual posteriormente é recelularizado utilizando células tronco - um tipo especial de célula capaz de se diferenciar em células de vários tecidos e regenerá-los (OLIVEIRA et al., 2010). Este processo tornaria suscetível a criação de órgãos e conseqüentemente diminuiria o tempo de espera na fila de transplantes.

Estudos recentes têm demonstrado a obtenção de fígado bioartificial funcional através da descelularização e recelularização de um órgão cadavérico (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GEERTS et al., 2016; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; SELLARO et al., 2010; SHUPE et al., 2010).

Um dos problemas oriundos do transplante de órgãos é que além da necessidade de compatibilidade sanguínea entre o doador e o receptor, há também o uso de medicamentos imunossupressores após a cirurgia, o que pode levar ao aparecimento de outros agravos à saúde do paciente. Neste cenário um benefício da descelularização é a redução do uso de medicamentos e/ou moléculas imunologicamente ativas, o que permite a minimização das taxas de rejeição de transplante (HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2015).

Atualmente, a recelularização do órgão com células tronco do próprio paciente também poderia solucionar a questão da resposta imunológica. Assim, através da mimetização do procedimento de descelularização de um órgão retirado de um animal e subsequente recelularização (repopulação) da matriz extracelular com células do próprio animal, um órgão bioartificial funcional pode ser obtido. Contudo, quando se pensa na população humana, nem todos os possíveis doadores de órgãos para descelularização serão indivíduos saudáveis. Levando em consideração que grande parte da população mundial apresenta distúrbios hepáticos e parte significativa dessas doenças são ocasionadas por acúmulos de lipídio no parênquima hepático, e dentro desse conjunto de doenças existe a doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DGHNA), que acometem em média 25% da população mundial (GOLABI et al., 2019)

Por isso se faz necessária a investigação das possíveis alterações da MEC de indivíduos expostos a diferentes condições e com possíveis doenças, assim como da resposta do órgão dessas pessoas ao processo de descelularização e posterior recelularização.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS:

- Caracterizar a matriz extracelular hepática descclularizada de camundongos portadores de DHGNA induzido por dieta rica em carboidrato refinado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar e padronizar parâmetros ótimos para descclularização hepática camundongos portadores de DHGNA;
- Realizar análise comparativa sobre a morfologia da matriz extracelular hepática descclularizada;
- Obter arcabouço viável para o processo de recelularização com hepatócitos;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BIOENGENHARIA TECIDUAL

A bioengenharia de tecidos de órgãos é uma área emergente, associada à biologia estrutural e a biomimética, definida como um campo interdisciplinar que aplica princípios da ciência da vida e engenharia para o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar as funções biológicas de um tecido ou órgão inteiro, através do conhecimento do crescimento e funcionalidade destes (LANGER, 1993). A engenharia tecidual tem intuito de reparar e substituir tecidos e órgãos (ZHAO; MI; TURNG, 2017). A falência de tecidos e órgãos devido a lesões e doenças é considerada um grande desafio na área da saúde, desse modo a necessidade de suprir órgãos que perderam a atividade e entraram em falência é uma busca contínua. O campo da engenharia tecidual vem fornecendo pesquisas representativas tanto na área acadêmica quanto na área da biotecnologia industrial (KHAN; TANAKA, 2018). O desenvolvimento de biomateriais em estrutura tridimensional capaz de mimetizar órgãos e gerar características intrínsecas pode ser considerado um dos maiores progressos da bioengenharia tecidual. A finalidade dessas técnicas é aumentar o número de órgãos para transplantes (SHAFIEE; ATALA, 2017).

Biomateriais com interesse na medicina regenerativa devem ser capazes de fornecer suporte mecânico e sinais bioquímicos para estimular a ligação celular e manter sua funcionalidade (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018). Um exemplo de modelo natural de biomaterial é a matriz extracelular. A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa composta em sua maior parte de macromoléculas organizadas de maneira específicas, a fim de formar tecidos e órgãos com estabilidade estrutural (YUE, 2014). A matriz extracelular também participa da proliferação, adesão, migração e diferenciação celular, aumentando assim sua importância na estruturação de um órgão (LU et al., 2011)

3.2 MATRIZ EXTRACELULAR

Os órgãos e tecidos são formados por células e uma estrutura altamente organizada chamada matriz extracelular (MEC). A matriz participa de suporte e estruturação dos órgãos, ultrapassando uma mera estrutura física. A matriz também tem caráter de comunicação química com as células, mantendo uma interação com as células do tecido,

promovendo migração e diferenciação celular (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; THEOCHARIS et al., 2016). As células presentes na MEC sofrem influência do próprio microambiente da matriz (BADYLAK et al., 2012). Essa influência da matriz sobre as células promove síntese de proteínas específicas. As MECs são sintetizadas por um conjunto de genes, que ultrapassam 1000 genes. Eles sintetizam proteínas reguladoras da MEC, fatores secretam glicoproteínas, colágeno e proteoglicanos (NABA et al., 2016). As variedades de proteínas encontradas na MEC acompanharam evolutivamente os vertebrados junto com sistema circulatório fechado, formação da crista neural, dentes, cartilagem e ossos (HYNES, 2012).

A MEC pode ser classificada em dois tipos, os quais se diferem pela mudança na sua composição e estrutura: intersticial e pericelular. As matrizes intersticiais preenchem todo o entorno das células, e as matrizes pericelulares localizam-se próximas às células (THEOCHARIS et al., 2016). Contudo, a constituição da MEC é de água, proteínas e polissacarídeos, mas cada tecido tem em sua MEC uma composição específica que são geradas durante o desenvolvimento do tecido (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). As proteínas estruturais como colágeno, fibrina e elastina, proteínas especializadas (glicoproteínas) e PGs constituem a matriz (DALEY; PETERS; LARSEN, 2008). PGs tem caráter estrutural (SCHAEFER; SCHAEFER, 2010).

Os colágenos são considerados a proteína mais abundante dos mamíferos (cerca de 30% da massa total) e na pele representam três quartos de sua massa, sendo uma proteína que se estrutura para formar fibras insolúveis com grande capacidade de resistência e elasticidade. O colágeno é composto por três polipeptídeos de cadeia alfa que forma uma estrutura em tripla hélice. Nos vertebrados 46 tipos diferentes de cadeias de colágeno se estruturam para formar 28 tipos de colágenos (YUE, 2014). Além desse fato, muitas proteínas apresentam ligação para o colágeno, os quais são subdivididos em colágeno tipo I, II, III e IV. Cabe ressaltar que o colágeno tipo IV está associado em redes e constitui a lâmina basal.

3.3 DESCELULARIZAÇÃO

As técnicas de descelularização têm como finalidade a remoção total das células de um órgão e tecidos de modo que resulte na obtenção de uma MEC com sua estrutura e composição preservadas. A manutenção das características específicas da MEC tem como objetivo a capacidade de reintrodução de células compatíveis com receptor. A finalidade

de tal processo é a criação de um arcabouço com redução máxima da imunogenicidade causada pelas células, mas sem perder as características da matriz extracelular (MOSER & OTT, 2014; TAPIAS & OTT, 2014; HUDSON et al., 2004). Assim, o desenvolvimento da técnica de descelularização que permite gerar tecidos e órgãos utilizando uma MEC nativa é considerado um grande avanço na medicina regenerativa. Para conseguir um arcabouço viável existem vários protocolos, os quais podem envolver métodos físicos e químicos, mas a utilização de surfactantes como os detergentes pode ser considerada um dos métodos mais usados no processo de descelularização (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). A característica da sua remoção celular é devido à lise da membrana celular, eliminando as células do arcabouço (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). É importante que a eliminação celular reduza significativamente a concentração de DNA na matriz extracelular. Detergentes como Triton X-100 (não-iônicos) obstruem a ligação DNA-proteína, enquanto os detergentes iônicos, dodecil sulfato de sódio (SDS) têm a capacidade de solubilizar componentes da membrana celular e nucleicas. Tais processos ocorrem por perfusão através da vasculatura do órgão onde os detergentes percorrem integralmente os órgãos (PLENICEANU; HARARISTEINBERG; DEKEL, 2010). Assim, o processo de descelularização de um órgão usando detergentes produz arcabouços inteiros, capazes de receberem células indiferenciadas do indivíduo com alguma doença hepática, de maneira que um novo órgão seja formado pela MEC descelularizada. Neste processo, utilizam-se células do próprio paciente, reduzindo assim chances de rejeição e síntese de um órgão (GILPIN; YANG, 2017; HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018).

3.4 FÍGADO

O fígado é o maior órgão sólido do corpo humano, sendo a maior glândula e um dos órgãos mais vitais que funciona como um centro de metabolismo de nutrientes e excreção de metabólitos (ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010). O fígado possui diversas funções, das quais a sua principal é controlar o fluxo e a nocividade de substâncias absorvidas pelo sistema digestivo antes da distribuição dessas substâncias ao sistema circulatório sistêmico (ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010).

O fígado pesa aproximadamente 1500g e contabiliza aproximadamente 2,5% do peso corporal do adulto (ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010). A superfície do fígado é lisa e em forma de cúpula, e está relacionada com a concavidade da superfície inferior do

diafragma (**Figura 1**). O fígado encontra-se principalmente no quadrante superior direito do abdômen, onde está protegido pela caixa torácica e diafragma. O fígado normal encontra-se entre as costelas 7 - 11 do lado direito e cruza a linha média em direção ao mamilo esquerdo (ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010). O fígado é dividido em 4 lobos: direito, esquerdo, caudado e quadrático. Adjacente ao lobo caudado está o sulco da veia cava inferior. Logo abaixo do lobo caudado está a fissura transversa, onde a artéria hepática e a veia porta hepática entram no fígado. A veia porta transporta sangue carregado de nutrientes do sistema digestivo. Inferior à fissura transversa está o ducto biliar que leva à vesícula biliar. A veia hepática, onde o sangue pós-processado sai do fígado, encontra-se inferior e adjacente ao sulco da veia cava inferior (ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010).

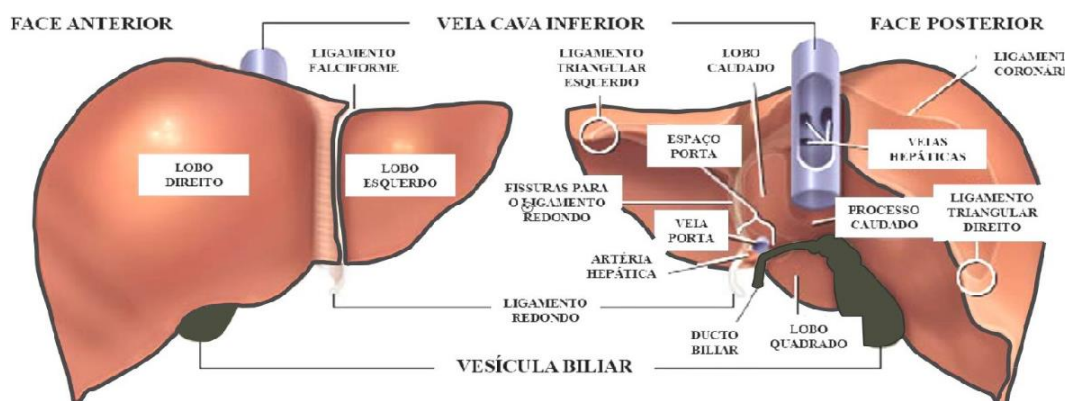


Figura 1 - Visão anatômica dos lobos do fígado.¹ Adaptado da Encyclopedia Britannica Inc (2003)

A unidade funcional básica do fígado é o lóbulo do fígado. Um único lóbulo tem aproximadamente o tamanho de uma semente de gergelim e tem uma forma aproximadamente hexagonal (SAXENA; THEISE; CRAWFORD, 1999). As estruturas primárias encontradas em um lóbulo hepático incluem:

- Placas de hepatócitos que constituem o maior volume do lóbulo;
- Tríades portais em cada canto do hexágono;
- Veia central;

¹ Visão anatômica dos lobos do fígado. Disponível em: <<https://healthlifemedia.com/healthy/pt/anatomia-do-f%C3%ADgado/>>. Acesso em: 20 de Agosto de 2020.

- Sinusoides do fígado que correm da veia central para as tríades portais;
- Macrófagos hepáticos (células de Kupffer);
- Canalículos biliares (“canais pequenos”) – formados entre paredes de hepatócitos adjacentes;
- Espaço de Disse - um pequeno espaço entre os sinusoides e os hepatócitos.

As tríades portais consistem em três vasos: uma arteríola hepática, uma vênula hepática e um ducto biliar.

O fígado é composto por vários tipos de células de diferentes origens embriológicas, incluindo hepatócitos, células epiteliais das vias biliares (colangiócitos), células estreladas, células de Kupffer e células endoteliais do fígado. Cada um desses tipos de células possui funções únicas que regulam cooperativamente a função hepática em múltiplos níveis (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). Os hepatócitos são a principal população de células epiteliais do fígado. Eles compõem a maior parte do volume do fígado e realizam muitas das funções atribuídas a este órgão. Os colangiócitos são a segunda maior população epitelial do fígado e têm uma função epitelial mais tradicional como as células que revestem o lúmen dos ductos biliares. As células estreladas representam uma população de células dinâmicas que podem existir em um estado quiescente ou ativado. No estado quiescente as células estreladas armazenam vitamina A em gotículas lipídicas; no entanto, outras funções nesse estado quiescente permanecem obscuras. Danos ao fígado levam à ativação de células estreladas, as quais, após a ativação, proliferam e perdem progressivamente os estoques de vitamina A. As células estreladas também são responsáveis pela deposição e organização do colágeno no fígado lesionado. Este processo contribui para a cicatrização do fígado, que pode progredir para cirrose - uma patologia crítica que contribui para a doença hepática terminal. Em resposta ao dano de diversas lesões hepáticas, o fígado apresenta macrófagos denominados células de Kupffer que são células fagocíticas especializadas (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

O fígado é o principal órgão hematopoiético durante certas fases do desenvolvimento fetal e continua a ser um órgão hematopoiético mesmo após o nascimento. Pode produzir todas as linhagens de leucócitos a partir de células-tronco hematopoiéticas residentes (ABO et al., 1994; TANIGUCHI et al., 1996). O trato portal do fígado contém muitas

células diferentes de origem hematopoiética, bem como células tronco hematopoéticas (GRISHAM, 1983). Além disso, o fígado contém células envolvidas nos processos imunes adaptativos e inatos.

A MEC é um compartimento muito limitado dentro do fígado normal: compreende menos de 3% da área relativa em uma seção de fígado normal (LIN et al., 1998). MEC refere-se ao arranjo de várias macromoléculas que compõem o arcabouço do fígado. Além da cápsula de Glisson, a MEC é restrita, no fígado normal, aos tratos portais, paredes sinusoides e veias centrais. Em qualquer local, a MEC faz parte da fronteira entre o fluxo sanguíneo e o parênquima. Tal situação estratégica é responsável pelas consequências deletérias imediatas e múltiplas de qualquer modificação do MEC, seja qualitativa ou quantitativa (BEDOSSA; PARADIS, 2003).

As proteínas mais frequentemente encontradas na MEC do fígado são colágenos, sendo os mais abundantes colágenos tipo I, III, IV e V, embora outras isoformas, incluindo o recentemente descrito tipo XVIII, o precursor da endostatina, estejam presentes (ROJKIND; GIAMBRONE; BIEMPICA, 1979; SCHUPPAN et al., 1998). Cada isotipo difere em sua localização e função física dentro do fígado. Enquanto os tipos I, III e V, os principais constituintes do colágeno fibrilar, estão confinados principalmente ao trato portal e parede central da veia, colágeno tipo IV, em associação com laminina e entactina-nidogênio, participam da formação de um material semelhante a membrana basal de baixa densidade ao longo da parede sinusoidal (MARTINEZ-HERNANDEZ, 1984). Nesta posição, uma membrana basal com densidade de elétrons geralmente está ausente, embora a maioria dos componentes possa ser detectada individualmente (MARTINEZ-HERNANDEZ, 1985). A baixa densidade dessa estrutura semelhante à da membrana basal é fundamental para permitir a fácil difusão entre as células do sangue e do fígado e para manter a função diferenciada das células vizinhas do fígado, como os hepatócitos e as várias células sinusoidais (BISELL et al., 1990). Outros componentes importantes da MEC do fígado são glicoproteínas, como laminina, fibronectina, tenascina entre outras (SCHUPPAN, 1990). Os proteoglicanos incluem heparano, dermatano, sulfato de condroitina, perlecan, ácido hialurônico, biglicano e decorina (GRESSNER, 1983). A principal função da MEC continua sendo a coerência mecânica e a resistência do fígado, mas a MEC do fígado também tem um papel em várias funções biológicas importantes, como proliferação, migração, diferenciação e expressão gênica.

3.5 MODELOS DE DIETAS

Com o aumento do número de pessoas acometidas por diferentes doenças metabólicas surge a demanda por estudos que investiguem suas patogêneses. Um fator de grande relevância para esse contexto é a forma de alimentação adotada pela população, principalmente baseada no alto consumo de calorias e carboidratos (BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007; FRIEDMAN, 2009; GROSS et al., 2004). Dessa forma modelos animais que simulem esse padrão têm sido desenvolvidos nos últimos anos a fim de auxiliar na investigação dessas doenças (NG et al., 2010; SAMPEY et al., 2011).

Cada modelo animal possui sua particularidade e procura simular uma característica específica da dieta humana (JACOBS et al., 2016). Além disso, o uso de diferentes dietas busca induzir sinais e sintomas nos animais que sejam semelhantes aos encontrados em humanos para auxiliar no estudo do desenvolvimento dessas doenças e/ou na possível prevenção ou tratamento delas (VAN HERCK; VONGHIA; FRANCQUE, 2017). Assim surgem diferentes dietas utilizadas em diferentes linhagens animais.

Algumas dietas têm objetivo de induzir doenças metabólicas por meio da ausência de alguns nutrientes, por exemplo a dieta com carência de colina e metionina, que são compostos essenciais para a produção de VLDL e para o processo de β -oxidação no fígado (FAN; QIAO, 2009). Contudo, devido a alimentação moderna ser baseada no excesso de nutrientes, o uso de dietas ricas em gorduras, carboidratos ou calorias é bem frequente simulando as chamadas dieta ocidental, dieta de cafeteria, entre outras, que se baseiam no consumo de alimentos com alto teor calórico, e elevadas quantidades de gordura e carboidratos (BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007; GROSS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2013).

As dietas ricas em carboidratos, sendo os mais comuns a frutose e a sacarose (que é formada por frutose), são de grande valia na investigação pré-clínica dos efeitos do consumo de dieta de cafeteria em humanos (BLACHIER et al., 2013; GROSS et al., 2004). O uso de carboidratos na dieta aumentou nos últimos 30 anos, e esse aumento está associado a maior prevalência do número de casos de pessoas com doenças metabólicas (LIM et al., 2010). Recentemente o efeito dos carboidratos, em especial a frutose, nas

dietas tem se tornado mais conhecido. Diversos estudos têm reportado que dietas ricas em frutose promovem lipogênese, obesidade, hipertensão, hipertrigliceridemia, resistência à insulina, respostas pró-inflamatórias e a formação de espécies reativas de oxigênio. Dentre os efeitos causados pela dieta rica em carboidratos se apresentam as alterações hepáticas, as quais são as mais pronunciadas (CRESCENZO et al., 2014; KELLEY; ALLAN; AZHAR, 2004; LIM et al., 2010). portanto, essas dietas reconhecidas como bons modelos de doenças metabólicas.

3.6 DOENÇAS HEPÁTICAS GORDUROSAS NÃO ALCOÓLICA (DHGNA)

As doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA ou NAFLD, do inglês *nonalcoholic fatty liver disease*) caracteriza pelo acúmulo de lipídios nos hepatócitos em mais de 5% dos hepatócitos e não relacionadas ao consumo significativo de álcool de álcool (CHALASANI et al., 2012). DHGNA está associados a fatores de riscos como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e a resistência à insulina (LEITE et al, 2014), onde a lipotoxicidade no processo da esteatose hepática oriunda doo acúmulo de lipídios nos tecidos levam a resistência à insulina (CHACKO; REINUS, 2016). A DHGNA pode ser assintomática nos primeiros estádios da patologia, suas classificações variam pelo nível de depósito de gordura e o dano ao hepatócito podendo ser classificada por meio histológico do tecido hepático, e sua variação vai desde esteatose à cirrose. Os primeiros estágios da doença são divididos em esteatose simples e esteato-hepatite não alcoólica EHNA, abas apresentam acúmulo de lipídio nos hepatócitos, mas a EHNA apresenta lesões hepáticas com grande risco de desenvolvimento de cirrose como de carcinoma hepatocelular (SUK; KIM, 2019). A EHNA tem origina a partir de esteatose onde ocorre não só processo inflamatório com liberações de citocinas pro inflamatórias, mas também pelo estresse oxidativo no tecido hepático. Essas alterações podem ser assintomáticas mesmo em um grau representativo da doença (SILVA; ESCANHOELA, 2012).

A DHGNA apresenta uma grande prevalência em média um quarto da população, mas podendo acometer próximo aos 50% da população dependendo da população e dos métodos de diagnósticos (COTRIM et al., 2011; GOULART et al., 2015)

Em níveis mais elevados de DHGNA podemos ser observado grandes níveis de fibrose hepática onde a matriz extracelular (MEC) aumenta seu acúmulo no tecido hepático após lesões e cicatrizações do tecido. Desse modo se o processo inflamatório acometer o tecido

hepático de maneira crônica o acúmulo da MEC é progressivo, ocorrendo substituição do parênquima hepático por tecido cicatrizado, podendo caracterizar cirrose (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011).

4 CAPÍTULO 1**Artigo I**

**Effect of the High-refined carbohydrate diet on the hepatic extracellular matrix applied
to tissue bioengineering**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **Effect of the high-refined carbohydrate diet on the hepatic extracellular**
2 **matrix applied to tissue bioengineering**

3

4 Bruno Duarte Bertuloso¹, Tadeu Ériton Caliman Zanardo ^{1,2}, Gabriel Henrique Taufner¹,
5 Breno Valentim Nogueira ^{1,2*}

6 1. Biotechnology Graduate Program, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)

7 2. Department of Morphology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo,
8 Vitória, Brazil

9 *Corresponding author

10 Email address: breno.nogueira@ufes.br

11

12 **Abstract**

13 The lack of livers for transplantation and organ rejection led the area of tissue bioengineering
14 to obtain solutions. Decellularization and recellularization of hepatic scaffold appear as a
15 promising alternative for liver transplantation. Several liver diseases affect the structure and
16 composition of the extracellular matrix (ECM), for example due to the high-refined
17 carbohydrate (HC) diet. We aim to evaluate the effect of nonalcoholic fatty liver disease
18 (NAFLD) on the ECM of decellularized livers. Swiss mice were fed the HC diet for 12 weeks
19 and developed the NAFLD. The livers were perfused with detergent sodium dodecyl sulfate
20 (SDS, 1%) for decellularization. Decellularization in both groups was confirmed by histological
21 analysis and quantification of residual scaffold DNA. Analysis of collagen by Picosirius and
22 hydroxyproline showed an increase in animals with NAFLD. Immunohistochemical analysis
23 revealed a decrease in laminin and fibronectin in livers from animals with NAFLD. The
24 ultrastructure of the MEC fibers was evaluated by scanning microscopy and the possible
25 conformational changes in the collagen were evaluated by FTIR. In conclusion, the liver
26 decellularization process was not affected by NAFLD, however there was a drastic change in
27 the components of the ECM, which can affect the recellularization process.

28 **Keywords**

29 Liver transplant, Decellularization, NAFLD, High refined carbohydrate.

30

31 **Introduction**

32 Liver transplantation is the gold standard treatment for patients with liver failure, but the
33 demand for organs for transplantation is greater than the supply. In addition, within 10 years
34 after transplantation 40% of transplant recipients rejects the organ (KAWAI et al., 2008;
35 VALENZUELA et al., 2017). Because of this, alternatives for liver replacement are emerging,
36 such as the bioengineering of synthetic scaffolds or the reconstruction of the liver from its
37 decellularization (CRAPO et al., 2011; GARRETA et al., 2017). Decellularization consists of
38 removing cells from a tissue for restocking the remaining extracellular matrix (ECM) with stem
39 cells in order to obtain a new functional organ (WANG et al., 2014). The use of the patient's
40 own stem cells for recellularization can mitigate rejection due to lack of immunocompatibility
41 (BAPTISTA et al., 2009) For a new organ to be reconstructed, some characteristics must be
42 maintained in the matrix, from the capacity of cell proliferation, to maintaining your vascular
43 network and maintaining important ECM molecules (STRUECKER et al., 2017). It is desirable
44 that such decellularized biomaterials should maintain as much as possible their physical and
45 biochemical characteristics of ECM for their reconstruction (SHUPE et al., 2010).

46 Currently, most of the organs available for transplantation and use in tissue bioengineering are
47 from died patients (EVERWIEN et al., 2019). But it is important to note that these individuals
48 did not necessarily have all healthy organs, especially the liver, the which is an organ that can
49 be affected by various diseases. Among these, we have the Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
50 (NAFLD) characterized by hepatic steatosis, with accumulation of triglycerides
51 (ANDRONESCU et al., 2018), comprising a spectrum of diseases from steatosis to carcinoma
52 (YEH; BRUNT, 2007), being the prevalence around 25% of the world population (BEDOGNI
53 et al., 2005). Food is an important factor for the development of NAFLD (MIRMIRAN et al.,
54 2017), with the dietary pattern based on the consumption of excess fats and/or carbohydrates
55 being one of the main causes (BENEDICT et al., 2017). The refined carbohydrate (HC) diet is
56 an example of this eating pattern, which has already been shown to be able to cause triglyceride
57 accumulation in the liver (OLIVEIRA et al., 2015). Considering that the world population has
58 a representative number of people with NAFLD and a population in which the consumption of
59 HC diets are frequent, the probability that the liver donated for use in tissue bioengineering will
60 be donated with individuals with NAFLD.

61 Although the process of NAFLD in the liver is well described, the relationship between the
62 effect of liver disease on liver ECM and its use in tissue bioengineering has been little discussed.
63 Thus, we pursue to understand whether the damage caused by liver disease is harmful to the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

64 ECM of the liver, to the point of preventing its use in tissue bioengineering. For that, we used
65 Swiss mice that were fed with HC for 12 weeks and had their livers evaluated for the presence
66 of NAFLD, its effect on the ECM and the decellularization process.

67

68 **Methods**

69 *Animals*

70 All animal experiments were carried out in accordance with the guidelines for biomedical
71 research in accordance with the rules of the Brazilian Society for Experimental Biology and
72 with approval by the Ethics Committee on the use of animals at the Federal University of
73 Espirito Santo (CEUA-UFES nº 57/2019). For the study, healthy Swiss mice, six weeks old,
74 who had access to water and food, with 12-hour light / dark cycle control, as well as temperature
75 ($22\pm 2^\circ\text{C}$) and humidity (65%) were used. of the environment. To analyze the effect of high
76 refined carbohydrate containing-diet (HC) on the hepatic extracellular matrix, the animals were
77 fed standard chow feed for the laboratory Chow Socil® Control - (Chow, n = 18) or HC diet (n
78 = 18) previously described by (OLIVEIRA et al., 2013). The treatment had a period of 12
79 weeks, where the animals had their weights and food consumption measured every 3 days.

80

81 *Decellularization*

82 The animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and
83 heparinized with 1000 units intraperitoneally. After cannulation of the portal vein with cannula
84 (Micro-Renathane - 0.040 mm OD X 0.025 mm ID; Braintree) the liver was removed.
85 Subsequently, the liver was perfused with a sodium phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4)
86 with heparin (100 Units / mL) for 30 minutes with the aid of a peristaltic pump (Gilson ®) at
87 an infusion rate of 1,5 ml / min. Subsequently, the organ was perfused with sodium dodecyl
88 sulfate detergent (SDS) 1% for 5 hours and Triton X-100 1% for 30 minutes, always diluted in
89 distilled water (H₂O_d). After decellularization, the organ was perfused with distilled water for
90 30 min. The infusion pressure of all detergents and solutions in the organ was around 100
91 mmHg (± 10 mmHg), being verified throughout the processing.

92

93 *Serum analysis*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

94 The serum concentration of triglycerides, total cholesterol and glucose was performed
95 using a colorimetric enzyme kit (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) and the
96 concentration of the ALT and AST transaminases was performed with a colorimetric kit
97 (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), evaluated by spectrophotometry.

98

99 *Quantification of hepatic triglycerides*

100 The liver tissue samples were homogenized in 1: 4 (g/mL) saline and the triglyceride
101 content was determined by colorimetry (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil)
102 according to the study by CHARLES et al., 2019.

103

104 *Histological analysis*

105 The livers were fixed in a 4% paraformaldehyde solution buffered with PBS and incorporated
106 into Historesin (Leica Historesin Embedding Kit, Germany). The polymerization took place
107 over a period of 1-2 hours at room temperature and the fixed tissue was cut with the aid of a
108 microtome (Leica RM 2125, Germany) in sections of 5 μm (for histological analysis) and 3 μm
109 (immunohistochemistry) of thickness. For histological analysis, the samples were stained with
110 hematoxylin and eosin (to check for the presence / absence of nuclei), picrosirius (for collagen)
111 and Schiff's periodic acid (PAS) (for glycoproteins).

112

113 For immunohistochemistry analysis, the following protocol for removing the resin and
114 better penetration of the antibodies: toluene PA (30 min); xylene PA (30 min.); acetone
115 PA (30 min); rehydration in decreasing series of ethanol (95%, 70%, 50%, 30%), placed
116 in distilled water. The antigenic recovery was performed with pH 6.0 citrate buffer
117 (Spring Bioscience® Germany) and the slides were incubated with primary antibody
118 overnight at 4°C. The antibodies used were anti-fibronectin (1: 100) and anti-laminin (1:
119 100) (Abcam, Cambridge, UK). After this process, the samples were incubated at 37°C
120 for 30 min. with secondary antibody, revealed with substrate, contrasted with
121 hematoxylin and mounted. All images were obtained using an optical microscope (AX70,
122 Olympus Corporation, Japan) coupled with a video camera (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss,
123 Germany).

124

125 *Determination of residual DNA content*

1
2
3
4 126 The DNA quantification of the samples was done after saline extraction (BRUFORD et al.,
5 127 1992). The samples Native Chow diet (n = 6), native HC diet (n = 6), decellularized Chow diet
6 128 (n = 6), decellularized HC diet (n = 6) were lyophilized and fractionated into small fragments
7 129 isolated with extraction buffer (tris 1M, pH = 8; NaCl 5M; EDTA 0.5M, pH = 8) and analysis
8 130 buffer (extraction buffer, 10% SDS and proteinase K). After digesting the tissue, the DNA was
9 131 precipitated with NaCl, the protein precipitate was discarded, and the remaining DNA was
10 132 diluted in 100 μ L of distilled water. The quantification of the samples is done using the
11 133 NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

12
13
14
15
16
17
18 134

19 20 135 *Collagen quantification*

21
22 136 To assess the amount of collagen present in the samples Native chow diet (n = 6), native HC
23 137 diet (n = 6), decellularized chow diet (n = 6), decellularized HC diet (n = 6), indirect
24 138 quantification of the amino acid 4-hydroxyproline (main structural component of collagen). For
25 139 the standard curve, a hydroxyproline standard (Sigma Aldrich, USA) was used and for the
26 140 production of the curve, a serial dilution was made with distilled water in the proportion of 1:
27 141 1 from 2,600 μ g/mL of hydroxyproline. The fragments of the lyophilized livers from the four
28 142 groups were deposited in 50 μ L of 7 N sodium hydroxide so that alkaline hydrolysis would
29 143 occur. The test blank was a solution without tissue sample and the samples were autoclaved at
30 144 120 ° C ($p \approx 98.1$ kPa) for 40 minutes. Then, 50 μ L of 3.5 M sulfuric acid was added to acidify
31 145 the hydrolyzate. Of this sample, 50 μ L were transferred and a volume of 450 μ L of Chloramine
32 146 T 0.0025M was added. Then, 500 μ L of 0.5 M Erlich reagent was added and heated in a water
33 147 bath for 15 minutes at 60 °C. 96 well plates were used to read the absorbances, which were read
34 148 at a wavelength of 560 nm in a reader. The absorbance values obtained were used to calculate
35 149 the concentration and the reading was performed with 50 μ L for each test.

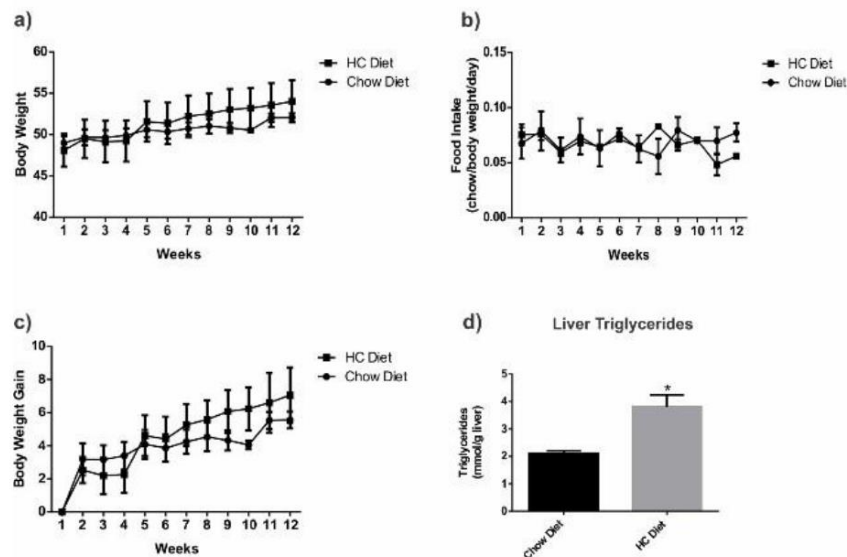
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47 150

48 49 151 *Ultrastructural analysis*

50
51 152 The samples for scanning electron microscopy (SEM) were fixed in Karnovsky. The
52 153 samples Native Chow diet (n = 6), native HC diet (n = 6), decellularized Chow diet (n =
53 154 6), decellularized HC diet (n = 6). Subsequently, cryoprotectant (30% glycerol and 0.1M
54 155 cacodylate buffer) was added and the samples were taken to a -80 freezer for freezing and
55 156 later cryogenesis in liquid nitrogen. Then, the steps of dehydration in ethanol (30%, 50%,
56 157 70%, 90% and 100%), drying in the critical point of CO₂ (Autosandri-815, Tousimis),

1
2
3
4 158 coating with 10 nm of pure gold in a vacuum sprinkler (Desk V, Denton Vacuum) and
5 159 analysis in direct mode using a scanning electron microscope (Jeol, JEM-6610 LV).
6
7 160
8 161 *Infrared spectroscopy (SR-FTIR) analysis*
9
10 162 Liver samples were lyophilized and analyzed using spectroscope (FT-MIR FTLA 2000
11 163 Bomem) Native chow diet (n = 6), native HC diet (n = 6), decellularized chow diet (n = 6),
12 164 decellularized HC diet (n = 6). The spectra were analyzed in the range of 500 to 4500 cm⁻¹ to
13 165 acquire transmittance at a rate of 4 cm⁻¹, with 50 scans for each sample. In the 1600-1700 cm⁻¹
14 166 range, the analyzed spectra were used to determine the secondary tissue structure of all four
15 167 groups (Yang et al., 2015). The peak deconvolution technique was used and the relative areas
16 168 were subsequently quantified. The analyzes were made in the Origin Pro 8.5 program (Origin
17 169 Lab Corporation, Northampton, MA, USA) where the infrared spectra were normalized and
18 170 later calculated using the second derivative spectrum, followed by smoothing by the Savitsky-
19 171 Golay method with the different conformations determined by the integration of Gaussian
20 172 profiles.
21 173
22 174 *Statistical analysis*
23 175 The analyzes were performed using the Prisma software (Prism 6, GraphPad Software, Inc.,
24 176 San Diego, CA, USA). Statistical analysis was performed using Student's t-test for independent
25 177 samples and one-way and two-way ANOVA. The differences were considered significant when
26 178 p < 0.05 and the data were expressed as mean ± standard error of the mean.
27 179
28 180
29
30
31
32 181 **Results**
33
34
35 182
36 183 *Effect of the HC diet on Body Weight, Body Weight Gain, food intake, liver lipid profile and*
37 184 *serum, and blood glucose.*
38
39
40 185 Body weight (**Figure 1a**), food intake (**Figure 1b**) and body weight gain (**Figure 1c**) were
41 186 similar in both the Chow and HC diet for 12 weeks. Despite the fact that the body weight and
42 187 food intake did not change, the animals treated with HC diet showed an increase in triglycerides
43 188 in the liver when compared to the control diet (Chow 2.1 ± 0.04 mmol/g vs HC 3.8 ± 0.21
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

189 mmol/g, $p < 0.05$) (Figure 1d). The HC group also showed an increase in serum triglycerides,
 190 total cholesterol, glucose and ALT after a 12-week treatment (Table 1).



191
 192 **Figure 1 - Time-course evaluation of body weight, body weight gain, food intake.** (a) body weight
 193 and, (b) food intake (c) body weight of chow and HC mice received a diet for 12 weeks. The data
 194 represents means \pm SEM of 6 animals per group. * $p < 0.05$ vs. chow diet.

195

Table 1- Serum lipids, glucose, Alt and AST levels in chow and HC diet mice

	Chow Diet	HC Diet
Total Cholesterol (mg/dL)	79.0 \pm 4.7	118.8 \pm 5.4 *
Triglycerides (mg/dL)	108.5 \pm 1.5	154.3 \pm 11.7*
Glucose (mg/dL)	2.1 \pm 0.0	143.3 \pm 7.6*
ALT (U/L)	21.5 \pm 2.2	46.8 \pm 9.4*
AST (U/L)	85.7 \pm 4.3	128.5 \pm 22.3

The data of serum parameters represents means \pm SEM of 6 animals per group. * $P < 0.05$ vs. Chow Diet

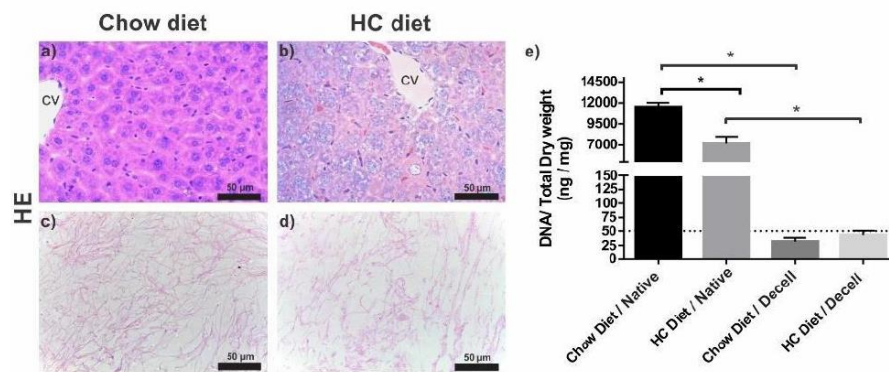
196

197

60

198 *Decellularization of liver, histological and DNA analysis*

199 Both groups were decellularized after 6 hours without macroscopic morphological differences
 200 between them. Samples stained with HE demonstrates the normal morphological pattern of the
 201 native Chow group (**Figure 2a**). While in the HC native group we observed hepatic
 202 morphological changes, lipid droplets with microvesicle pattern characteristic of steatosis in
 203 NAFLD (**Figure 2b**). Both the Chow group and the HC decellularized, cuts stained with HE, it
 204 was possible to notice the absence of cells or cellular and nucellar traces (**Figure 2c and d**).
 205 These findings corroborate the concentration of residual DNA shown in the graph in **Figure 2e**,
 206 where both the Chow and HC groups showed a significant reduction in DNA in the
 207 decellularized groups, maintaining below 50ng/mg of tissue. The non-decellularized Chow
 208 group, on the other hand, showed a significant difference in DNA when compared to HC groups.
 209



210 **Figure 2 – DNA analysis.** Representative image of liver stained with HE demonstrates the presence of
 211 cells in native groups and the absence of cells and nuclei in decellularized groups, Chow native, Chow
 212 decellularized, HC native and HC decellularized (**a-b-c-d**). The graphic (**e**) shows the difference of the
 213 residual DNA of the scaffold of the Chow native, Chow decellularized, HC native and HC
 214 decellularized. CV: centrilobular vein.

215

216

217

218

219

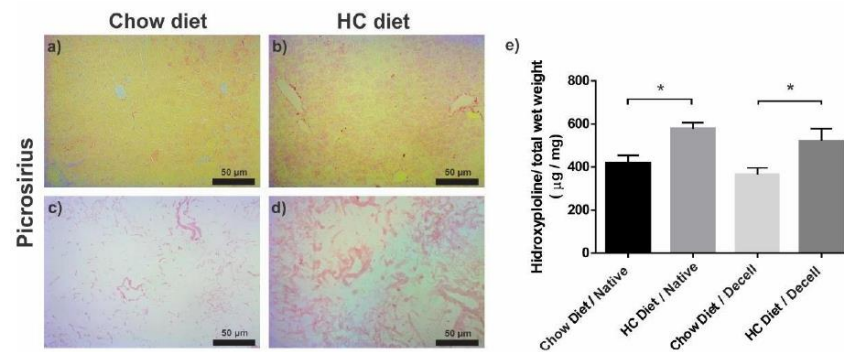
220

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

221

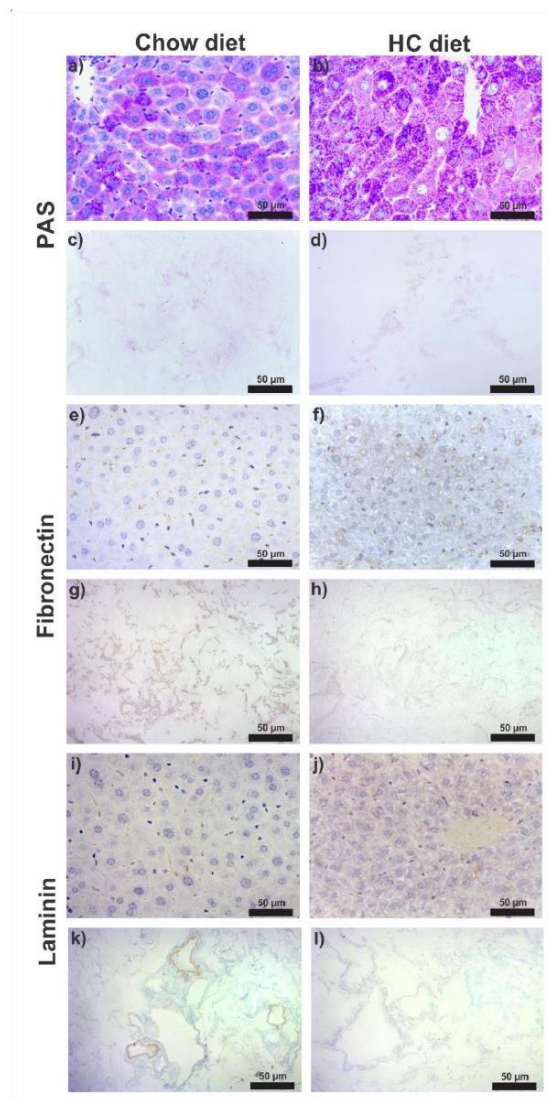
222 *Effect of diet and decellularization on collagen and glycoproteins*

223 Both the effect of the HC diet and the maintenance of collagen after decellularization were
224 evaluated by staining with Picro-sirius red, where it was possible to observe an increase in the
225 amount of collagen fibers in the native HC group (**Figure 3 c and d**). The indirect quantification
226 of the hydroxyproline amino acid (**Figure 3e**) also demonstrated a significant increase in
227 collagen both in the native HC group compared to the native Chow group (418.7 ± 35.9 vs
228 540.9 ± 32.8) and in the decellularized HC group compared to the decellularized Chow group (
229 364.4 ± 31.6 vs 521.1 ± 44.1). Maintenance of nonspecific glycoproteins was assessed with
230 PAS staining. **Figure 4c and d** shows the maintenance of glycoproteins from the decellularized
231 tissue Chow and in the decellularized HC, although noticing a small reduction in the
232 decellularized HC group. The immunomarking of fibronectin on the MEC of decellularized
233 Chow and decellularized HC tissues demonstrated a reduction of this glycoprotein in the HC
234 group (**Figure 4g and h**). In the **Figure 4k and l**, it is observed that laminin also showed a
235 reduction in the decellularized HC group in relation to the decellularized Chow group.



236

237 **Figure 3 – Collagen analysis.** Images of Chow native, Chow decellularized, HC native and HC
238 decellularized stained with picro-sirius red demonstrating the presence of collagen in the tissues before
239 and after decellularization (**a-b-c-d**). The graphic **e**) shows the difference between liver collagen from
240 Chow native, Chow decellularized, HC native and HC decellularized groups. The values are represented
241 with mean ± SEM, * p < 0.05. Scale bar: 50 µm



242

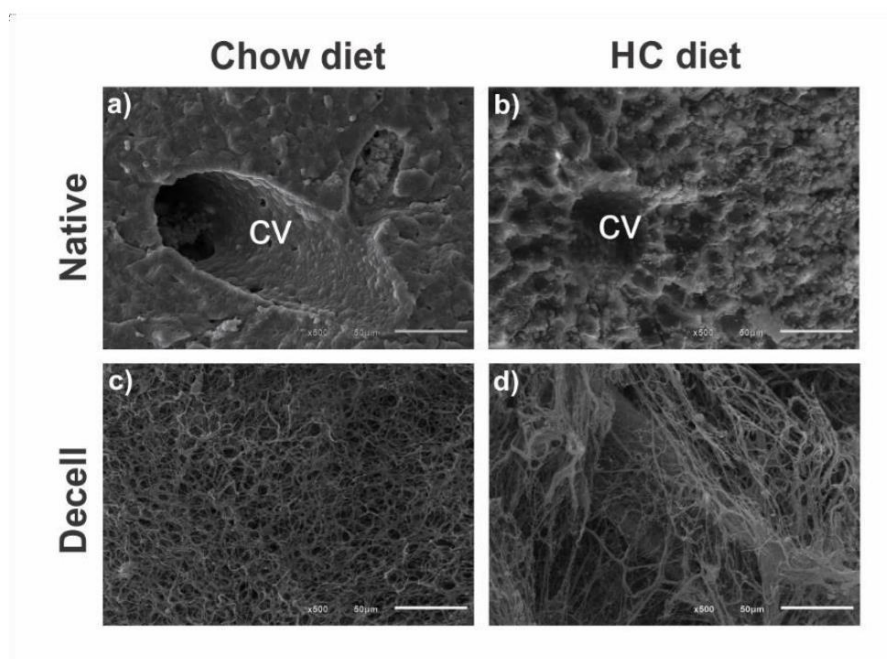
243 **Figure 4 – Glycoproteins analysis.** Image of Chow native, Chow decellularized, HC native and HC
 244 decellularized with PAS stained scaffold, demonstrating the presence of glycoproteins before and after
 245 decellularization (a-b-c-d). Immunohistochemical analysis of laminine glycoprotein in Chow native,
 246 Chow decellularized, HC native and HC decellularized groups before and after decellularization (e-f-g-
 247 h). Immunohistochemical analysis of fibronectin glycoprotein in Chow native, Chow decellularized,
 248 HC native and HC decellularized groups before and after decellularization (i-j-k-l).

249

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

250 *Ultrastructural characterization*

251 SEM analysis was used to assess the effect of diet on the liver and ECM, as well as the effect
252 of decellularization on ECM. In this way, the native group HC presented a change in the
253 microarchitecture of the scaffold, visible disorganization of the fibers of the MEC characteristic
254 of DHGNA. It is possible to observe microvesicles of lipids accumulated in the liver tissue,
255 characteristic of steatosis, as well as morphological changes in the vascular structure (**Figure 5**
256 **b**). In the decellularized Chow group, it was possible to perceive the integrity of the ECM and
257 the preservation of vascular integrity, as well as the absence of liver cells (**Figure 5b**). The
258 decellularized HC group, in turn, showed absence of liver cells, but there was a structural
259 change in the collagen fiber network in the area of the hepatic parenchyma of the MEC, from
260 positioning to the three-dimensional structure of the scaffold mesh.



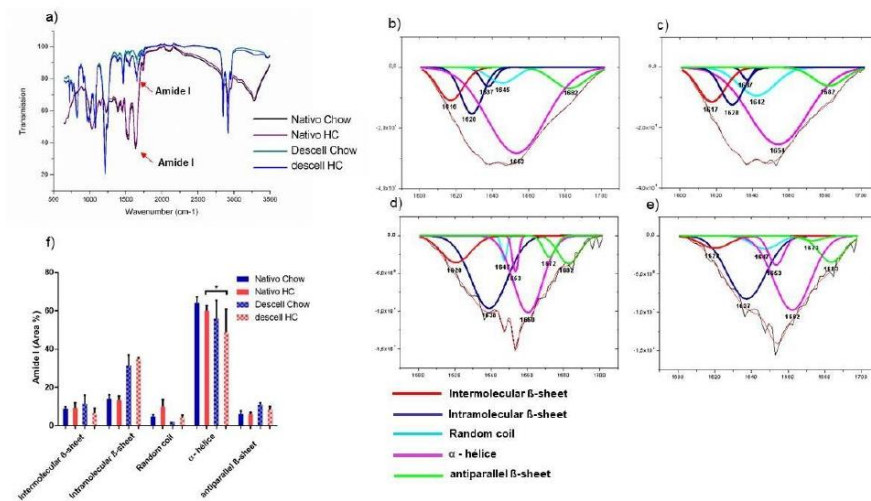
261

262 **Figure 5 – Ultrastructural analysis of the liver native and scaffold.** Scanning electron microscopy
263 demonstrated the morphology of the hepatic parenchyma of Chow native and HC native group (**a–b**).
264 The absence of cells and cellular debris as to the scaffold morphology was demonstrated (**c–d**). Scale
265 bars: a-b-c-d: 50 μm. CV: centrilobular vein.

266

267 *Characterization of the extracellular matrix by infrared (SR-FTIR)*

268 The infrared spectra representative of the native and decellularized liver tissue of the four
 269 groups were evaluated by SR-FTIR. Peaks of amide I (1600 - 1700), characteristic of collagen,
 270 were present in all groups (**Figure 6a**). The deconvolution of the amide I band spectra was
 271 observed in (**Figure 6b**) in order to determine the conformation of the collagen secondary
 272 structure. Both in the native Chow group and in the native HC, the largest peak between (1650
 273 cm⁻¹) was observed, which is related to the α -helix structure (STUART, 2004); around the main
 274 peak it was possible to perceive several minor peaks in all groups, characteristic of the
 275 intermolecular beta structure, intramolecular beta structure, random coil, β 3 - helix turned, beta
 276 sheet turned (**Figure 6b**). After quantifying the percentages related to fractions related to the
 277 amide I band, it was possible to observe a reduction in the average percentage of the alpha-helix
 278 area in the HC Native groups (60.0 ± 1.3) compared to decellularized HC (48.7 ± 6.1) (**Figure**
 279 **6c**).



280

281 **Figure 6 – Infrared analysis of the native and decellularized liver.** All spectra were evaluated in
 282 wavelengths from 500 to 4500 cm⁻¹, with 50 readings in each sample, with a rate of 4 cm⁻¹, with 50
 283 scans. The analysis of the spectrum range of 1600-1700 cm⁻¹ was used to determine the secondary
 284 structure of tissue proteins. Comparison of the wave spectra between the groups Chow native (black
 285 line), Chow decellularized (green line), native HC (purple line) and HC decellularized (blue line),
 286 demonstrating the difference between the transmittance of each tissue (**a**). The representative
 287 deconvolution of each fabric showing different conformation of the secondary structure of the Amia I
 288 band of each group (**b-c-d-e**). The relative area of each spectrum calculated using the second derivative

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 289 spectrum followed by smoothing by the Savitsky-Golay method with the different conformations
5 290 determined by the Gaussian profiles.
6
7 291
8 292 **Discussion**
9
10 293
11
12 294 Our study provides evidence that chronic consumption of a high refined carbohydrate (HC) diet
13
14 295 for 12 weeks is responsible for metabolic and morphological changes in the liver, specifically
15 296 the ECM. Other studies have also evaluated the effect of the HC diet on metabolism and on the
16 297 liver (OLIVEIRA et al., 2015), however our study sought to evaluate the effects on the liver
17 298 ECM and its application to tissue bioengineering. Thus, the characteristics of MEC may guide
18 299 future processes of decellularization and recellularization of organs donated by individuals
19 300 affected by NAFLD with possible food source.
20
21
22
23
24
25 301 Studies used the HC diet for different periods in order to evaluate this effect in different organs
26 302 and consequent physiological responses. NIÑO et al. (2020), demonstrated a small increase in
27 303 weight gain in female rats treated with HC diet for 15 days. However, male BALB / c mice fed
28 304 with HC for 12 weeks showed no increase in weight gain (OLIVEIRA et al., 2013). Such data
29 305 corroborate with our results in that the animals were treated with the HC diet for 12 weeks.
30 306 Food consumption and body weight also had no difference between groups in our study.
31 307 However, there was a significant increase in serum glucose, total cholesterol, and ALT levels.
32 308 Studies have shown that diets high in carbohydrates interfere with lipid metabolism by reducing
33 309 oxidation of acids, increasing hepatic secretion of triglycerides and cholesterol (CHEN et al.,
34 310 2011) increase in ALT is characteristic of individuals with NAFLD (CHEN et al., 2008). We
35 311 also evidence that the HC diet favored an increase in triglyceride in the liver tissue, as
36 312 demonstrated by (OLIVEIRA et al., 2015).
37
38 313 Histological and ultrastructural analysis by scanning microscopy showed fat microvesicles,
39 314 specific to microsteatosis, such vesicles are classified as irreversible (TANDRA et al., 2011)
40 315 characteristic of advanced phase NAFLD. In fact, both histological and ultrastructural
41 316 morphological analysis are consistent with an increase in hepatic triglycerides found. Such
42 317 results corroborate with other studies using HC diet in a chronic way in which the treated
43 318 animals presented NAFLD (OLIVEIRA et al., 2015).
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53 319 The livers of animals treated with HC and Chow diets were decellularized and this process was
54 320 effective in removing cells and genetic material with DNA levels below 50ng / mg. Regarding
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 321 the decellularization time, both groups showed similarity, with 5 hours decellularization was
5 322 effective. DNA quantification also demonstrated a reduction in DNA in the native HC group, a
6 323 reduction that may be due to the increase in fibrosis and hepatocyte apoptosis characteristic of
7 324 NAFLD (KANDA et al., 2018). In addition, fibrosis did not hinder the decellularization
8
9 325 process.
10
11
12 326 After histological analysis of staining with Picro-sirius red and in the analysis of
13 327 hydroxyproline, we observed an increase in collagen in the liver of individuals treated with HC
14
15 328 diet, a result also found by Oliveira et al., 2015. The increase was also observed in the
16 329 decellularized HC groups, demonstrating that the decellularization process did not regress the
17
18 330 deposited collagen after treatment with HC diet.
19
20
21 331 Immunohistochemical analysis for fibronectin and laminin demonstrated that such
22 332 glycoproteins are lost in individuals treated with the HC diet, and both glycoproteins are
23
24 333 essential for cell signaling and cell recognition in the processes of recellularization (GILPIN;
25
26 334 YANG, 2017). Laminins are synthesized by hepatocytes and sinusoid cells, considered one of
27
28 335 the most important glycoproteins in hepatic ECM (AUMAILLEY; SMYTH, 1998).
29 336 Fibronectin, also an ECM glycoprotein, participates as the laminin in the scaffold cell
30
31 337 interaction (SCARRITT et al., 2015). The results of the present study suggest a reduction in
32
33 338 laminin and fibronectin in animals treated with HC diet, but the loss of these two important
34
35 339 glycoproteins was contrary to findings from SALIM et al., 2019, in which Swiss albino rats
36 340 induced by carbon tetrachloride (CCl₄), in order to generate liver fibrosis, had an increase in
37
38 341 the level of laminin and fibronectin. However, studies like the one by KLAAS et al., 2016,
39 342 evaluate the hepatic ECM of CBA / J mice treated with CCl₄ and DDC evaluating the
40
41 343 interaction of the two xenobiotics in the generation of induced fibrosis, it was noticed that an
42
43 344 increase in fibronectin and downregulation of laminins α 3, α 5, γ 2, and when CCl₄ and DDC
44
45 345 were used and reduction of laminin β 2.
46
47
48 346 In the ultrastructural analysis, it was possible to notice changes in the extracellular matrix
49 347 morphology of the decellularized HC group. Collagen is synthesized and secreted in individuals
50
51 348 who suffer liver damage, including injuries that lead to cell apoptosis (PELLICORO et al.,
52 349 2012). The fibers of the ECM of individuals treated with HC diet lost the three-dimensional
53
54 350 structure of the scaffold mesh, and studies of liver fibrosis also demonstrated similar changes
55
56 351 in the ECM, as well as dysregulation of collagen synthesis and change in stiffness and density
57
58 352 (BAIOCCHINI et al., 2016). It is noteworthy that the extracellular matrix morphology is
59
60

1
2
3 353 essential for the formation of recellularized liver tissue so that they can maintain the
4
5 354 morphophysiology of this liver (KLAAS et al., 2016).
6
7 355 The secondary structure of the collagen was used to demonstrate maintenance and possible
8
9 356 changes after the deconvolution of the Amida I band by SR-FTIR in regions of wavelength
10
11 357 1600-1700 cm^{-1} . (KLAAS et al., 2016). The evaluation carried out after deconvolution and
12
13 358 quantification by peak area suggests that decellularized treated individuals regressed the area
14
15 359 of the specific region to alpha-helix, a characteristic factor of changes in the constitution of
16
17 360 collagen. The use of the alpha-helix region to characterize the quality of MEC was also used in
18
19 361 the work of (NARA et al., 2015).
20
21 362
22 363 **Conclusion**
23
24 364 This study demonstrates that the consumption of HC diet induces accumulation of
25
26 365 triglycerides in the liver without gaining body weight. In addition to the increase in serum
27
28 366 levels of glucose, total cholesterol, triglycerides and ALT. The liver decellularization
29
30 367 process was not affected by the HC diet, despite the increase in collagen and the alteration
31
32 368 of its alpha-helix structure by FTIR analysis. Reduction of hepatic laminin and fibronectin
33
34 369 has also been observed in individuals with NAFLD. These changes in ECM can alter the
35
36 370 recellularization and functionalization process of the liver, which would make the use of
37
38 371 donor livers with NAFLD unfeasible. Therefore, the screening of healthy organs for tissue
39
40 372 bioengineering becomes a necessity.
41
42 373
43 374 **Conflict of Interest**
44
45 375 The authors declare that there is no conflict of interest.
46
47 376
48 377 **Author Contributions**
49
50 378 BDB carried out the experimental study and acquisition, analysis and drafted the
51
52 379 manuscript. BDB, TECZ and GHT, adaptation and development of decellularization
53
54 380 protocols, histology, quantification and interpretation of hydroxyproline and DNA. BVN
55
56 381 contributed to the conception and supervision of the study, data interpretation and writing
57
58 382 manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.
59
60 383
384
385

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

386 **Funding**

387 This study was financed in part by the grant from the Conselho Nacional de
388 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brazil (process 439439/2018-3).

389

390 **Acknowledgments**

391 The authors thank Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Fundação de Amparo
392 à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), Coordenação de Aperfeiçoamento de
393 Pessoal de Nível Superior (CAPES). BVN and BDB are supported by a CNPq fellowship
394 (#160990/2019-0) and FAPES/CAPES-PROCAP N° 8/2017 (#78/2017) respectively. We
395 also thank the LUCCAR and LABIOM UFES' facilities.

396

397 **Referência**

398 ANDRONESCU, C. I.; PURCAREA, M. R.; BABES, P. A. Nonalcoholic fatty liver disease:
399 epidemiology , pathogenesis and therapeutic implications. v. 11, n. 1, p. 20–23, 2018.

400 AUMAILLEY, M.; SMYTH, N. The role of laminins in basement membrane function.
401 p. 1–21, 1998.

402 BAIOCCHINI, A. et al. Extracellular matrix molecular remodeling in human liver
403 fibrosis evolution. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–14, 2016.

404 BAPTISTA, P. M. et al. Whole organ decellularization - A tool for bioscaffold
405 fabrication and organ bioengineering. **Proceedings of the 31st Annual International
406 Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society: Engineering
407 the Future of Biomedicine, EMBC 2009**, p. 6526–6529, 2009.

408 BEDOGNI, G. et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease:
409 The Dionysos nutrition and liver study. **Hepatology**, v. 42, n. 1, p. 44–52, jul. 2005.

410 BENEDICT, M. et al. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. v. 9, n. 16,
411 p. 715–732, 2017.

412 BRUFORD, M. W. et al. **Single-locus and multilocus DNA fingerprinting**. [s.l.: s.n.].

413 CHARLES, S. et al. The tributyltin leads to obesogenic mammary gland abnormalities
414 in adult female rats. **Toxicology Letters**, v. 307, n. February, p. 59–71, 2019.

415 CHEN, G. et al. Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and a sucrose-
416 containing beverage intake , alone or in combination , on inducing metabolic syndrome
417 in Wistar rats and C57BL / 6J mice. **Metabolism**, v. 60, n. 2, p. 155–164, 2011.

418 CHEN, Z. et al. Relationship between alanine aminotransferase levels and metabolic
419 syndrome in nonalcoholic fatty liver disease. v. 9, n. 8, p. 616–622, 2008.

420 CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. Biomaterials An overview of
421 tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–
422 3243, 2011.

423 EVERWIEN, H. et al. Strategies based on organ decellularization and recellularization.

424

- 1
2
3 425 p. 571–585, [s.d.].
4
5 426 GARRETA, E. et al. **Tissue engineering by decellularization and 3D**
6 427 **bioprinting** *Materials Today*, 2017.
7
8 428 GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From
9 429 Processing Techniques to Applications. v. 2017, 2017.
10
11 430 Kawai, T. *et al.* Brief report: HLA-mismatched renal transplantation without
12 431 maintenance immunosuppression. *New England Journal of Medicine*. **358** (4), 353-361,
13 432 2008.
14 433
15 434 KANDA, T. et al. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. v. 24, n. 25, p.
16 435 2661–2672, 2018.
17
18 436 KLAAS, M. et al. The alterations in the extracellular matrix composition guide the
19 437 repair of damaged liver tissue. n. February, p. 1–12, 2016.
20
21 438 MIRMIRAN, P. et al. Relationship between diet and non-alcoholic fatty liver disease: A
22 439 review article. *Iranian Journal of Public Health*, v. 46, n. 8, p. 1007–1017, 2017.
23
24 440 NARA, S. et al. **RSC Advances**. [s.l: s.n.].
25
26 441 NIÑO, O. et al. High-refined carbohydrate diet leads to polycystic ovary syndrome-like
27 442 features and reduced ovarian reserve in female rats. **Toxicology Letters**, 2020.
28
29 443 OLIVEIRA, M. C. DE et al. Platelet-activating factor modulates fat storage in the liver
30 444 induced by a high-refined carbohydrate-containing diet. **Journal of Nutritional**
31 445 **Biochemistry**, v. 26, n. 9, p. 978–985, 2015.
32
33 446 OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and Sustained Inflammation and Metabolic Dysfunction
34 447 Induced by High Refined Carbohydrate-Containing Diet in Mice. v. 21, n. 9, p. 396–
35 448 406, 2013.
36
37 449 PELLICORO, A. et al. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by
38 450 macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. **Hepatology**,
39 451 2012.
40
41 452 SALIM, M. S. et al. Decellularized liver bioscaffold : a histological and
42 453 immunohistochemical comparison between normal , fibrotic and hepatocellular
43 454 carcinoma. p. 35–47, 2019.
44
45 455 SCARRITT, M. E. et al. A review of cellularization strategies for tissue engineering of
46 456 whole organs. v. 3, n. March, p. 1–17, 2015.
47
48 457 SHUPE, T. et al. Method for the decellularization of intact rat liver. **Organogenesis**, v.
49 458 6, n. 2, p. 134–136, 2010.
50
51 459 STRUECKER, B. et al. Improved rat liver decellularization by arterial perfusion under
52 460 oscillating pressure conditions. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative**
53 461 **Medicine**, 2017.
54
55 462 TANDRA, S. et al. Presence and significance of microvesicular steatosis in
56 463 nonalcoholic fatty liver disease. v. 55, 2011.
57
58 464 VALENZUELA, N.M.; REED, E.F. ANTIBODY-mediated rejection across solid organ
59 465 transplants: manifestations, mechanisms, and therapies. *The Journal of clinical*

1
2
3
4 466 investigation, v. 127, n. 7, p. 2492-2504, 2017.
5
6 467 WANG, X. et al. Decellularized liver scaffolds effectively support the proliferation and
7 468 differentiation of mouse fetal hepatic progenitors. **Journal of Biomedical Materials**
8 469 **Research - Part A**, 2014.
9
10 470 YANG, H. et al. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous
11 471 solution using Fourier transform IR spectroscopy. **Nature Protocols**, v. 10, n. 3, p.
12 472 382–396, 2015.
13
14 473 YEH, M. M.; BRUNT, E. M. Pathology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease
15 474 Histopathologic Features of NASH. **Am J Clin Pathol**, 2007.
16 475
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CONCLUSÃO

Esse estudo demonstra que o consumo de dieta HC induz acúmulo de triglicerídeos no fígado, aumento de colágeno na MEC, e também o aumento de glicose, colesterol total, triglicerídeos e ALT níveis séricos. No processo de descelularização do fígado de animais tratados com dieta HC e animais Chow, ambos apresentaram total descelularização, caracterizando eficiência do processo. Apesar disso, animais que receberam dieta HC apresentaram aumento de colágeno na MEC, apresentando alterações na estrutura da malha e a conformação das estruturas das fibras. Glicoproteínas, como laminina e fibronectina foram perdidas nos grupos HC e, ao avaliar a estrutura secundária do colágeno na banda amida I, ambos os grupos apresentaram picos representativos nesses espectros. Porém, após a deconvolução do pico representativo da Amida I, constatamos a redução da área relativa ao pico característica da conformação alfa-hélice do colágeno do grupo tratado com a dieta HC. Os efeitos dessas mudanças podem orientar novos trabalhos de recelularização em indivíduos com DHGNA

REFERÊNCIAS

ABDEL-MISIH, S. R. Z.; BLOOMSTON, M. Liver Anatomy. **Surgical Clinics of North America**, v. 90, n. 4, p. 643–653, ago. 2010.

ABO, T. et al. Extrathymic pathways of T-cell differentiation in the liver and other organs. **International reviews of immunology**, v. 11, n. 1, p. 61–102, 1994.

BADYLAK, S. F. et al. **Engineered whole organs and complex tissues** **The Lancet**, 2012.

BEDOSSA, P.; PARADIS, V. Liver extracellular matrix in health and disease. **The Journal of Pathology**, v. 200, n. 4, p. 504–515, jul. 2003.

BISSELL, D. M. et al. Transcriptional regulation of the albumin gene in cultured rat hepatocytes. Role of basement-membrane matrix. **Molecular biology & medicine**, v. 7, n. 2, p. 187–97, abr. 1990.

BLACHIER, M. et al. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 3, p. 593–608, mar. 2013.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents*. **Obesity**, v. 15, n. 4, p. 798–808, abr. 2007.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents*. **Obesity**, v. 15, n. 4, p. 798–808, abr. 2007.

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

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. **An overview of tissue and whole organ decellularization processes** **Biomaterials**, 2011.

CRESCENZO, R. et al. Fructose supplementation worsens the deleterious effects of short-term high-fat feeding on hepatic steatosis and lipid metabolism in adult rats. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 9, p. 1203–1213, 1 set. 2014.

DALEY, W. P.; PETERS, S. B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. 2008.

FAN, J.-G.; QIAO, L. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. **Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT**, v. 8, n. 3, p. 233–40, jun. 2009.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010.

FRIEDMAN, J. M. Causes and control of excess body fat. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 340–342, 20 maio 2009

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

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. **Decellularization of tissues and organs** **Biomaterials**, 2006.

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. **Decellularization of tissues and organs** **Biomaterials**, 2006.

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

GOLABI, P. et al. **Hepatocellular carcinoma and non-alcoholic fatty liver disease.** **Hepatology International**, v. 13, n. 6, p. 688–694, 2019.

GRESSNER, A. M. Hepatic proteoglycans--a brief survey of their pathobiochemical implications. **Hepato-gastroenterology**, v. 30, n. 6, p. 225–9, dez. 1983.

GRISHAM, J. W. Cell types in rat liver cultures: their identification and isolation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 53–54, n. 1–2, 1983.

GROSS, L. S. et al. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 774–779, 1 maio 2004

GROSS, L. S. et al. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of

type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 774–779, 1 maio 2004.

GROSS, L. S. et al. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 774–779, 1 maio 2004.

HREBIKOVA, H.; DIAZ, D.; MOKRY, J. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix. **Biomedical Papers**, v. 159, n. 1, p. 012–017, 9 mar. 2015.

HUDSON, T. W. et al. Optimized Acellular Nerve Graft Is Immunologically Tolerated and Supports Regeneration. **Tissue Engineering**, v. 10, n. 11–12, p. 1641–1651, nov. 2004.

HUSSEY, G. S.; DZIKI, J. L.; BADYLAK, S. F. **Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine** *Nature Reviews Materials*, 2018.

HUSSEY, G. S.; DZIKI, J. L.; BADYLAK, S. F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. **Nature Reviews Materials**, v. 3, n. 7, p. 159–173, 2018.

HYNES, R. O. **The evolution of metazoan extracellular matrix** *Journal of Cell Biology*, 2012.

JACOBS, A. et al. An Overview of Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Past to Present. In: **Current Protocols in Mouse Biology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016. p. 185–200.

KELLEY, G. L.; ALLAN, G.; AZHAR, S. High Dietary Fructose Induces a Hepatic Stress Response Resulting in Cholesterol and Lipid Dysregulation. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 548–555, fev. 2004.

KHAN, F.; TANAKA, M. **Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering**. p. 1–14, 2018.

LANGER, R. SCIENCE. **The Educational Forum**, v. 15, n. 1, p. 119–120, nov. 1993.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. *Science*, v. 260, p. 906–920, 1993.

LIM, J. S. et al. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 5, p. 251–264, 6 maio 2010.

LIN, X.-Z. et al. Computer morphometry for quantitative measurement of liver fibrosis: Comparison with Knodell's score, colorimetry and conventional description reports. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 1, p. 75–80, jan. 1998.

LU, P. et al. Extracellular Matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 12, p. 1–24, 2011.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A. The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 51, n. 1, p. 57–74, jul. 1984.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A. The hepatic extracellular matrix. II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl₄-induced cirrhosis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 53, n. 2, p. 166–86, ago. 1985.

MOSER, Philipp T.; OTT, Harald C. Recellularization of organs: what is the future for solid organ transplantation?. **Current opinion in organ transplantation**, v. 19, n. 6, p. 603-609, 2014.

NABA, A. et al. The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. **Matrix Biology**, v. 49, p. 10–24, 2016.

NG, S.-F. et al. Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 963–966, 20 out. 2010.

OLIVEIRA, C. S. et al. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 28, 18 nov. 2010

PLENICEANU, O.; HARARI-STEINBERG, O.; DEKEL, B. Concise review: Kidney stem/progenitor cells: differentiate, sort out, or reprogram? **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v.28, n. 9, p. 1649–60, set. 2010.

ROJKIND, M.; GIAMBRONE, M. A.; BIEMPICA, L. Collagen types in normal and

cirrhotic liver. **Gastroenterology**, v. 76, n. 4, p. 710–9, abr. 1979.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. **Obesity**, v. 19, n. 6, p. 1109–1117, 17 jun. 2011.

SAXENA, R.; THEISE, N. D.; CRAWFORD, J. M. Microanatomy of the human liver?exploring the hidden interfaces. **Hepatology**, v. 30, n. 6, p. 1339–1346, dez. 1999.

SCHAEFER, L.; SCHAEFER, R. M. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. p. 237–246, 2010.

SCHUPPAN, D. et al. Hepatocytes as a source of collagen type XVIII endostatin. **The Lancet**, v. 352, n. 9131, p. 879–880, set. 1998.

SCHUPPAN, D. Structure of the Extracellular Matrix in Normal and Fibrotic Liver: Collagens and Glycoproteins. **Seminars in Liver Disease**, v. 10, n. 01, p. 1–10, 17 fev. 1990.

SELLARO, T. L. et al. Maintenance of Human Hepatocyte Function In Vitro by Liver-Derived Extracellular Matrix Gels. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 3, p. 1075–1082, mar. 2010.

SHAFIEE, A.; ATALA, A. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. **Annual Review of Medicine**, v. 68, n. 1, p. 29–40, 2017.

SHUPE, T. et al. Method for the decellularization of intact rat liver. **Organogenesis**, v. 6, n. 2, p. 134–136, 2010.

TAPIAS, Luis F.; OTT, Harald C. Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs. **Current opinion in organ transplantation**, v. 19, n. 2, p. 145, 2014

TEIXEIRA, J. M. D. C. et al. Plano Estadual De Saúde - Pes - 2012 - 2015 - Secretaria De Estado Da Saúde De São Paulo De São Paulo. p. 196, 2012.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structureAdvanced Drug Delivery Reviews, 2016.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. **The liverCurrent BiologyCell**

Press, , 6 nov. 2017.

VAN HERCK, M.; VONGHIA, L.; FRANQUE, S. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—A Starter’s Guide. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1072, 27 set. 2017.

YANNAS, I. V., BURKE, J. F., ORGILL, D. P. & SKRABUT, E. M. **Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin**. *Science* 215, 174–176 (1982).

YUE, B. Biology of the extracellular matrix: An overview. **Journal of Glaucoma**, v. 23, n. 8, p. S20–S23, 2014.

ZHAO, P.; MI, H.; TURNG, L. **Fabrication of scaffolds in tissue engineering : A review**. n. December, 2017.

ANEXOS

ANEXO I – PROTOCOLO DE ÉTICA

	Universidade Federal do Espírito Santo	
CERTIFICADO		
Certificamos que a proposta intitulada EFEITO DA DIETA HIPERGLICÊMICA SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR HEPÁTICA APLICADA À BIOENGENHARIA TECIDUAL		
Registrada sob o n.º 57/2019	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 8.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle 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: Agosto/2020 a julho/2024	Finalidade: Pesquisa	
Espécie(s): Camundongo (Mus musculus)		
Linhagem(ns)/raça(s): Swiss		
Peso: 40 a 50 gramas	Idade: 6 semanas	Sexo: Macho
Número de animais: 160		
Origem: Biotério Central, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Maruípe, Vitória-ES.		
		Vitória-ES, 24 de agosto de 2020
		 Breno Souza Salgado Coordenador da CEUA-UFES
<small>Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA Avenida Marechal Campos, 1468 - Maruípe - Vitória/ES - CEP 29043-910 - Telefone: (27) 3335-7026 - ceua@ufes.br - www.ceua.ufes.br</small>		

ANEXO II – PATENTE REFERENTE A SISTEMA DE MONTAGEM IN SITU DE FIBRONECTINA EM SCAFFOLDS DESCELULARIZADOS

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): SISTEMA DE MONTAGEM IN SITU DE FIBRONECTINA EM SCAFFOLDS DESCELULARIZADOS

Resumo: Trata-se de um processo de montagem in situ de fibronectina humana em scaffolds descelularizados, capaz de conferir à matriz extracelular ganho funcional através da recomposição da mesma, que normalmente é removida durante o processo de descelularização. A fibronectina caracteriza-se pela sua polivalência, atuando na intermediação de processos exclusivamente celulares, como sinalização, migração, proliferação e diferenciação, além de possuir um caráter estrutural imprescindível para a matriz extracelular, por tais motivos, a recomposição da mesma é, de fato, de extrema importância para a reconstrução de órgãos e tecidos através da engenharia tecidual. O processo de montagem da molécula fibronectina desenvolvido e relatado aqui é de baixo custo, baixa complexidade, atóxico e não imunogênico. Além disso, devido à flexibilidade da molécula fibronectina, o processo pode ser adaptado para diferentes órgãos descelularizados, sejam eles complexos ou não. Não obstante, ressalta-se também que, o sistema de montagem pode ser adaptado para pequenos fragmentos teciduais descelularizados.

Figura a publicar: todas