

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rayssa Helena Arruda Pereira

**Desenvolvimento de um Sistema de Sensoriamento
Óptico Aplicado à Bioengenharia Tecidual de
Órgãos Descelularizados**

Vitória

2020

Rayssa Helena Arruda Pereira

**Desenvolvimento de um Sistema de Sensoriamento
Óptico Aplicado à Bioengenharia Tecidual de
Órgãos Descelularizados**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), ponto focal Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira.

Vitória

2020

Desenvolvimento de um Sistema de Sensoriamento Óptico Aplicado à Bioengenharia Tecidual de Órgãos Descelularizados

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), ponto focal Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em : ____ / ____ / ____

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

Prof^a. Dr^a. Rosa Amalia Fireman Dutra
Universidade Federal de Pernambuco – Examinador Interno

Prof^a. Dr^a. Maria José Pontes
Universidade Federal do Espírito Santo - Examinadora Externa

Prof. Dr. Adilson Ribeiro Prado
Instituto Federal do Espírito Santo - Examinador Externo

Prof^a. Dr^a. Airlane Pereira Alencar
Universidade de São Paulo - Examinador Externo

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Breno Valentim Nogueira, por todo o apoio e confiança. Pelas orientações, a atenção, o respeito e o esforço desempenhado para o meu crescimento acadêmico.

Aos Professores Dra. Maria José Pontes, Dra Rosa Amália Fireman Dutra, Dr. Adilson Ribeiro Prado e Dra Airlane Pereira Alencar por aceitarem estar nessa banca e por se disporem a contribuir com este trabalho.

À Professora Dra. Airlane Pereira Alencar pela contribuição ímpar que possibilitou o engrandecimento deste trabalho. Pelo carinho e pela disposição ao me ajudar e me receber em São Paulo.

Ao Professor Dr. Adilson Ribeiro Prado pelo conhecimento repassado, pelas orientações e pelo apoio intelectual e emocional dispensados durante todo esse período.

Aos Professores Dr. Marco César Cunegundes Guimarães e Dr. Jairo Pinto de Oliveira pelo conhecimento constantemente repassado e pelo apoio e dedicação à ciência.

Aos Professores Dr. Teodiano Freire Bastos Filho e Dr. André Romero da Silva pelas contribuições realizadas no momento da qualificação desta tese.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do ponto focal da UFES pela oportunidade concedida neste centro de pesquisa e pelos encontros acadêmicos cuidadosamente preparados.

Aos meus caros amigos Tadeu, Flávio, Bruno, Natália, Wanderson, Arícia, Gabriel, Laryssa, Fernanda, Gabriela, Suely, Marcos, Rafa, Rodolpho, Júlia, Raquel, Vanessa, Luísa e todos os demais colegas do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins pelas preocupações e tarefas compartilhadas, pelas conversas agradabilíssimas e pelas contribuições diárias à ciência.

Aos meus pais, Maristela e Vinícius, pelo amor incondicional, pelo apoio material e emocional, pela atenção e por serem minha inspiração de ser humano.

Ao meu esposo, Esthefano, por compartilhar tanto amor, por ser o meu maior amigo e apoiador, melhor ouvinte e conselheiro durante todo esse processo.

Aos meus irmãos, Vinícius e Patrícia, por serem tão amorosos e sempre advogarem por mim. Pelo amor incondicional, pela amizade e por me orgulharem tanto.

Aos meus queridos e amados avós, Eudete e João, pelo apoio incondicional e pelo amor doado. Por serem uma inspiração de vida e por nunca me deixarem de fora de suas orações.

À minha Tia Flávia, pelos conselhos, pelo carinho, pelas boas risadas e por sempre estar perto ainda que geograficamente distante.

À minha avó Thereza e aos meus tios Eduardo e Helena pelo amor compartilhado e por sempre torcerem por mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida (CAPES 1591457), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ 315017/2018-0 e 439439/2018-3) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES 0606/2015, 526/2018) pelo suporte financeiro, e à Universidade Federal do Espírito Santo pelo apoio material, pela estrutura e pela oportunidade, indispensáveis para a concretização deste trabalho.

*"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê."*

(Arthur Schopenhauer)

Sumário

1.	Introdução	17
1.1	Objetivos	20
2.	Revisão de Literatura	21
	I. Cenário do Transplante de Órgãos	21
	II. Cenário da Bioengenharia de Órgãos Descelularizados	25
	III. Matriz Extracelular	29
	IV. Propriedades Ópticas dos Tecidos Biológicos	35
3.	Materiais e Métodos	40
4.	Resultados	51
	I. Quantificação de DNA, de Colágeno e Análise das Massas	51
	II. Sistema de Sensoriamento Óptico da Descelularização	53
	III. Modelo Matemático do Perfil Óptico	55
	IV. Avaliação Histológica e Quantificação de Glicosaminoglicanos	57
	V. Espectroscopia no Infravermelho e Espalhamento Raman	59
	VI. Espectro Eletromagnético do Perfil Óptico	62
	VII. Perfil Óptico e Imagens com Fontes Luminosas de Diferentes Comprimentos de Onda.....	64
5.	Discussão	69
6.	Conclusão	78
7.	Referências	79
8.	Anexos	88
	I. Figuras Suplementares	88
	II. Certificados	93

RESUMO

A subjetividade da avaliação dos processos individuais de descelularização de órgãos é uma das principais fragilidades da técnica, a qual pode restringir a reprodutibilidade do repovoamento celular e do transplante. Em vista disso, o presente estudo utilizou os perfis ópticos das descelularizações de corações murinos como método adicional de avaliação do processo de descelularização de órgãos. Para tanto, desenvolveu-se um sistema de sensoriamento óptico, composto por uma fonte luminosa e um fotodetector estruturados em uma base ajustável, com o intuito de estabelecer a relação entre a luz transmitida durante a remoção de células e a respectiva eficiência de remoção de DNA. Os registros gráficos foram utilizados para determinar um modelo matemático não-linear capaz de discriminar entre as descelularizações com o DNA remanescente acima e abaixo dos limites sugeridos pela comunidade científica. A partir dos resultados, concluiu-se que a avaliação óptica temporal do processo de descelularização é capaz de prever a ineficiência da remoção celular ainda em estágios iniciais da perfusão com o reagente. Além disso, as análises histológicas tradicionais, as quantificações espectrofotométricas e as técnicas espectroscópicas indicaram a manutenção dos componentes predominantes da matriz extracelular dos corações descelularizados. Por fim, o sistema mostrou potencial para ampliação de uso ao ser acoplado a detectores para comprimentos de onda específicos, para orientação da detecção (transmitância e reflectância) e para aquisição de imagens, os quais evidenciaram a presença de fluorescência advinda de importantes componentes teciduais, cujo intuito é o de coletar o maior número possível de informações a fim de empregá-las no melhoramento da qualidade da análise. Tais dados compilados, se submetidos às técnicas de inteligência artificial, podem iniciar um avanço exponencial na pesquisa em bioengenharia tecidual.

ABSTRACT

The subjectivity of the final evaluation of the decellularized individual organs is one of the main problems of the decellularization technique, which can restrict the reproducibility of the cellular repopulation and the transplants responses. Thus, our study considered optical profiles produced by organs during perfusion decellularization as an additional method to evaluate each organ decellularization process. An apparatus comprised of a structured LED source and photo detector on an adjustable base was developed to capture the relationship between the transmitted light during about 12 hours of cell removal from murine hearts. Graphic records were used to determine a nonlinear mathematical model to discriminate between the decellularizations with remaining DNA above and below standardized limits. The results indicated that the temporal optical evaluation of the process allows predicting the inefficiency of cells removal of the decellularized organs at early stages, despite the organ apparent transparency. In parallel, traditional histological analyzes and spectrophotometric techniques were used to confirm the extracellular matrix quality, and spectroscopic techniques for characterization. Lastly, our open-system allowed adding distinct photo detectors and light sources, with specific wavelengths, for transmittance, reflectance and image acquisition in order to collect information of all sorts. Such compiled data, when subjected to machine learning techniques are potentially capable of initiating an exponential advance in tissue bioengineering research.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Esquema do sistema de sensoriamento óptico, no qual **(1)** representa a base ajustável; **(2)** a fonte luminosa; **(3)** o fotodetector; **(4)** componente da plataforma de prototipagem que se conecta ao computador; e em **(5)** encontra-se o órgão conectado à mangueira do sistema de perfusão.41
- FIGURA 2.** Gráficos de Intensidade vs Comprimento de onda obtidos a partir da leitura espectral das fontes ópticas utilizando um espectrofotômetro portátil de fibra óptica (Ocean Optics). **a)** Espectro da fonte luminosa utilizada no sistema de sensoriamento óptico (LED - *Light emitting diode*). **b)** Espectro da lâmpada incandescente avaliada. **c)** Espectro da lâmpada fluorescente avaliada.42
- FIGURA 3.** **a)** Gráfico de Tensão vs Tempo de 20 horas de monitorização do comportamento da fonte de luz (LED) isoladamente. **b)** Gráfico Tensão vs Tempo da perfusão com água de um órgão previamente descelularizado. **c)** Gráfico de Tensão vs Tempo da fonte de luz (LED) do momento em que é ligada até a sua completa estabilização.43
- FIGURA 4.** Imagem externa do segundo protótipo durante a realização dos testes com LEDs de diferentes comprimentos de onda e câmeras para visualização do processo (**à esquerda**). Imagem interna da configuração do segundo protótipo para monitorização por vídeo (**à direita**).50
- FIGURA 5.** **(a)** Imagem de um coração de rato do Grupo Nativo, **(b)** do Grupo Descelularização Completa e **(c)** do Grupo Descelularização Incompleta. **(D)** Gráfico de barras de porcentagem de DNA de tecido cardíaco liofilizado do grupo Nativo (n = 6), Descelularização Completa (n = 6) e Descelularização Incompleta (n = 8). ** p = 0,0002 vs. grupo nativo; † p = 0,0036 vs grupo Descelularização Completa. Valores são média ± DP. **(e)** Gráfico de porcentagem de Colágeno no tecido cardíaco liofilizado, em comparação ao controle (n = 4 por grupo, p>0,05). Modificado de Pereira *et al* (2019)52

FIGURA 6. **a)** Imagem do sistema de monitoramento óptico durante um processo de descelularização. **b)** Imagem externa do protótipo conectado ao computador. **c)** Curvas típicas “Tensão vs Tempo” de cada grupo, Descelularização Completa (n = 6) e Descelularização Incompleta (n = 8), ajustadas pelo teste de máxima verossimilhança nlme versão 3.1 de Pinheiro e Bates. **d)** Tensão emitida pela fonte de LED durante 20 horas de monitoramento em comparação com uma descelularização. **e)** Perfil Óptico da amostra 5 do grupo Descelularização Completa (conforme Figura 3-a). **f)** Perfil Óptico da amostra 1 do grupo de Descelularização Incompleta (conforme Figura 3-b).54

FIGURA 7. **a)** Curvas originais do Grupo Descelularização Completa “Tensão x Tempo”, em preto, com suas respectivas regressões não lineares em vermelho. **b)** Curvas originais do grupo Descelularização Incompleta “Tensão x Tempo” em preto com suas respectivas regressões em vermelho. As curvas foram ajustadas para o modelo paramétrico não-linear descrito por Gadagkar e Call (2000).56

FIGURA 8. Imagens de microscopia óptica após a coloração com Hematoxilina & Eosina do tecido cardíaco dos grupos Nativo **(a)**, Descelularização Completa **(b)** e Descelularização Incompleta **(c)**.57

FIGURA 9 (a). Marcação imunohistoquímica com anticorpos anti-fibronectina de tecido cardíaco Nativo **(b)** e do grupo Descelularização Completa **(c)**. Marcação imunohistoquímica com anticorpos anti-laminina de tecido cardíaco Nativo **(e)** e do grupo Descelularização Completa. (Marcações em marrom para os dois testes). **(e)** Gráfico de barras da concentração de Glicosaminoglicanos ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ de tecido cardíaco liofilizado) para os grupos Nativo e Descelularização Completa, $p > 0,05$ (Teste T bicaudal para variâncias iguais).58

FIGURA 10. Espectros de infravermelho (FTIR) dos Grupos Descelularização Completa **(a-I,II)**, Descelularização Incompleta **(b-I,II)** e Nativo **(c-I,II)**.60

FIGURA 11. Espectros de espalhamento Raman dos Grupos Descelularização Completa **(a-I,II)**, Descelularização Incompleta **(b-I,II)** e Nativo **(c-I,II)**.62

FIGURA 12. Análise espectral do perfil óptico do processo de descelularização. **a)** Configuração esquemática das posições das fibras ópticas em relação ao órgão e à fonte luminosa. **b)** Intensidades normalizadas (0-1) do espectro de reflectância *versus* comprimento de onda obtido durante a perfusão com SDS. **c)** Intensidades absolutas dos espectros de reflectância demonstrando valor máximo entre 1 e 2 horas. **c)** Intensidades absolutas dos espectros de transmitância demonstrando aumento global da intensidade no tempo, mas em taxas decrescentes. **d)** Espectros de reflectância normalizados (0-1), no primeiro momento de perfusão com SDS, e de transmitância aos 30 minutos de perfusão de SDS, em comparação com o perfil da fonte de luz, evidenciando o deslocamento da banda em 600 nm.63

FIGURA 13. Leituras de Tensão *vs* Tempo da descelularização a cada 30 minutos, utilizando LEDs de diferentes cores e fotodiodo de amplo espectro para detecção.65

FIGURA 14. Imagens do órgão realizadas com duas câmeras de vídeo durante a descelularização e sob a incidência de LED branco. Para padronização da posição, utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b**, **d** e **f**. As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo; **c** e **d** a, aproximadamente, 2 horas de descelularização; e as imagens **e** e **f** a, aproximadamente, 6 horas do início do processo.66

FIGURA 15. Imagens de duas câmeras de vídeo para monitoramento da descelularização utilizando LED Infravermelho (940 nm) como fonte luminosa. Para padronização da posição utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b**, **c** e **d**). As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo. **c** - aproximadamente 4 horas de descelularização. **d** - após 6 horas do início do processo.67

FIGURA 16. Imagens a partir de duas câmeras de vídeo para monitoramento da descelularização utilizando LED ultravioleta (385 nm). Para padronização da posição, utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b**, **d**, **f**. As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo. **c** e **d** - aproximadamente 2 horas de descelularização. **e** e **f** - aproximadamente 6 horas do início do processo.68

FIGURA A1. Imagens de duas câmeras de vídeo para monitoramento da descelularização utilizando LED Verde. Para padronização da posição utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b** e **d**). As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo. **c** e **d**, após 6 horas do início do processo.88

FIGURA A2. Imagens de duas câmeras de vídeo para monitoramento da descelularização utilizando LED vermelho. Para padronização da posição utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b** e **d**). As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo. **c** e **d**, após 6 horas do início do processo.89

FIGURA A3. Imagens de duas câmeras de vídeo para monitoramento da descelularização utilizando LED Âmbar. Para padronização da posição utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b** e **d**). As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo. **c** e **d**, após 6 horas do início do processo.90

FIGURA A4. Imagens de duas câmeras de vídeo para monitoramento da descelularização utilizando LED Amarelo. Para padronização da posição utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b** e **d**). As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo. **c** e **d**, após 6 horas do início do processo.91

FIGURA A5. Influência do coeficiente de Hill sobre o formato da curva. Os demais parâmetros da equação foram mantidos enquanto o valor do coeficiente de Hill foi alterado para os valores 4, 2 e 1.92

Figura A6. Gráfico de barras representativo das massas liofilizadas, após o processo de descelularização, dos órgãos dos grupos Descel. Completa e Descel. Incompleta em comparação aos órgãos do grupo Nativo. (n=4 por grupo; ANOVA e uma via com correção de Welch) **p<0,05.92

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores de massa média dos corações *in natura* e da massa dos animais com desvio padrão e valor de p , comparativamente entre os grupos Descelularização Completa e Descelularização Incompleta.53
- Tabela 2.** Valores típicos estimados para os parâmetros tensão inicial (V_1), assíntota máxima (V_2), inclinação da curva (s), ponto de inflexão (t_0), para os grupos Descelularização Completa e Descelularização Incompleta. Parâmetros da equação obtidos usando o pacote R nlme (Modelos Linear e Não-Linear de Efeitos Mistos, versão 3.1 de Pinheiro e Bates.55
- Tabela 3.** Frequências vibracionais das principais bandas evidenciadas pela espectroscopia de infravermelho para os grupos Descel. Completa, Descel. Incompleta e Nativo.....59
- Tabela 4.** Frequências vibracionais das principais bandas evidenciadas pela espectroscopia de espalhamento Raman para cada uma das duas amostras dos três grupos estudados (Descel. Completa I e II, Descel. Incompleta I e II e Nativo I e II).....61

1. Introdução

A demanda de órgãos para transplante supera sobremaneira a disponibilidade de doadores. O relatório do Registro Brasileiro de Transplantes (RBT), por exemplo, mostrou que entre janeiro e setembro de 2019 foram transplantados 6.722 órgãos para suprir uma lista de espera de 36.468 pacientes ativos (setembro de 2019) (Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos-ABTO, 2020). Não obstante, os dados publicados pela *United Network for Organ Sharing* (UNOS) expõem que esse cenário não está restrito aos países em desenvolvimento, demonstrando que, em 2018, foram realizados 36.530 transplantes nos Estados Unidos para atender a uma lista de espera de 113.586 pessoas (UNOS, 2019). Ademais, há outro aspecto capaz de agravar esse cenário, o qual consiste na rejeição que os pacientes transplantados podem desenvolver após o procedimento, conhecido como a reação na qual o organismo receptor desenvolve uma resposta imunológica contra as células presentes no órgão transplantado (GUYETTE *et al.*, 2016). Atualmente, cerca de 40% dos órgãos transplantados são perdidos dentro de 10 anos, porcentagem que aumenta para 50% quando são acrescidos dois anos. Além disso, todos os transplantados convivem com os efeitos colaterais relacionados à imunossupressão (BAAN *et al.*, 2016, VALENZUELA *et al.*, 2017).

As reações de rejeição, a despeito da complexidade e multiplicidade de mecanismos efetores, podem ser tipicamente caracterizadas como reações de hipersensibilidade do tipo IV (respostas imunes tardias), basicamente classificadas em hiperagudas, agudas e crônicas (FRIEND, 1995; PHILLIPS & CALLAGHAN, 2017). As hiperagudas são desencadeadas rapidamente pela presença de isohemaglutininas naturais do doador (ABO), sendo mais frequente nos transplantes xenogênicos (PHILLIPS & CALLAGHAN, 2017); já as reações agudas podem iniciar-se pela presença de leucócitos passageiros, como os linfócitos T e B, os monócitos, macrófagos e as células dendríticas presentes no interstício do enxerto; as reações crônicas, por sua vez, iniciam-se pela presença de antígenos HLA e também de antígenos de histocompatibilidade menor (não-HLA), os quais são peptídeos encontrados nas membranas celulares e na matriz extracelular de diversos tecidos (FRIEND, 1995; GOULMY *et al.*, 1995; PHILLIPS & CALLAGHAN, 2017). Todos os tipos citados de rejeição tendem a progredir para a perda do órgão transplantado, associada ou não ao desenvolvimento de outras patologias. Por isso, observa-se que a remoção eficiente das células originais do doador bem como de qualquer

material celular é condição inquestionável para evitar o desencadeamento das reações de rejeição.

Portanto, com o intuito de evitar as reações de rejeição, o processo de obtenção dos órgãos descellularizados baseia-se na remoção celular através da utilização de surfactantes, isoladamente ou em associação a outros agentes físicos, como a radiação e o congelamento; a agentes químicos, como os ácidos e bases; e agentes biológicos, como as enzimas (DESTEFANI, *et al* 2017; KEANE *et al*, 2015; OLIVEIRA *et al*, 2013). O predomínio do uso de surfactantes justifica-se pelo fato de as células e as suas organelas serem delimitadas por membranas e endomembranas em grande parte lipídicas, 25% a 75% de sua composição (DEVLIN *et al*, 1997). Dessa forma, a ação tensoativa do surfactante irá desfazer a organização da membrana celular, rompendo células, núcleo e organelas. Simultaneamente, a pressão exercida pelo fluxo contínuo da perfusão irá carrear o material celular desorganizado para o exterior do órgão através de sua própria rede vascular, a qual, devido à densa rede capilar, encontra-se entre 50 e 100 µm de distância da maioria das células (ALBERTS *et al*, 2002; SEETAPUN *et al*, 2017).

Esses arcabouços descellularizados estão se consolidando na medicina atual como uma alternativa à substituição de tecidos danificados por doenças ou traumas, pois apresentam estrutura e propriedades bioquímicas únicas que propiciam a recelularização e o transplante (GUYETTE *et al*, 2014; SONG e OTT, 2011). O processo de remoção celular deve, portanto, ser capaz de preservar a matriz glicoproteica original, a qual é indispensável para a manutenção da estrutura tridimensional do órgão e, sobre a qual, as células-tronco pluri ou multipotentes do receptor serão cultivadas através do Repovoamento Celular (LU *et al*, 2013). Órgãos menos complexos como bexigas urinárias (EL-KASSABY *et al.*, 2003) e traquéias (GONFIOTT *et al*, 2014; ELLIOTT *et al* 2012; HAMILTON *et al*, 2015) ou tecidos, como os vasos sanguíneos (OLAUSSON *et al*, 2014; HOPKINS *et al*, 2014) e as válvulas cardíacas (CEBOTARI *et al.*, 2011), têm apresentado bons resultados após o procedimento em humanos. Já os órgãos mais complexos, tais quais o coração (OTT *et al*, 2008; GUYETTE *et al*, 2016; SANCHEZ *et al*, 2015), fígado (MAZZA *et al*, 2015) e rins (ABOLBASHARI *et al*, 2016) encontram-se em fase experimental e tem apresentado grande potencial de progressão para estudos clínicos em humanos.

Entretanto, alguns fatores limitantes necessitam ser superados, como é o caso da otimização, previsibilidade e consequente reprodutibilidade da descellularização de órgãos, a

qual carece de critérios objetivos, específicos e individuais para determinar uma descelularização bem-sucedida (HUSSEY, 2018; KEANE *et al*, 2015; PELOSO *et al*, 2015). Considera-se uma descelularização bem-sucedida aquela na qual a quantidade de DNA remanescente é inferior a 50 ng.mg^{-1} de tecido seco (CRAPO, 2008), ou se a remoção de DNA é superior a aproximadamente 96% quando comparado ao órgão controle (GUYETTE, 2014; QUINN *et al*, 2016), e se a estrutura tridimensional, especialmente a vascular, foi mantida após o processo. Muitos resultados inconclusivos ocorrem pela impossibilidade de avaliar individualmente os órgãos sem causá-los danos, como é o caso da avaliação histológica e da extração de DNA (KITAHARA, 2016; REMUZZI, 2017). Essa impossibilidade acarretou em uma padronização apenas visual e temporal da avaliação final do processo, as quais são a constatação de “translucência branca” com visualização da rede vascular e até 12 horas de perfusão de surfactante para corações murinos (GUYETTE *et al*, 2014). Tais critérios podem ser afetados por características individuais do órgão, como as morfológicas relacionadas ao peso e à idade, as advindas de doenças que eventualmente não tenham sido identificadas e, por último, aquelas decorrentes de erros de procedimento (GUYETTE *et al*, 2014).

Em vista disso, o presente estudo desenvolveu um sistema de sensoriamento óptico a fim de conferir objetividade à avaliação e ao monitoramento do processo de descelularização. O sistema é composto por dois módulos diametralmente opostos com um eixo central livre. Os módulos consistem em uma fonte luminosa e um fotodetector, enquanto o espaço central comporta um sistema de alinhamento em três eixos do órgão a ser avaliado. O sensoriamento ocorre quando os fótons transmitidos através dos corações de ratos são captados pelo fotodetector durante o processo de descelularização, o sistema, por sua vez, os converte em valores de tensão e constrói o gráfico simultaneamente. Com isso, o sistema de sensoriamento permitiu reunir os gráficos produzidos e determinar um modelo matemático não linear capaz de discriminar entre as descelularizações com DNA remanescente superior e inferior aos limites padronizados. Por se tratar de um sistema aberto, este possibilita a adição de diferentes detectores, como, por exemplo, para comprimentos de onda específicos e para aquisição de imagens; cujo intuito é extrair o maior número de informações dos processos individuais. Tais dados, provenientes de diferentes estudos, quando em grande volume, poderão ser aplicados às técnicas de inteligência artificial e contribuir de maneira expressiva para a pesquisa em bioengenharia tecidual.

1.1 Objetivos

I. Objetivo Geral

- Desenvolver um sistema de sensoriamento óptico em tempo real do processo de descelularização de órgãos como método de avaliação não destrutivo aplicado à bioengenharia tecidual.

II. Objetivos Específicos

- Desenvolver um sistema de sensoriamento óptico para monitoramento do processo de descelularização de órgãos, armazenamento dos dados e construção simultânea do gráfico.
- Identificar o modelo matemático adequado ao perfil óptico de corações murinos.
- Correlacionar o perfil óptico gerado pelo equipamento com a concentração de DNA da Matriz Extracelular.
- Identificar o espectro eletromagnético correspondente ao perfil óptico da descelularização.
- Avaliar a preservação da Matriz Extracelular em composição e estrutura de corações descelularizados.

2. Revisão de Literatura

I. Cenário do Transplante de Órgãos

O transplante de órgãos é a opção de escolha para o tratamento da falência de órgãos em estágio final, a qual é causada por diversas doenças. O transplante renal foi o pioneiro na técnica de transplante de órgãos inteiros e, atualmente, está associado à melhor qualidade de vida, menor mortalidade e redução dos custos sociais para os sistemas de saúde com pacientes em diálise e que sofrem de doença renal crônica avançada (COZZI *et al*, 2017; GRINYÓ, 2013). Da mesma forma, o transplante cardíaco é a abordagem cirúrgica definitiva para a melhora da qualidade de vida e para a maior sobrevivência de pacientes com insuficiência cardíaca refratária. O transplante cardíaco é o terceiro mais freqüente e encontra-se atrás do renal e do hepático e à frente do pulmonar e do pancreático (ABTO, 2018; UNOS, 2019; GRINYÓ, 2013). No entanto, apesar dos avanços alcançados durante os 70 anos desde a introdução da técnica, a sobrevivência média após o transplante ainda está muito abaixo do desejável, de 11 a 14 anos para o transplante de coração e inferior a 6 anos para o transplante de pulmão, cuja principal causa é a reação de rejeição ao órgão (YUSEN *et al*, 2016), uma reação na qual o organismo do receptor desenvolve uma resposta imunológica contra os antígenos presentes no órgão transplantado (GUYETTE *et al.*, 2016).

Além disso, há a grande demanda de órgãos para transplante, a qual supera sobremaneira a disponibilidade de doadores em todo o planeta. Tal realidade pode estar acentuada ou atenuada conforme as diferenças geográficas, a qual pode ser avaliada pela taxa média de transplantes. Enquanto nos países desenvolvidos a taxa está acima de 70 pmp (parte por milhão da população) (GRINYÓ, 2013), no país, a taxa de doadores efetivos é de apenas 17 pmp (RBT, 2018). No entanto, a carência de órgãos não é restrita aos países em desenvolvimento; nos Estados Unidos, por exemplo, o número de transplantes realizados durante o ano de 2018 representou apenas um terço da lista de espera atual (36.530 transplantes realizados em 2018 e 113.586 candidatos em março de 2019 – *United Network for Organ Sharing*, UNOS, 2019). No Brasil, o número de transplantes de órgãos realizados entre janeiro e setembro de 2019

representou um quinto da lista de espera constante de setembro de 2019 (6.722 e 36.468, respectivamente – Associação Brasileira de Transplantes, ABTO, 2020).

O tipo de transplante, por sua vez, pode ser classificado em alogênico, xenogênico, isogênico e autólogo. Na prática clínica, a maioria dos transplantes de órgãos é do tipo alogênico, também chamado aloenxerto, o qual ocorre entre indivíduos geneticamente diferentes da mesma espécie (PHILLIPS & CALLAGHAN, 2017). Os transplantes xenogênicos são aqueles realizados entre espécies diferentes, como é caso dos transplantes de órgãos suínos realizados em primatas e com projeção para pesquisa clínica em humanos em 2020. O porco é considerado a espécie de maior potencial de sucesso nesse intercâmbio (REARDON, 2015; EKSER *et al*, 2012) devido não somente à similaridade de dimensões e fisiologia (DENNER, 2017), mas também ao advento da edição gênica, uma técnica de manipulação genética capaz de diminuir drasticamente a rejeição imunológica, como é o caso do bloqueio na expressão do gene que codifica a enzima α -1,3galactosiltransferase (DAI *et al*, 2002; REARDON 2015; ZHOU *et al*, 2016). Na contramão, dificuldades advindas da complexidade imunológica e da possibilidade de infecção por vírus suínos levaram à desistência de algumas companhias da área (REARDON, 2015) e ainda são os principais obstáculos (DENNER, 2017). Já os transplantes isogênicos ocorrem entre indivíduos geneticamente idênticos, como é o caso do transplante realizado entre gêmeos idênticos. Por fim, o autólogo refere-se ao enxerto realizado entre regiões do próprio indivíduo (PHILLIPS & CALLAGHAN, 2017).

Nos transplantes de órgãos, de maneira geral, é realizado um intenso e duradouro tratamento imunossupressivo a fim de evitar as reações de rejeição, uma vez que pacientes com órgãos transplantados funcionais sem terapia imunossupressiva são extremamente raros, sendo descritos em quatro situações clínicas apenas: pacientes cuja imunossupressão foi descontinuada devido à infecção viral persistente e ao câncer (ALEXANDER *et al*, 2008); pacientes que não aderiram ao tratamento voluntariamente (WEST, 2001); estudos de remoção progressiva dos fármacos (TAKATSUKI *et al*, 2001); e aqueles submetidos a um tratamento alternativo de indução de tolerância, no qual as próprias células do sistema imunológico contribuem para a tolerância evitando a rejeição ao enxerto (SCANDLLNG *et al*, 2008; WOOD *et al*, 2012).

Entretanto, apesar de notáveis avanços, as reações de rejeição ainda representam uma preocupação latente. Atualmente, cerca de 40% dos órgãos transplantados são perdidos dentro de 10 anos, porcentagem que aumenta para 50% quando são acrescentados dois anos (BAAN,

2016; VALENZUELA *et al*, 2017). Essa incidência é dependente, dentre outros fatores, do tipo de órgão, uma vez que eles apresentam potenciais imunogênicos distintos entre si. O coração, o qual é o modelo utilizado no presente estudo, está entre os órgãos de maior imunogenicidade. Em segundo lugar na escala hierárquica, o coração encontra-se atrás apenas do intestino delgado e à frente do pulmão e do rim (PHILLIPS & CALLAGHAN, 2017). A particularidade que confere ao intestino o primeiro lugar é a grande concentração de tecido linfóide e infiltrados leucocitários (GALVÃO *et al*, 2003).

Outro fator determinante para o sucesso no transplante é o grau de similaridade genética entre o doador e o receptor, o qual irá reger a intensidade da resposta imunológica desenvolvida contra o órgão transplantado. O processo de reconhecimento de antígenos transplantados, isto é, antígenos não-próprios ou aloantígenos, pelo sistema imunológico do receptor, é conhecido como alorreconhecimento, o qual é responsável por desencadear uma resposta imunológica, no caso, uma alorresposta. Nesse contexto, há basicamente três tipos de antígenos teciduais capazes de desencadear a alorresposta: antígenos do sistema ABO, antígenos HLA (antígenos leucocitários humanos) e antígenos não-HLA (antígenos de histocompatibilidade menor) (PHILLIPS & CALLAGHAN, 2017).

O sistema ABO baseia-se na expressão geneticamente determinada de antígenos A, B e H dos grupos sanguíneos A, B, O, respectivamente. Esses antígenos são oligossacarídeos expressos na superfície de diferentes tipos celulares, como as células vermelhas do sangue e as células endoteliais. O antígeno H, constituinte do grupo O, é um produto enzimático de uma transferase específica, o qual representa a matriz de formação dos antígenos A e B. A presença de antígeno H modificado por variantes específicas das transferases tipo A e/ou B constituirá os grupos A, AB e B (YAMAMOTO *et al*, 1990). A incompatibilidade do sistema ABO entre doador e receptor é responsável por desencadear uma severa e rápida resposta imunológica desencadeada por anticorpos. Atualmente, algumas estratégias de dessensibilização estão sendo desenvolvidas e já permitem esse tipo de incompatibilidade em alguns casos, mas ainda carrega um risco elevado de rejeição ao enxerto (BOHMIG *et al*, 2015; WEST, 2001; WOOD, 2012).

Já os antígenos HLA são codificados por um grupo de genes do cromossomo 6 (6p21.3) denominado de Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) (ROBINSON *et al*, 2001), o qual é o estímulo antigênico dominante para a rejeição ao enxerto e para a produção de anticorpos (TAYLOR & DYER, 1995). Tais antígenos são, basicamente, proteínas de superfície celular apresentadoras de peptídeos. Algumas variedades são expressas em todas as células nucleadas (HLA classe I) e

outras estão exclusivamente em células com função imunológica (HLA classe II), como, por exemplo, os monócitos, macrófagos, linfócitos B, células dendríticas e células T ativadas. Os peptídeos apresentados serão reconhecidos pelas células do sistema imunológico, as quais serão células T específicas (TAYLOR & DYER, 1995).

Os antígenos de histocompatibilidade menor (não-HLA) apresentam menor importância clínica para o transplante de órgãos quando comparado aos antígenos HLA (PHILLIPS & CALLAGHAN, 2017), mas podem desencadear respostas imunológicas mesmo quando há correspondência genética e compatibilidade de antígenos HLA (GOULMY *et al*, 1995); são peptídeos de proteínas citosólicas, de membrana celular e de componentes de matriz extracelular. Os anticorpos que demonstraram relevância clínica incluem o anticorpo contra o receptor de angiotensina I, o qual é um receptor da membrana celular envolvido na manutenção da estabilidade hemodinâmica; a glutatona S-transferase T1, uma enzima participante do metabolismo e inativação de drogas (RODRIGUEZ-MAHOU *et al*, 2007); antígenos presentes em células endoteliais (AGUILERA *et al*, 2008); a agrina, um proteoglicano da membrana basal do glomérulo renal (JOOSTEN *et al*, 2005); a miosina, proteína presente na célula cardíaca (WARRAICH *et al*, 200); e o perlecan, um proteoglicano sulfatado constituinte da matriz extracelular (CARDINAL *et al*, 2013).

As reações de rejeição podem ser convenientemente classificadas em hiperagudas, agudas e crônicas (FRIEND, 1995). A hiperaguda é a menos freqüente e é desencadeada no período de minutos ou horas após o transplante pela ação direta de anticorpos pré-formados, como anti-ABO ou anti-HLA, os quais desencadeiam rápida ativação do sistema complemento, agregação plaquetária, trombose e necrose isquêmica (FRIEND, 1995; PHILLIPS & CALLAGHAN, 2017).

Já as reações agudas manifestam-se no prazo de semanas a meses, pois são respostas mediadas por células que envolvem a apresentação de antígenos estranhos às células T pelas células apresentadoras de antígeno, com conseqüente proliferação e ativação de clones de células T e destruição do enxerto por células T citotóxicas. Elas podem iniciar-se pela presença de leucócitos passageiros (aloantígenos como os linfócitos T e B, os monócitos, macrófagos e as células dendríticas presentes no interstício do enxerto) e peptídeos HLA. Na década de 1990, a incidência de rejeição do tipo aguda era de 50 a 70% dos receptores (FRIEND, 1995). Atualmente, ocorre em cerca de 10 a 20% dos receptores em até um ano após o transplante (PHILLIPS & CALLAGHAN, 2017).

A rejeição crônica, por sua vez, ocorre no período de meses a anos, corresponde à maior causa de falha, é multifatorial, pode ou não envolver aloantígenos e ocorre pela presença de aloantígenos HLA e também de aloantígenos alélicos (antígenos de histocompatibilidade menor ou não-HLA) (FRIEND, 1995; GOULMY *et al*, 1995; PHILLIPS & CALLAGHAN, 2017). Além disso, danos crônicos podem ocorrer de maneira combinada a condições como a hipertensão, toxicidade dos imunossupressores, hipercolesterolemia, dentre outras, e resultar na disfunção do enxerto (PHILLIPS & CALLAGHAN, 2017).

Em suma, a escassez de órgãos para transplantes, a sobrevida limitada pelas reações de rejeição, a qualidade de vida comprometida em decorrência do intenso e duradouro tratamento imunossupressivo, bem como o alto risco de infecção viral por parte da possibilidade xenogênica tradicional, impulsionaram a busca por alternativas ao transplante de órgãos alogênico e xenogênico tradicionais. Assim, as áreas da bioengenharia de tecidos e da medicina regenerativa, ao aumentarem seus esforços no desenvolvimento de técnicas aptas a desenvolverem órgãos de substituição de relevância clínica, desenvolveram a técnica de órgãos e tecidos descellularizados como uma das principais estratégias para aumentar a oferta de órgãos e para minimizar ou evitar o tratamento imunossupressivo, haja vista a remoção dos antígenos de histocompatibilidade (MOSER & OTT, 2014; TAPIAS & OTT, 2014).

II. Cenário da Bioengenharia de Órgãos Descellularizados

As técnicas de descellularização consistem na remoção integral das células de órgãos e tecidos, de maneira a preservar sua microarquitetura original, a qual confere ao órgão e ao tecido sua estrutura tridimensional e sobre a qual serão reintroduzidas células compatíveis com o receptor. A remoção das células tem o objetivo de extrair os principais antígenos de histocompatibilidade e reproduzir uma cópia fiel a partir da complexa matriz extracelular remanescente (MOSER & OTT, 2014; TAPIAS & OTT, 2014). Há uma grande diversidade de protocolos para atender a essa finalidade, no entanto, um tipo de agente descellularizante é essencial para o processo: os surfactantes, popularmente conhecidos por detergentes (NARA *et al*, 2016; KEANE *et al*, 2015).

Os primeiros relatos do efeito dos surfactantes na remoção de células em tecidos da classe dos mamíferos datam da década de 1980 (LENTZ *et al*, 1982; BODNAR *et al*, 1986). Tais conhecimentos, desde então, são empregados com o intuito de desenvolver alternativas a

determinados tipos tradicionais de alo e xenoenxertos. Um exemplo, datado de 1982, descreve um método para inibição da mineralização, especialmente a calcificação, de valvas cardíacas suínas, ocorrida após o transplante em humanos (LENTZ *et al*, 1982). O processo, muito semelhante à descelularização de tecidos atual, utiliza-se de uma solução aquosa de 1% de um sal de álcool alifático sulfatado de 7 a 18 carbonos, como, por exemplo, o dodecilssulfato de sódio (SDS), na qual a valva cardíaca é imersa, e sob agitação permanece por cerca de 24 horas. Dois anos após a publicação do primeiro trabalho, o efeito de descelularização do tecido foi identificado em valvas cardíacas tratadas com solução de 1% de SDS por microscopia eletrônica de transmissão. Nesse estudo, questionou-se o tratamento em função dos danos às células e à matriz extracelular identificados e, por isso, propuseram modificações. De maneira interessante, o efeito de descelularização foi discutido como um efeito negativo na abordagem dos pesquisadores (BODNAR *et al*, 1986). No entanto, após 1986, processos mais elaborados para descelularização de tecidos passaram a ser desenvolvidos já com o propósito de produzir matrizes acelulares como biomateriais destinados ao transplante alogênico de valvas cardíacas e pulmonares, utilizando, por exemplo, modelos caninos (WILSON *et al*, 1995).

Ainda nos dias atuais, o processo de obtenção de órgãos descelularizados baseia-se, principalmente, na remoção celular através da utilização dos surfactantes, os quais podem agir isoladamente ou em associação a outros agentes químicos, tais quais proteínas (enzimas) (LU *et al*, 2013) e ácidos, ou agentes físicos, como a radiação ultravioleta (UV) (OLIVEIRA *et al*, 2013), e até de sessões de congelamento e descongelamento sequencial (KEANE *et al*, 2015). Os surfactantes, também denominados tensoativos, são moléculas que, em concentrações críticas, se organizam em micelas promovendo a catálise micelar responsável pela solubilização de lipídios. Uma vez que as células e suas organelas são delimitadas por membranas e endomembranas em grande parte lipídicas, de 25% a 75% de sua composição (DEVLIN *et al*, 1997), a ação tensoativa do surfactante desfaz a organização da membrana celular, rompendo células, núcleo e organelas. A pressão exercida pelo fluxo contínuo da perfusão do órgão, realizada com o surfactante sob baixas pressões fisiológicas (GUYETTE *et al*, 2014), carrega o material celular desorganizado para o exterior do órgão através de sua própria rede vascular, a qual, devido à densa rede capilar, encontra-se entre 50 e 100 µm de distância da maioria das células (ALBERTS *et al*, 2002). Tal processo é denominado descelularização por perfusão (SEETAPUN *et al*, 2017).

Atualmente, centenas de patentes estão contidas nos diretórios internacionais, desde as patentes para protocolos de descelularização de tecidos (GOLDSTEIN & BLACK, 1998; SPIEVACK *et al*, 2018) e de órgãos (ANTHONY, 2002), até aquelas destinadas a equipamentos de descelularização de tecidos e órgãos inteiros, completamente automatizados (BONVILLAIN *et al*, 2018; GILBERT *et al*, 2018). Além disso, dezenas de empresas já comercializam tecidos descelularizados (CRAPO *et al*, 2011; GILBERT *et al*, 2009), e um número menor atua na pesquisa e desenvolvimento de órgãos inteiros a partir de arcabouços descelularizados e recelularizados com diferentes tipos celulares (BERSENEV, 2014; ZIA, 2015).

A recelularização, por sua vez, ocorre após a descelularização e esterilização do órgão e antecede o transplante. É um processo que, essencialmente, baseia-se na perfusão do órgão com uma dispersão de células, a fim de reconstruí-lo totalmente (ZIA, 2015). As células utilizadas variam entre células progenitoras multipotentes, células-tronco mesenquimais, células-tronco embrionárias (LAFLAMME & MURRY, 2005; LU *et al*, 2013) e células-tronco pluripotentes induzidas transgênicas (ZHANG & JIANG, 2015) ou “não-transgênicas” (através de RNAm) (GUYETTE *et al*, 2016). Em se tratando de recelularização de corações, diversos tipos celulares têm demonstrado sucesso, como é o caso das células-tronco mesenquimais de medula óssea, células progenitoras cardíacas humanas, células endoteliais humanas, cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas e cardiomiócitos neonatais de camundongos (PORZIONATO *et al*, 2018).

Em se tratando de transplantes, órgãos menos complexos como bexigas urinárias (ELKASSABY *et al*, 2003) e traquéias (GONFIOTT *et al*, 2014; ELLIOTT *et al* 2012; HAMILTON *et al*, 2015) ou tecidos, como os vasos sanguíneos (OLAUSSON *et al*, 2014; HOPKINS *et al*, 2014) e as válvulas cardíacas (CEBOTARI *et al*, 2011), tem apresentado bons resultados após o procedimento em humanos. Um exemplo é o estudo prospectivo realizado com um garoto de 10 anos, que ocorreu durante os quatro anos seguintes a um alotransplante de traquéia recelularizada com suas próprias células, no caso, células autólogas do epitélio respiratório e células-tronco mesenquimais. Observou-se que o transplante, apesar de ter sido realizado em condição de urgência e de única alternativa terapêutica remanescente, demonstrou viabilidade em longo prazo de uma traqueia recelularizada em uma criança, evidenciando o potencial de aplicação da técnica (HAMILTON *et al*, 2015). Por outro lado, os órgãos mais complexos, tais quais o coração (SANCHEZ *et al*, 2015; GUYETTE *et al*, 2016), fígado

(MAZZA *et al*, 2015), rim (ABOLBASHARI *et al*, 2016) e pulmão (NICHOLS *et al*, 2018) encontram-se em fase experimental em animais, mas apresentam certo potencial de progressão para estudos clínicos em humanos. Tal prognóstico é sustentado por resultados promissores encontrados na literatura, como o observado em 2016, no qual 73 corações humanos foram descelularizados e recelularizados com células pluripotentes induzidas. Os resultados, após 14 dias, demonstraram células musculares cardíacas imaturas e contração cardíaca funcional em resposta ao estímulo elétrico gerado no interior de biorreatores (GUYETTE *et al*, 2016). Da mesma forma, em 2018, outro grupo de pesquisa deu os primeiros passos em direção ao transplante alogênico de pulmões recelularizados. Nesse estudo, pulmões suínos foram recelularizados com as células pulmonares extraídas do animal receptor (células autólogas) e, em associação com micropartículas de fatores de crescimento, realizou-se o transplante alogênico de pulmão suíno em quatro animais. Os resultados demonstraram angiogênese e formação de tecido alveolar em aproximadamente duas semanas após o transplante, e, ao final de dois meses, ainda não haviam sido observados sinais de rejeição ao enxerto (NICHOLS *et al*, 2018).

Entretanto, apesar dos notáveis avanços, uma série de fatores limitantes necessita ser superada, como, por exemplo, a realização de descelularizações que não provoquem ruptura da integridade de redes vasculares (CHANG & NIKLASON, 2017); tratamentos que permitam a remoção de todos os componentes celulares e imunogênicos da matriz, mas que mantenham a estrutura nativa e os fatores de crescimento a ela ligados (MORRIS *et al*, 2017); processos que estimulem o repovoamento endotelial abrangente de órgãos inteiros (CHANG & NIKLASON, 2017); e, por fim, protocolos que garantam a reprodutibilidade na descelularização e recelularização de órgãos diversos (PELOSO *et al.*, 2015). A origem de muitas dessas limitações recai sobre a lacuna que existe na previsibilidade dos processos de descelularização, os quais carecem de critérios objetivos, específicos e individuais para a determinação de uma descelularização bem-sucedida (HUSSEY, 2018; KEANE *et al*, 2015; PELOSO *et al*, 2015). Além disso, a complexidade da matriz extracelular exige um processo de remoção celular capaz de preservar a matriz glicoproteica original, a qual é indispensável para a manutenção da fisiologia e estrutura tridimensional do órgão e, sobre a qual, as células-tronco pluri ou multipotentes do receptor serão cultivadas através do repovoamento celular (GUYETTE *et al*, 2014; SONG e OTT, 2011; LU *et al*, 2013; GUYETTE *et al*, 2016).

III. Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é a estrutura dinâmica na qual as células estão imersas. Ela interage com as moléculas da superfície celular, armazena e ativa fatores de crescimento, e, por isso, participa de eventos celulares como contração, adesão, migração, proliferação, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose (HOLDSWORTH *et al*, 2017 e JÄRVELÄINEN *et al*, 2009). Ela é composta por macromoléculas sintetizadas e secretadas por todos os tipos celulares através da transmissão de estímulos e sinais a receptores específicos (THEOCHARIS *et al*, 2015).

Baseando-se em sua estrutura e composição, a matriz extracelular pode ser classificada em dois tipos: intersticial e pericelular. A matriz intersticial abrange todo o entorno das células, enquanto a pericelular localiza-se na região de contato direto com as células (THEOCHARIS *et al*, 2015). Um exemplo de matriz pericelular é a membrana basal, a qual possui duas faces opostas, sendo que uma face está em contato com as células do parênquima enquanto a outra com o tecido conjuntivo do órgão ou glândula. A matriz extracelular é constituída fundamentalmente por proteínas, polissacarídeos e água, os quais estão distribuídos não apenas de maneira específica para cada tecido e órgão, mas também de forma heterogênea (FRANTZ *et al*, 2010). Tais componentes da matriz combinam-se a fim de formarem duas classes principais de macromoléculas: os proteoglicanos (PGs) e as proteínas fibrosas (SCHAEFER *et al*, 2010).

Os PGs são macromoléculas compostas por um centro protéico covalentemente ligado a uma cadeia de glicosaminoglicanos (GAGs) e localizam-se em compartimentos intracelulares da superfície celular e também na matriz extracelular. Os PGs, dentre diversas funções, destacam-se por hidratar, tamponar, dar resistência e aderir moléculas ao interstício (FRANTZ *et al*, 2010 e THEOCHARIS *et al*, 2015). Os GAGs são cadeias lineares repetitivas de dissacarídeos, sendo que o primeiro do par é amino acetilado e o outro é normalmente um resíduo de ácido urônico. Devido à grande presença de grupos carboxila e sulfato, essas cadeias são negativamente carregadas e interagem com as proteínas por forças eletrostáticas. Isso ocorre com fatores de crescimento e receptores de fatores de crescimento (JACKSON *et al*, 1991 e WANG *et al*, 2017). As cadeias de GAGs podem ser classificadas em sulfatadas, como, por exemplo, o sulfato de condroitina, sulfato de ceratano, heparina, dermatan sulfato e heparan sulfato; e não sulfatadas, como é o caso do ácido hialurônico, que também é um GAG livre, isto é, não está ligado a um núcleo protéico. Os PGs podem ser secretados no espaço pericelular;

ser incorporados à membrana basal, juntamente com as proteínas fibrosas que a compõe; estarem inseridos na membrana celular como proteínas transmembrana participantes da sinalização; ou, ainda, serem específicos de determinados tecidos, como é o caso do *neurocan* e *neuroglycan C*, encontrados majoritariamente no sistema nervoso central (SCHAEFER *et al*, 2010). Dependendo da localização e da ligação a proteínas específicas, os GAGs podem regular o comportamento celular na adesão, diferenciação, migração e proliferação. A relevância da localização dos PGs nos tecidos resultou em um dos três critérios utilizados na sua classificação, sendo os demais critérios a composição do núcleo protéico e a dos GAGs.

Já as proteínas fibrosas são representadas principalmente pelo colágeno, pela elastina, fibronectina e laminina (FRANTZ *et al*, 2010). O colágeno é o constituinte mais abundante da massa protéica do reino animal, com até 30%, e é classificado em até 28 variações sutilmente combinadas no interior de cada tecido (FRANTZ *et al*, 2010). A maioria do colágeno é encontrada como uma estrutura protéica em hélice de cadeia tripla capaz de formar redes na membrana basal ou fibras no interstício. Ele proporciona resistência ao tecido e participa das funções de adesão, migração celular e quimiotaxia (ROZÁRIO *et al*, 2010). A elastina, por sua vez, é constituída de fibras protéicas interligadas recobertas por microfibras glicoprotéicas, as quais conferem elasticidade ao tecido. A outra proteína fibrosa principal é a fibronectina, distribuída em aproximadamente 20 isoformas. É uma proteína dimérica extensa repleta de sítios de ligação para componentes de matriz, como o colágeno e a heparina, e também para células, como, por exemplo, os sítios de ligação a integrinas (SMITH *et al*, 2007). Acredita-se que a atividade desses sítios é modulada por mudanças conformacionais dependentes de forças mecânicas, as quais podem ser derivadas de forças de tração celular. Dessa forma, a fibronectina também influencia a sinalização celular (SMITH *et al*, 2007 e VOGEL, 2006). Por fim, destaque a laminina, que, juntamente com o colágeno tipo IV e os PGs, é um dos principais componentes da membrana basal, a qual possui sítios de adesão para as células e promove coesão e resistência à matriz pericelular (THEOCHARIS *et al*, 2015). Ela é representada por ao menos 15 variações nos mamíferos, cuja combinação parece estar intimamente ligada às funções de cada tecido. Por estar presente na membrana basal endotelial, a laminina também participa da angiogênese (HALLMANN *et al*, 2005). A angiogênese, por sua vez, é o principal desafio enfrentado pela recelularização de órgãos atual, pois, frequentemente, não ocorre de maneira homogênea e abrangente (CHANG *et al*, 2017).

A homeostase da matriz extracelular é regulada basicamente pela ação coordenada entre a síntese de enzimas, de inibidores enzimáticos e de fatores de crescimento (FC) (FRANTZ *et*

al, 2010). Tal ação compreende o controle da secreção de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores, as quais são enzimas de degradação da matriz importantes para o remodelamento tecidual. O remodelamento tecidual, por sua vez, apesar da complexidade ainda não elucidada de todos os seus mecanismos efetores (ROSMARK, 2018), pode ser descrito basicamente como um processo de produção e degradação de moléculas da matriz, controlado pelas células, pela estrutura e composição da matriz extracelular e também pela interação molecular intercelular; o qual está presente durante todo o período de lesão, reparo e de cicatrização de feridas (BONNANS *et al*, 2014; CHANG *et al*, 2014; DEUEL *et al*, 2014; ROSMARK *et al*, 2018). Além das metaloproteinases, destacam-se também a Lisil Oxidase (LOX), responsável pelas ligações covalentes entre moléculas de colágeno; e as transglutaminases (TGs), família de enzimas atuantes na formação de ligações cruzadas entre diferentes proteínas e peptídeos da matriz, a qual é capaz de formar complexos proteicos supramoleculares relacionados aos processos de cicatrização de feridas e migração celular (LORAND & GRAHAM, 2003). Os fatores de crescimento, por sua vez, são moléculas biologicamente ativas, majoritariamente peptídeos e proteínas, secretadas pelas próprias células-alvo ou pela membrana plasmática de células adjacentes. O remodelamento, através da degradação proteolítica, libera os fatores de crescimento do reservatório na matriz extracelular, a fim de promover ou inibir a mitose, a migração de células epiteliais, a diferenciação celular e regular a morfogênese dos órgãos (BONNANS *et al*, 2014).

Por certo, a complexidade da matriz juntamente com seu papel modulador e mantenedor dos eventos celulares evidenciam o risco envolvido na ruptura ou na perturbação desse ambiente harmônico. Diversos processos patológicos estão associados ao remodelamento desregulado, como pode ser observado na fibrose, no câncer e na osteoartrite (BONNANS *et al*, 2014). Portanto, visto que a manutenção da estrutura e composição da matriz extracelular está intimamente ligada à qualidade do processo de descelularização e de recelularização, torna-se evidente a necessidade de diferentes técnicas para o controle de qualidade de cada processo de reconstrução de órgãos.

As técnicas vastamente utilizadas como método qualitativo de avaliação da matriz extracelular, decorrente do processo de descelularização, consistem na visualização do tecido ao microscópio óptico com o uso de corantes ou fluoróforos (CRAPO *et al*, 2011; KEANE *et al*, 2012); no uso de microscopia eletrônica de varredura (ERTEN, 2016; OTT, 2008; ROSMARK *et al*, 2018) para avaliação ultraestrutural e; com menor frequência, nas leituras espectroscópicas de Infravermelho (ATR-FTIR) e de Raman (NARA *et al*, 2016) para avaliação

composicional e também estrutural. Já as técnicas normalmente empregadas como métodos quantitativos compreendem as análises bioquímicas realizadas por leitura espectrofotométrica, como, por exemplo, a extração e quantificação de DNA, de proteoglicanos e de proteínas fibrosas (AUBIN *et al*, 2013); e menos frequentemente, a análise proteômica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS) (LI *et al*, 2015; HILL *et al*, 2015 e ROSMARK *et al*, 2018), cujo intuito é identificar e quantificar todo o conjunto de proteínas constituintes e associadas à matriz, atualmente denominado de matrissoma ou *matrisome*, no idioma inglês (NABA, 2012). Tais técnicas são tradicionalmente empregadas na avaliação de tecidos descelularizados e algumas integram o conjunto de ferramentas utilizadas no controle de qualidade de tecidos descelularizados comercializados (GILBERT *et al*, 2009; PHILIPS *et al*, 2018). Formalmente, uma descelularização bem-sucedida é aquela na qual não há resíduos celulares; quando a quantidade de DNA remanescente é inferior a 50 ng.mg⁻¹ de tecido seco (CRAPO, 2008), ou se a remoção de DNA é superior a aproximadamente 96% quando comparado ao órgão controle (GUYETTE, 2014; QUINN *et al*, 2016); e se a estrutura tridimensional foi mantida após o processo.

As análises histológicas mais empregadas com o intuito de verificar a presença de resíduos celulares após a descelularização são a coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) e a marcação com o fluoróforo 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, do inglês, *6-diamidino-2phenylindole*) (CRAPO *et al*, 2011; HUSSEY, 2018; KEANE *et al*, 2012). A técnica de H&E, datada de 1896 (HEINRICH *et al*, 2009), é utilizada para corar distintamente regiões basófilas e acidófilas de tecido, para isso, são utilizadas secções de aproximadamente 5µm de tecido previamente tratado para manutenção das estruturas. A Hematoxilina é um flavonóide extraído da árvore Campeche (*Haematoxylon campechianum*), que quando oxidado à Hemateína e em solução com um sal metálico, apresenta coloração azul e afinidade por estruturas de caráter ácido (estruturas basófilas), corando principalmente o núcleo devido aos ácidos nucleicos ((AUBIN *et al*, 2013; TITFORD *et al*, 2005). A Eosina, por sua vez, realiza a contracoloração, corando de rosa o citoplasma das células e as proteínas de caráter básico, as fibras de colágeno e demais estruturas acidófilas (TITFORD *et al*, 2005). Com a mesma finalidade, utiliza-se o fluoróforo DAPI, uma diamidina sintetizada com finalidade tripanocida (DANN *et al*, 1971), a qual é utilizada atualmente como um marcador fluorescente específico de sequências de DNA ricas em adenina e timina, cujo comprimento de onda de excitação máxima do complexo DAPI-DNA ocorre em torno de 363 nm e o de emissão máxima em 448 nm (KAPUSCINSKI *et al*, 1995).

De maneira complementar, as técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência são empregadas para visualização da manutenção dos componentes da matriz (KAWECKI *et al*, 2017) através da ligação desses constituintes a anticorpos marcados, tanto com o cromógeno 3,3- Diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) (AUBIN, 2013) quanto com fluoróforos, como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ZOU *et al*, 2019) e o Alexa Flúor (OTT *et al*, 2008). A imunohistoquímica é uma técnica na qual a interação específica entre uma imunoglobulina e seu antígeno homólogo é visualizada em secções histológicas por um marcador cromógeno detectável microscopicamente (SCANZIANI *et al*, 1998). Dois exemplos de anticorpos empregados na avaliação de componentes extracelulares são os anticorpos anti-fibronectina e anti-laminina (KAWECKI *et al*, 2017). Como descrito anteriormente, a fibronectina e a laminina são proteínas fibrosas presentes na matriz. A fibronectina apresenta sítios de ligação com diferentes moléculas, como o colágeno, heparina e integrinas (SMITH *et al*, 2007 e VOGEL, 2006), enquanto a laminina integra a membrana basal e participa da angiogênese (HALLMANN *et al*, 2005). A marcação com esses anticorpos específicos pode ser realizada com enzimas oxidoredutases, as quais, na presença do substrato, catalisam a oxidação da espécie química doadora de elétrons (o cromógeno) para produzir um precipitado colorido detectável (NELSON, 2013; SCANZIANI *et al*, 1998). Por outro lado, a técnica de imunofluorescência diferencia-se apenas por utilizar marcadores fluorescentes através de anticorpos conjugados com fluoróforos, os quais possuem comprimentos de ondas específicos nos quais necessitam ser excitados para que em um comprimento de onda superior possam emitir a fluorescência, que será visualizada por meio de um microscópio de fluorescência (ODELL *et al*, 2013).

Além da visualização de remanescentes celulares, há também a avaliação ultraestrutural. Para isso, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é utilizada na observação ultraestrutural dos tecidos descelularizados uma vez que demonstra o estado de preservação do arcabouço tridimensional em uma escala nanométrica, como pode ser observado em alguns trabalhos (ERTEN *et al*, 2016; OTT *et al*, 2008; ROSMARK *et al*, 2018). Os microscópios eletrônicos de varredura, apesar de possibilitar configurações distintas, apresentam, de maneira geral, um canhão de elétrons para bombardeio eletrônico da amostra e um console de controle para visualização da imagem (DEDAVID, 2007; GOLDSTEIN, 2003).

Além disso, utilizam-se as espectroscopias, as quais estudam a interação da radiação eletromagnética com a matéria com o intuito de determinar o estado composicional e estrutural

do espécime. Em tais técnicas, a transição de níveis energéticos, as suas posições no espectro eletromagnético e o tipo de nível energético (eletrônico, vibracional ou rotacional) acessado por cada radiação específica, irá revelar as características do sistema sob investigação, como, por exemplo, os estados rotacionais acessados pela radiação das microondas, os estados rotacionais e vibracionais acessados pelo infravermelho e as transições eletrônicas provocadas pela luz visível e radiação ultravioleta (NIEMZ, 2007). Dois representantes importantes dessa metodologia na análise de tecidos biológicos são a espectrometria no infravermelho (IV) e o espalhamento Raman (TALARI *et al*, 2016; YANG *et al*, 2011). A radiação infravermelha, ao ser absorvida por uma molécula orgânica, converte-se em energia de vibração molecular, e cada alteração de nível de energia vibracional é acompanhada de uma série de alterações de nível de energia rotacional. A posição de uma banda de absorção no espectro obtido é apresentada em número de ondas, cuja unidade, o centímetro inverso (cm^{-1}), é proporcional à energia de vibração. A intensidade da banda é expressa tanto por transmitância (T), representando a razão entre a energia transmitida pela amostra e a energia incidente, quanto por absorbância (A), a qual se refere ao logaritmo decimal do inverso da transmitância ($A = \log_{10} I / T$) (SILVERSTEIN, R. *et al.*, 2007).

Já o efeito Raman, descoberto em 1928 pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman (RAMAN, 1928), ocorre quando há incidência de luz monocromática sobre átomos e moléculas que, ao ser espalhada, pode se apresentar com a mesma frequência da luz incidente (conservando a energia) ou em frequências distintas (cedendo ou recebendo energia). As diferenças de energia são medidas em número de onda e correspondem às energias de vibração (apenas Stokes) e de rotação (Stokes e anti-Stokes) das moléculas dispersantes. As diferenças de número de onda são características das moléculas irradiadas e são utilizadas para extrair informações químicas, estruturais e funcionais de moléculas biológicas (VO-DINH, 2003; WEDLER, 2001).

Dos métodos empregados de forma quantitativa na bioengenharia tecidual, destacam-se a quantificação espectrofotométrica de DNA e a análise proteômica de órgãos descellularizados. Para a quantificação espectrofotométrica, o DNA é extraído da amostra e quantificado através da leitura da intensidade de absorbância em comprimento de onda determinado (360 nm), utilizando espectrofotômetro, no qual uma radiação incidente sobre uma molécula tem uma fração de sua energia eletromagnética transformada em energia interna da molécula (absorção), que, por sua vez, correlaciona-se diretamente à concentração dessas moléculas no meio (YOUNG *et al*, 2003). Já na proteômica, frequentemente, o analito é separado e identificado

pela cromatografia líquida (LC) acoplada à espectrometria de massas (MS) (LI, 2015; HILL, 2015 e ROSMARK, 2018). Na cromatografia líquida, as proteínas de interesse migrarão em ordens distintas, conforme as propriedades da coluna e da fase móvel utilizadas, e, com frequência, a seletividade que determina os tempos de retenção, no campo da descclularização de órgãos, é direcionada para características relativas à hidrofobicidade (NABA, 2012, ROSMARK, 2018). Na identificação das proteínas, utiliza-se a espectrometria de massas, que funciona como um detector acoplado à LC, no qual as proteínas são ionizadas no vácuo e introduzidas em um campo elétrico ou magnético. Dessa forma, suas trajetórias através do campo são identificadas como funções de suas relações massa-carga (m/z) (NELSON, 2013).

Com o desenvolvimento da descclularização de órgãos inteiros, limitou-se a capacidade de aplicação dessas metodologias citadas, pois as técnicas consolidadas e padronizadas para essa finalidade são invasivas e destrutivas, o que impede a avaliação individualizada dos órgãos descclularizados que serão submetidos ao processo de recelularização. Sendo assim, o desenvolvimento de técnicas alternativas tem recebido grande atenção nos últimos anos e, apesar do uso menos frequente, demonstram o avanço na interpretação e o maior domínio dos processos de descclularização de órgãos inteiros. Alguns exemplos são o uso de imagem por Geração de Segundo Harmônico (*SHG*) e microscopia de excitação por dois e três fótons (QUINN, 2016), os quais são capazes de prever o comportamento e as propriedades mecânicas de matrizes descclularizadas; a espectroscopia de Espalhamento Raman (RS) também pode ser utilizada como técnica não destrutiva (TIMCHENKO, 2017); bem como a Tomografia Computadorizada de Raios X por contraste de Fase (PC-CT) (HAGEN, 2015), Microtomografia Computadorizada (μ -CT) (HALLER, 2013) e Tomografia Computadorizada (CT) (GEERTS, 2016).

IV. Propriedades Ópticas dos Tecidos Biológicos

As propriedades ópticas de moléculas biológicas são amplamente exploradas na aplicação diagnóstica. Isso porque a habilidade da luz em interagir com o tecido expõe as características do sistema em análise (JACQUES, 2013). Existem diferentes fenômenos ópticos possíveis de serem explorados quando a luz interage com tecidos biológicos, como, por exemplo, a reflexão (ou espalhamento) especular, a reflexão difusa, a difração, a refração, a transmissão, a absorção e a fluorescência (NIEMZ, 2013; BORN, 2013).

O espalhamento irá ocorrer quando a frequência da onda eletromagnética incidente for distinta da frequência natural de vibração das moléculas do tecido, sendo que, as reflexões que sofrem espalhamento são de dois tipos: especular e difusa. Na reflexão especular, a radiação eletromagnética é refletida com o mesmo ângulo de incidência e, na difusa, os fótons penetram no tecido e sofrem múltiplos espalhamentos antes de saírem em várias direções pela superfície (NEIMZ, 2013). Intimamente relacionado ao espalhamento está o fenômeno da difração, no qual a luz é desviada de sua trajetória ao atravessar um meio. A difração tem natureza espacial, não implica em mudança de velocidade e frequência da onda eletromagnética incidente e produz um padrão de interferência entre as ondas difratadas formado pela superposição de ondas que se propagam em diferentes direções (BORN, 2013). A refração, por sua vez, é caracterizada pela mudança abrupta do ângulo de direção do caminho óptico da luz incidente devido à alteração da velocidade da radiação eletromagnética no meio (NEIMZ, 2013).

Já no fenômeno da transmissão, a radiação incide sobre o tecido e se propaga sem alteração da direção, podendo ou não alterar sua polarização. A fração incidente que é recuperada após essa travessia é denominada transmitância, ou seja, é a razão entre a luz incidente e a luz detectada após percorrer toda a amostra, razão esta que diminui exponencialmente com o aumento do comprimento do percurso percorrido pela luz (JACQUES, 2013; BEAVOUIT, 1995).

De maneira oposta, a absorção acontece quando a frequência da onda eletromagnética é igual à frequência natural das vibrações da partícula incidida. Nesse evento, ocorre o efeito de ressonância, e uma considerável parcela de absorção acontece (NEIMZ, 2013). Alternativamente, a absorção também pode ser descrita como um processo no qual há extração de energia da radiação por espécies moleculares do meio, a qual é explorada tanto como prática terapêutica quanto de diagnóstico, já que a energia absorvida promove as transições de níveis energéticos, em átomos e moléculas, necessárias para exercer efeito físico sobre o tecido; e, por serem específicas, as transições possibilitam a identificação dessas espécies (VO-DINH, 2003). Em termos práticos, a absorção ocorre quando a luz incidente é absorvida pelos cromóforos endógenos do tecido, como a hemoglobina, mioglobina, citocromo oxidase, água, dentre outros. Ela é diretamente proporcional à distância percorrida pela luz no interior do tecido (BEAVOUIT, 1995) e, quando ocorre após múltiplos espalhamentos, confere turbidez ao meio (JACQUES, 2013).

Por último, tem-se a fluorescência, um fenômeno resultante da transição de um nível de energia mais alto para um nível mais baixo que, por sua vez, é denominado decaimento. O decaimento é acompanhado por uma liberação de energia igual à diferença de energia entre os dois níveis. Esta liberação pode dar origem à emissão de um fóton, caracterizando, assim, o fenômeno da fluorescência (VODINH, 2003). Nos tecidos, a fluorescência se manifesta quando há fluoróforos presentes. Em um comprimento de onda de máxima excitação (λ_{exc}), esses componentes teciduais absorvem parte da radiação e emitem fluorescência, a qual é detectada em um comprimento de onda de máxima emissão (λ_{em}). O fóton emitido irá percorrer o caminho inverso da luz incidente no tecido e emergir em várias direções (DE VELD, 2005). Componentes autofluorescentes dos tecidos compreendem triptofano (λ_{exc} em 280 e λ_{em} em 350 nm), NADH (λ_{exc} em 290/340 e λ_{em} em 350 440/450), FAD (λ_{exc} em 450 e λ_{em} em 515 nm), colágeno e elastina (λ_{exc} em 325 e λ_{em} em 400 nm) e porfirinas (λ_{exc} em 405 e λ_{em} em 630/690 nm) (PAVLOVA *et al*, 2008).

Geralmente, tais propriedades ópticas dos tecidos são descritas em termos de coeficiente de absorção μ_a (cm^{-1}), coeficiente de espalhamento μ_s (cm^{-1}), função de espalhamento p (θ, ψ), onde θ é o ângulo do espalhamento e ψ é o ângulo azimutal do espalhamento, e índice de refração real do tecido, n' (JACQUES, 2013). Basicamente todos os demais parâmetros derivam dessas variáveis principais.

Exprime-se por coeficiente de absorção de um tecido a soma das contribuições da absorção de todos os cromóforos nele presentes (JACQUES, 2013). Existe uma variedade de cromóforos endógenos que contribuem para a o coeficiente de absorção, o qual vai variar conforme o tipo de tecido. Normalmente, o sangue e a água são predominantes na absorção de um tecido, mas também pode haver contribuição de outros componentes, como os lipídeos, a bilirrubina, o betacaroteno ou a melanina. O coeficiente de absorção do sangue total é influenciado principalmente pela hemoglobina, demonstrando diferentes perfis entre 400 nm e 600 nm conforme o seu estado de oxigenação, mas também pela água a partir de 1000 nm (JACQUES, 2013; NUNEZ *et al*, 2012). Em relação aos lipídeos, um trabalho realizado com tecido adiposo purificado de porco demonstrou máxima intensidade de absorção em 930 nm e bandas bem definidas por volta de 750 nm e acima de 1000 nm (van VEEN *et al*, 2004). Ao explorar a região do ultra-violeta entre 200 nm e 400 nm, a maior contribuição vem de proteínas e ácidos nucleicos, nessa região, tanto os tecidos moles quanto os tecidos mineralizados são fortemente absorvedores (NUNEZ *et al*, 2012). A soma dos coeficientes de absorção e de espalhamento é frequentemente referida por coeficiente de atenuação total, que nada mais é do que a radiação

que fica retida no tecido, seja por espalhamentos múltiplos seja por absorção (NUNEZ *et al.*,2012).

Em se tratando de coeficiente de espalhamento (μ_s), sua mensuração pode ser feita pela transmissão (T_c) através de um tecido de espessura L , especificamente, $\mu_s = -\ln(T_c) / L$, na qual a espessura do tecido deve ser igual ou inferior a 100 micrômetros para que a ocorrência de múltiplos espalhamentos não ocorra. O coeficiente de espalhamento também pode ser descrito matematicamente como aquele causado por partículas cujo índice de refração é distinto do índice do meio local (Espalhamento Mie e Rayleigh), ou ainda por aquele causado por um tecido no qual o índice de refração é contínuo, porém flutuante (Teoria do espalhamento contínuo). Os espalhamentos Mie e Rayleigh também são bastante aplicados à óptica biomédica, o primeiro descreve o espalhamento de partículas esféricas ideais de dimensões variadas em um meio, enquanto o segundo refere-se a partículas muito menores do que o comprimento de onda da luz, as quais estão no limite Rayleigh proposto pelo espalhamento Mie (JACQUES, 2013). Além disso, o espalhamento Mie, diferentemente do Rayleigh, apresenta fraca dependência do comprimento de onda da radiação (NEIMZ, 2013).

No entanto, quando se trata de ambientes túrbidos, ou seja, ambientes nos quais ocorrem simultaneamente espalhamento e absorção, faz-se o uso do coeficiente de espalhamento reduzido (μ_s'), um parâmetro que correlaciona o espalhamento a uma variável que exprime o valor médio do cosseno dos ângulos de espalhamento, denominado anisotropia (g) (NUNEZ *et al.*, 2012). De maneira geral, o coeficiente de espalhamento reduzido diminui com o aumento do comprimento de onda da luz incidente e é maior em tecidos fibrosos, derme, epiderme e alguns tumores do que em tecidos macios como pulmonar, cardíaco, renal, muscular e esplênico analisados (JACQUES, 2013). Tecidos com grande quantidade de colágeno, por exemplo, possuem espalhamento Rayleigh relacionado à densidade periódica de 70 nm ao longo das fibras de colágeno e aos espaçamentos interfibrilares menores do que 100 nm (SAIDI *et al.*, 1995; JACQUES, 1996). Da mesma forma, a quantidade de organelas membranosas, como as mitocôndrias e os lisossomos, também irão conferir espalhamento Rayleigh, neste caso, em virtude dos lipídeos das membranas (BEAUVOIT,1995; WILSON, 2007). Enquanto isso, o volume celular contribui para o espalhamento Mie, o qual é predominante nos tecidos quando comparado ao Rayleigh. No entanto, isoladamente, nenhum dos dois tipos de espalhamento é suficiente para descrever o comportamento da luz nos tecidos biológicos (BEAUVOIT, 1995; NEIMZ, 2013). Tais características intrínsecas do tecido influenciam na escolha da forma de

mensuração do espalhamento, o qual pode ser calculado considerando as contribuições individuais dos espalhamentos Rayleigh e Mie a um comprimento de onda de referência, ou utilizando uma única contribuição através da variável adimensional denominada “poder de espalhamento” (JACQUES, 2013).

Por fim, a função de espalhamento é particularmente importante quando se trata de um ou de poucos eventos de espalhamento, como o que ocorre com camadas mais finas de tecido utilizadas na microscopia de reflectância. No caso de camadas espessas de tecido, pelo fato de o espalhamento ser múltiplo e de as estruturas estarem orientadas randomicamente, tanto θ quanto ψ serão médias estimadas, tal que o parâmetro médio denominado anisotropia (g) irá caracterizar o espalhamento do tecido em termos de direção da luz espalhada. Geralmente, os valores de g em materiais biológicos variam entre 0,7 e 0,99 e o θ mais freqüente está entre 8° e 45° , onde g igual a 1 representa o espalhamento na mesma direção da onda incidente e g igual a -1 significa retroespalhamento (JACQUES, 2013; NUNEZ, 2012).

3. Materiais e Métodos

I. Animais

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES) sob licença nº 033-2014 e foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA-Brasil). Foram extraídos 20 corações de ratos Wistar, machos, jovens, com peso médio de 295 ± 29 g e idade entre 08 e 10 semanas. Os animais são originários do biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e foram mantidos sob ciclo claro / escuro controlado de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 ° C, umidade relativa de $60 \pm 5\%$ e água e ração *ad libitum* até a eutanásia.

II. Descelularização de Órgãos

Os animais foram heparinizados (2UN.g-1 Hepamax-s, Blausiegel®) e anestesiados com cetamina (90mg / kg Ketamine-Vetnil®) e xilazina (10mg.kg-1 Rompun-Bayer®) por via intraperitoneal. Em decúbito dorsal, os corações foram extraídos após incisão sob o osso esterno e congelados a -80 ° C por até 48 horas. Em seguida, o descongelamento progressivo dos órgãos foi realizado, durante 12 horas a -20 ° C e 12 horas a 4 ° C. Sequencialmente, os tecidos adjacentes foram removidos e o órgão foi pesado, obtendo valores entre 0,9 e 1,4 gramas. Os corações foram fixados em um suporte e as aortas ascendentes foram acessadas para perfusão retrógrada de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS), por canulação aórtica e conexão com a bomba peristáltica (Gilson ®), a qual promoveu a perfusão anterógrada através das artérias coronárias. O processo de descelularização dos corações foi realizado de acordo com o protocolo previamente publicado por Guyette et al., 2014. Em resumo, o tampão fosfato de sódio (PBS, pH 7,3) foi perfundido por 30 minutos a uma vazão inicial de $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, e em seguida, foi feita a perfusão coronariana de SDS (1% vv-1), por um período entre 10 e 12 horas e pressão máxima de 80 mmHg. Ao final do período, perfundi-se, sequencialmente, água destilada durante 30 minutos, reagente Triton-X-100 (1% vv-1) durante 30 minutos e, por fim, novamente PBS durante 1 hora. Após o procedimento, os órgãos foram colocados em um

freezer a -80°C , e foram liofilizados (L101 - Liotop®) e armazenados a -80°C até a quantificação do DNA. Os órgãos-controle também foram liofilizados e armazenados a -80°C .

III. Montagem do Sensor

O sensor óptico aplicado à descclularização de órgãos consiste em um sistema composto por dois módulos acoplados a uma base ajustável nos três eixos (x, y e z) que possibilita o alinhamento adequado do órgão a ser descclularizado (Figura 1). O primeiro módulo apresenta uma fonte luminosa de amplo espectro e alto brilho de potência igual a 12 W (*watt*) (LED de luz branca). No lado oposto, encontra-se o segundo módulo, um sistema de aquisição de dados desenvolvido no Departamento de Engenharia de Controle e Automação do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES-SERRA), o qual é composto por um fotodetector (fotodiodo Hamamatsu S6036, com intervalo espectral de 320 nm a 1100 nm), e uma plataforma de prototipagem eletrônica de hardware livre e de placa única (Arduíno Uno) conectada ao computador, no qual o *software* de programação convenientemente utilizado, *Matlab*®, registra os dados e elabora o gráfico simultaneamente. No centro, o órgão é fixado e perfundido com os reagentes específicos. Uma agulha conecta o órgão a uma mangueira para perfusão dos reagentes de descclularização. Nas laterais da estrutura central estão os botões de ajuste de altura da base, de proximidade da fonte de luz em relação ao órgão e de alinhamento dos componentes “detector – órgão – luz”. Após o alinhamento, deve ser iniciado o programa para o registro dos valores de tensão detectados pelo fotodiodo. Todo o sistema encontra-se no interior de uma câmara escura para isolar da luz do ambiente (pedido de patente INPI BR 10 20170091872).

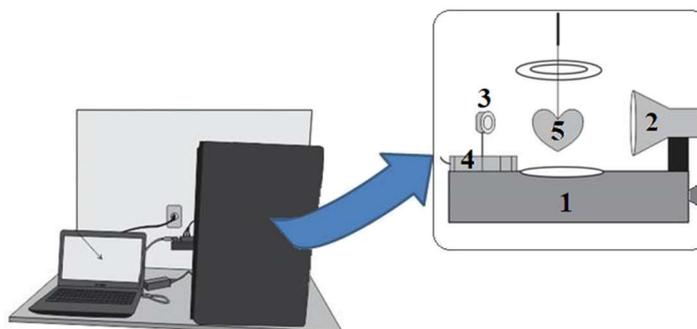


Figura 1. Esquema do sistema de sensoriamento óptico, no qual (1) representa a base ajustável; (2) a fonte luminosa; (3) o fotodetector; (4) componente da plataforma de prototipagem que se

conecta ao computador; e em (5) encontra-se o órgão conectado à mangueira do sistema de perfusão.

A escolha pela utilização de fonte luminosa do tipo LED foi pautada no baixo potencial de prejuízo à matriz proteica uma vez que não foi verificado aumento de temperatura no ambiente circundante e de emissão significativa de radiação ultravioleta (Figura 2-a). As demais fontes testadas foram a incandescente (Figura 2-b) e a fluorescente (Figura 2-c). A fonte incandescente, apesar de possuir um amplo espectro, demonstrou um pronunciado aumento da temperatura no interior da câmara escura. A lâmpada fluorescente, por sua vez, apresentou um espectro irregular e emissões pontuais de alta intensidade em 400 nm, 450 nm e 550 nm.

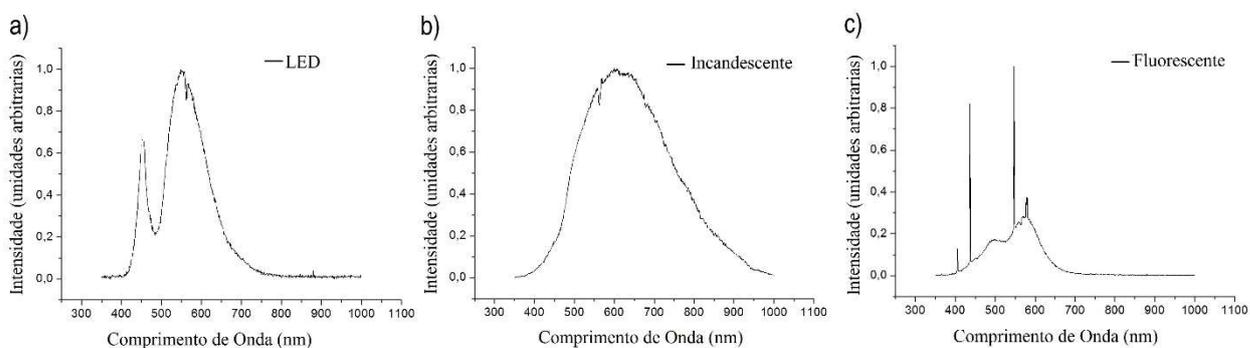


Figura 2. Gráficos de Intensidade vs Comprimento de onda obtidos a partir da leitura espectral das fontes ópticas utilizando um espectrofotômetro portátil de fibra óptica (Ocean Optics). **a)** Espectro da fonte luminosa utilizada no sistema de sensoriamento óptico (LED - *Light emitting diode*). **b)** Espectro da lâmpada incandescente avaliada. **c)** Espectro da lâmpada fluorescente avaliada.

IV. Aquisição dos Dados

As descelularizações foram realizadas dentro da estrutura construída para encaixar o coração entre a fonte de luz e o fotodetector. Durante a perfusão com o SDS, o software registra a tensão e confecciona o gráfico simultaneamente. A configuração do sensor foi feita mantendo uma distância de 5 cm entre a lâmpada e o órgão, posicionamento do órgão com a face esternocostal voltada para o fotodetector e face diafragmática para a fonte de luz. A centralização dos órgãos foi realizada baseando-se no menor valor de tensão atingido. O valor de 0V significa ausência de fótons detectados pelo sensor e 5V corresponde à tensão de

saturação do sistema. As variações intrínsecas da fonte de luz foram monitoradas por 20 horas (Figura 3-a). Os valores de tensão da perfusão da água através de um órgão previamente descelularizado foram coletados durante 1 hora para verificação da estabilização em meio turvo (Figura 3-b). Antes de cada registro de dados, a fonte de luz foi ligada com cerca de 2 horas de antecedência, pois verificou-se que o tempo para estabilização, considerando o decaimento verificado pelo fotodiodo, poderia ser maior do que 1 hora (Figura 3-c).

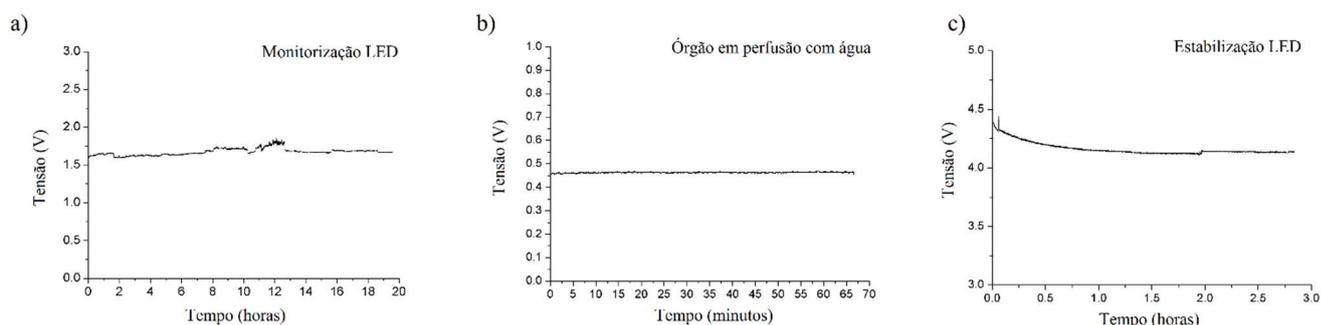


Figura 3. a) Gráfico de Tensão vs Tempo de 20 horas de monitorização do comportamento da fonte de luz (LED) isoladamente. b) Gráfico Tensão vs Tempo da perfusão com água de um órgão previamente descelularizado. c) Gráfico de Tensão vs Tempo da fonte de luz (LED) do momento em que é ligada até a sua completa estabilização.

V. Extração de DNA

O protocolo utilizado para extração de DNA foi o de extração salina, inicialmente desenvolvido por Brufford et al (1992) e aprimorado por David Vieites (UC Berkeley). Resumidamente, os órgãos liofilizados foram cortados com bisturi, os fragmentos foram pesados (até 0,015 gramas), finamente picotados e acondicionados em eppendorf. Posteriormente, sucederam-se as etapas para lise, precipitação e purificação. Na etapa para lise, adicionou-se uma alíquota de 410 μ l de buffer de extração (1% de TRIS - 1M, 2% de NaCl - 5M, 2% de EDTA - 0,5M e água ultrapura), 80 μ l de SDS (10%) e 15 μ l de solução de proteinase K (20 μ g/uL), incubando a solução a 55°C por 12 horas. Na etapa de precipitação, centrifugou-se o frasco, transferindo o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se 180 μ l de NaCl (5M), homogeneizando e centrifugando o frasco novamente. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 800 μ l de

isopropanol previamente armazenado a -20°C. Após homogeneização e nova centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 250 µl de etanol (80%), repetindo a operação uma vez para purificação. Em seguida, centrifugou-se novamente o frasco, descartou-se o sobrenadante e o etanol remanescente foi removido por evaporação a 55°C. O *pellet* (material precipitado) foi diluído em 25 µl e 50 µl de água ultrapura para o descelularizado e o controle, respectivamente. Finalmente, os frascos foram armazenados entre 4 e 8°C *overnight* para posterior leitura espectrofotométrica (Nanodrop® 2000 -Thermo Scientific) e quantificação de DNA por miligrama de tecido liofilizado.

VI. Estatística

As variações de DNA entre os grupos de estudo foram comparadas pela análise de variância univariada de Welch (ANOVA) para dados heterocedásticos e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as comparações pareadas foram realizadas considerando o método de Bonferroni também para dados heterocedásticos. Os valores são expressos como médias \pm DP (desvio padrão). O grupo Descelularização Completa incluiu as descelularizações com um DNA residual máximo de 4,6%, representando uma concentração de DNA de 27 (\pm 19 SD) ng.mg⁻¹ de peso seco (n = 6). O grupo Descelularização Incompleta compreendeu descelularizações com menos que 95,4% de remoção de DNA, representado por uma concentração média de 301 (\pm 140 SD) ng.mg⁻¹ de peso seco (n = 8). Para a tensão típica ao longo do tempo, foi ajustado o modelo não linear misto, com efeitos fixos e aleatórios, pelo método de máxima verossimilhança utilizando o software R (versão 3.1 de Pinheiro e Bates, 2000), o qual foi realizado pelo Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo (IME-USP). O modelo inclui um efeito aleatório para cada órgão para levar em conta que as medidas avaliadas no mesmo órgão estão correlacionadas. Um modelo de regressão não-linear logístico de quatro parâmetros (GADAGKAR & CALL, 2015; HILL,1910) obteve o melhor ajuste e é definido conforme segue:

$$y = \frac{V1 - V2}{1 + \left(\frac{t}{t_0}\right)^s} + V2$$

No qual y é a tensão típica (volts) no tempo t (segundos), $V1$ representa a tensão inicial, $V2$ representa a assíntota máxima ou a tensão máxima, s corresponde à inclinação da curva e t_0 ao

ponto de inflexão, ou seja, o tempo médio entre os valores de tensão mínimo e máximo das assíntotas. Preliminarmente, este modelo foi submetido a uma análise descritiva dos gráficos utilizando o software Origin pro8. O modelo não linear escolhido apresentou todos os parâmetros interpretáveis e ajustou-se bem aos dados observados, com a mesma curva em formato sigmóide identificada no perfil individual das tensões ao longo do tempo. O coeficiente de determinação ajustado (R^2 ajustado) do nosso modelo foi de 0,975.

VII. Análises de Histoquímica e Imunohistoquímica

Basicamente, a preparação do tecido para as técnicas histológicas compreendeu a etapas de fixação, desidratação, inclusão, microtomia, montagem e coloração. Uma vez findada a descclularização, os órgãos foram fixados em solução de 4% de paraformaldeído com tampão fosfato de sódio (PBS, pH 7,4) por, no mínimo, 48 horas. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em tubos de prolipropileno cônicos, de 15ml, para desidratação em banhos seqüenciais de 30 minutos com concentrações crescentes de etanol, compreendendo 70%, 95% e 100%. Para a etapa de inclusão foi realizada a infiltração com Historesina histológica (Historesin Embedding Kit - Jung, Germany). Inicialmente, as amostras foram embebidas em solução 1:1 de álcool absoluto e historesina 2-hidroxietil metacrilato (Solução A) por 12 horas a uma temperatura entre 4°C e 8°C. A seguir, os tecidos foram imersos em solução de historesina 100% por um período de 24 horas, também a uma temperatura entre 4°C e 8°C. Passada a infiltração, as amostras foram colocadas em bandejas plásticas contendo a resina (Solução A) acrescida de solução para solidificação (Solução B - hardner) conforme descrito pelo fabricante. As bandejas foram, então, incubadas à temperatura de 37°C por 24 horas e, por fim, os blocos de resina foram fixados a cubinhos de madeira para proceder com os cortes histológicos. Na etapa de microtomia, foram feitos cortes de 5 µm de espessura para os tecidos destinados à histoquímica e de 3 µm para aqueles destinados à imuno-histoquímica. Para isso, foi utilizado o micrótomo manual Leica Biosystems, German. Os cortes das amostras do grupo controle e dos grupos descclularizados foram sobrepostos a lâminas de vidro e silanizadas (Graulab®) para os ensaios de histoquímica e imuno-histoquímica, respectivamente. A partir daí, foi dado continuidade aos protocolos específicos para as colorações de visualização, os quais são seguidos pela etapa de montagem das lâminas em meio não aquoso p-xylene-bis-(N-pyridinium bromide) (DPX, Sigma-Aldrich); e, por fim, realizou-se a análise do material e a

captura das imagens utilizando fotomicroscópio (Olympus® AX70) acoplado com câmera digital (Axiocam Erc5s, Zeiss®). O ensaio histoquímico realizado foi o ensaio de coloração de Hematoxilina & Eosina, enquanto a análise Imuno-histoquímica compreendeu a marcação das proteínas fibrosas Fibronectina e Laminina nos cortes de histológicos.

Os cortes de 5 µm de espessura em lâminas de vidro foram submersos em hematoxilina de Harris por 2 minutos e 30 segundos e em seguida, foram lavados em água corrente por 5 minutos e imersos em eosina por 7 minutos. Após a coloração, as lâminas foram submetidas a uma nova lavagem em água corrente para remoção do excesso de corantes e acondicionadas em estufa à temperatura de 37 °C para montagem. Foram processados três órgãos por grupo, totalizando 9 órgãos (Grupos Nativo, Descelularização Completa e Descelularização Incompleta).

Já as secções histológicas de 3 µm de espessura em lâminas silanizadas foram submetidas ao protocolo de imuno-histoquímica, o qual consiste em, essencialmente, 6 etapas: preparação do tecido, recuperação antigênica, bloqueio de peroxidase endógena, bloqueio de proteínas inespecíficas, ligação de anticorpo primário, conjugação com anticorpo secundário e revelação com o cromógeno. Dessa forma, preparou-se o tecido através de sua imersão sequencial em soluções de Toluol, Xilol e Acetona, por 20, 20 e 10 minutos, respectivamente. Em seguida, as secções foram reidratadas por 5 minutos em soluções de etanol de concentrações decrescentes em água, compreendendo, 100%, 70%, 50%, 30% e água destilada 100%. Todas as lâminas foram, então, acondicionadas em um suporte plástico para lâminas, contendo tampão citrato de pH 6,0 (Spring Bioscience® Germany), o qual foi aquecido por 15 minutos para recuperação antigênica em microondas em baixa intensidade. Passados 20 minutos para resfriamento, realizaram-se três banhos de 5 minutos em solução tampão de TRIS (tris-hidroximetilaminometano) de pH 7,4. Para delimitação dos cortes nas lâminas, foi utilizada caneta hidrofóbica (Sigma-Aldrich, USA). A etapa de bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com o substrato peróxido de hidrogênio durante 20 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, seguido por de três banhos de 5 minutos em solução tampão de TRIS. Na etapa de bloqueio de proteínas inespecíficas, utilizou-se solução bloqueadora de soro de albumina bovina em tampão de fosfato de sódio 10% e gelatina 0,01% sobre os cortes delimitados durante 20 minutos. Depois, foram lavados com PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Retirou-se o excesso de solução por gravidade e sobre as secções adicionou-se um volume de 40 µl de anticorpo primário anti-fibronectina (AB2413, Abcam®) na diluição de 1:100 e, em igual número de amostras, adicionou-se o anticorpo anti-laminina (AB11575,

Abcam®), as quais foram incubadas durante o período noturno em câmara úmida à temperatura entre 4°C e 8°C. Após três lavagens de solução tampão TRIS, a incubação com o anticorpo secundário conjugado à enzima HRP (*horseradish peroxidase*) (Nichirei Biosciences Inc., Japão) foi realizada durante uma hora e seguida por lavagem em TRIS. Finalmente, na etapa de revelação da reação, foram utilizados 15 minutos de incubação de cromógeno 3,3-Diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) (Spring Bioscience®, Germany). As lâminas foram, então, lavadas em água corrente e desidratadas em álcool para proceder com a montagem. Foram avaliados três órgãos para o grupo Nativo (controle) e três órgãos para o grupo Descelularização Completa.

VIII. Quantificação de Componentes da Matriz

Colágeno

A hidroxiprolina é um aminoácido derivado da hidroxilação enzimática da prolina. Por ser um dos principais responsáveis pela estrutura secundária do colágeno, é utilizado para quantificar esse componente de matriz. Para isso, foi utilizado protocolo estabelecido na literatura (REDDY & ENWEMEKA, 1996; EDWARDS, 1980). Resumidamente, fragmentos de corações liofilizados dos grupos controle (n=3) e descelularizado (n=6) foram depositados em solução de 50 µl de hidróxido de sódio 7 N em tubos plásticos cônicos de 15 ml para realização de hidrólise alcalina. Uma amostra sem tecido foi utilizada como branco. As amostras foram autoclavadas a 120 °C (p ≈ 98,1 kPa) por 40 minutos. Em seguida, 50 µl de ácido sulfúrico 3,5 M foram adicionados ao hidrolisado e completou-se o volume para 1 ml com água destilada qsp. Dessa solução, 50 µl foram transferidos para um microtubo, sobre os quais adicionou-se um volume de 450 µl de Cloramina T 0,0025M, que repousou por 25 minutos em temperatura ambiente. Depois, foram adicionados 500 µl de reagente de Erlich 0,5 M e, então, aquecidos em banho-maria por 15 minutos à temperatura de 60°C. Para a leitura das absorbâncias, as amostras foram depositadas em microplaca de 96 poços, os quais foram lidos no comprimento de onda de 560 nm em leitora de placa do Modelo Varioskan Flash, Thermo Fisher. Para a construção da curva padrão utilizou-se um padrão de hidroxiprolina (Sigma Aldrich, USA) e, a partir de uma solução de 2.600 µg/ml, diluições seriadas com água destilada na proporção 1:1 resultaram no intervalo de concentração entre 2,5 e 1.300 µg/ml de

hidroxiprolina. Os valores de absorvância obtidos foram calculados utilizando a equação da reta $y = 0,003474 \times x + 0,06491$ (R=0,997), no qual o eixo das abscissas corresponde à concentração de hidroxiprolina e o eixo das ordenadas aos valores de absorvância. A leitura foi realizada com 50 µl para cada teste.

Glicosaminoglicanos Sulfatados

Para a determinação dos glicosaminoglicanos na forma de sulfato de condroitina utilizou-se o método de marcação com o corante *Alcian Blue* anteriormente descrito na literatura (KARLSSON; BJÖRNSSON, 2001; ZVAROVA *et al.*, 2016). Para a construção da curva padrão, utilizou-se uma solução contendo de sulfato de condroitina de 800 µg/mL. Foram preparadas soluções diluídas com água destilada na proporção 1:1. Sendo assim, as concentrações compreenderam o intervalo de 3,1 a 400 µg/ml de sulfato de condroitina em microtubos plásticos cônicos. Amostras de tecidos controle e descelularizado foram acondicionados em microtubos, os quais continham 50 µl de solução de guanidina em HCl 8M. Aliquotas de 50 µl de solução de guanidina em HCl 8M foram novamente adicionados aos tubos, totalizando 100 µl. Em seguida, acrescentaram-se 50 µl de solução Triton X-100 0,75% em ácido sulfúrico 0,3% (reagente SAT). Após 15 minutos, adicionou-se um volume de 750 µL de reagente *Alcian Blue*, e os tubos foram incubados durante 12 horas a uma temperatura entre 4 °C e 8°C. Depois, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm, por 15 minutos, e sobrenadante foi descartado. Um volume de 500 µl de DMSO foi adicionado aos tubos para ressuspensão do *pellet*, o qual foi mantido em agitação constante por 15 minutos. Sequencialmente, centrifugaram-se os tubos novamente a 12.000 rpm, por 15 minutos, descartando o sobrenadante como anteriormente. Por fim, adicionou-se um volume de 500 µl de solução Guanidina em Propanol e água para nova ressuspensão do *pellet*. As amostras foram transferidas para cubetas de quartzo de 0,5 ml, e prosseguiu-se com a leitura à 605 nm em espectrofotômetro. Os valores de absorvância foram calculados utilizando a equação da reta $y = 0,00464 \times x + 0,03643$ (R=0,997), no qual o eixo das abscissas corresponde à concentração de sulfato de condroitina e o eixo das ordenadas aos valores de absorvância.

IX. Análises Espectroscópicas

Espectroscopia Raman

Os órgãos foram acondicionados em freezer à temperatura de -80°C por no mínimo 48 horas. Posteriormente, foram liofilizados em liofilizador L101 da Liotop[®] e a região da base do coração foi extraída para ser submetida a análise (ventículos). Para a leitura Raman, posicionaram-se os tecidos sobre uma lâmina de vidro e sob o espectrômetro Raman Metrohm (*Metrohm Instant Raman Analyzers – Mira*). A leitura do espalhamento Raman foi realizada com laser de 785 nm e nas frequências vibracionais entre 400 cm^{-1} e 2000 cm^{-1} . Foram analisados dois órgãos de cada grupo, os quais são Descelularização Completa, Descelularização Incompleta e Nativo, totalizando 6 órgãos.

Espectroscopia no Infravermelho

Órgãos foram acondicionados em freezer à temperatura de -80°C por no mínimo 48 horas, posteriormente, foram liofilizados em liofilizador L101 da Liotop[®]. Amostras de tecidos dos grupos foram então submetidos à análise vibracional de espectrometria no infravermelho com Transformada de Fourier com o equipamento FT-IR/FT-NIR Spectrum 400 PerkinElmer. A transmitância foi mensurada nas frequências vibracionais entre 3.000 cm^{-1} e 600 cm^{-1} e foram analisados dois órgãos de cada grupo, grupos Descelularização Completa, Descelularização Incompleta e Grupo Nativo.

X. Orientação da Detecção com Análise Espectral

Para analisar o comportamento de cada região do espectro eletromagnético durante a descelularização dos órgãos, a detecção de luz foi orientada a fim de captar as medidas relativas à reflectância e à transmitância. Para isso, utilizaram-se duas fibras ópticas monomodo posicionadas em ângulos de 180° e 90° em relação à fonte óptica, as quais foram conectadas a um espectrofotômetro de fibra óptica (Ocean Optics USB2000) para monitoramento do processo de descelularização. Os registros dos dados foram feitos a cada 30 minutos nas primeiras duas horas, e posteriormente, a cada 1 hora. As leituras foram realizadas em três processos de descelularizações.

XI. Avaliações Adicionais

Perfil Óptico Gerado por Outras Fontes Luminosas

Avaliou-se a utilização de luz com emissão em determinados intervalos de comprimento onda a fim de adquirir informações adicionais para interpretação dos perfis ópticos, discussão dos resultados e também como possibilidade de melhoramento do sensor óptico, consistindo, portanto, em um segundo protótipo (Figura 4). No novo sistema, a plataforma *Arduíno* foi substituída pela placa Dragonboard 410c (Qualcomm) e a fonte de Led branco por 7 fontes diferentes, a saber, infravermelho (940 nm, Lumiled Luxeon), vermelho (692 nm, Osram *Opto Semiconductors*), amarelo (590 nm, Osram *High Power LED*), âmbar (600 nm, Lumiled Luxeon), verde (525 nm, Osram *Opto Semiconductors*), ultravioleta (385 nm, Lumiled Luxeon) e branca (Osram *High Power LED*). Além disso, foram adicionadas duas câmeras para monitoramento: uma câmera para ampliação e outra para visualização global. Esse novo sistema em desenvolvimento conta com o apoio do Instituto Federal do Espírito Santo (Serra-ES) e da empresa Qualcomm, por meio de contrato de empréstimo de equipamentos para pesquisa da Anatel.



Figura 4. Imagem externa do segundo protótipo durante a realização dos testes com LEDs de diferentes comprimentos de onda e câmeras para visualização do processo (à esquerda). Imagem interna da configuração do segundo protótipo para monitorização por vídeo (à direita).

4. Resultados

I. Quantificação de DNA, de Colágeno e Análise das Massas.

Todas as descelularizações estudadas foram interrompidas de acordo com o intervalo de tempo descrito no protocolo, e após a constatação da transparência do órgão com clara visualização dos ductos vasculares, como exemplificado na Figura 5 (a-c). Além disso, observou-se que os órgãos já se mostravam transparentes a partir do momento no qual a assíntota era alcançada. Após esse estágio e até a última hora de duração da perfusão com SDS, visualizava-se um aumento sutil na transparência do órgão. A partir daí, não eram mais observadas alterações macroscópicas na sua coloração ou aspecto.

O parâmetro quantitativo utilizado para determinar o sucesso da remoção celular foi a concentração de DNA. Dessa forma, tendo em vista os resultados da quantificação de DNA dos órgãos submetidos ao processo de descelularização, foram criados dois grupos, Descelularização Completa e Descelularização Incompleta; e, como referência, foi criado um terceiro grupo, o grupo Nativo (Figura 5-d). O grupo Descelularização Completa compreendeu os órgãos nos quais a concentração de DNA remanescente foi abaixo de 4,6%, quando comparado aos órgãos do grupo Nativo (Controle), o que correspondeu a uma média de 27 (\pm 19 DP) ng de DNA por mg de matéria seca da matriz extracelular e uma média percentual de 2,4% (\pm 1,6% DP). Já o grupo Descelularização Incompleta foi representado por uma concentração média de DNA de 301 (\pm 141 DP) ng.mg⁻¹, referente à média percentual de 25,9% (\pm 12,1% DP) de DNA remanescente.

Em relação à quantificação de Colágeno, utilizou-se a determinação da quantidade de Hidroxiprolina como modelo para inferir a quantidade de colágeno no tecido (Figura 5-e). A partir dos resultados, observou-se uma diferença estatisticamente não significativa entre as concentrações médias dos grupos Nativo, Descelularização Completa e Descelularização Incompleta.

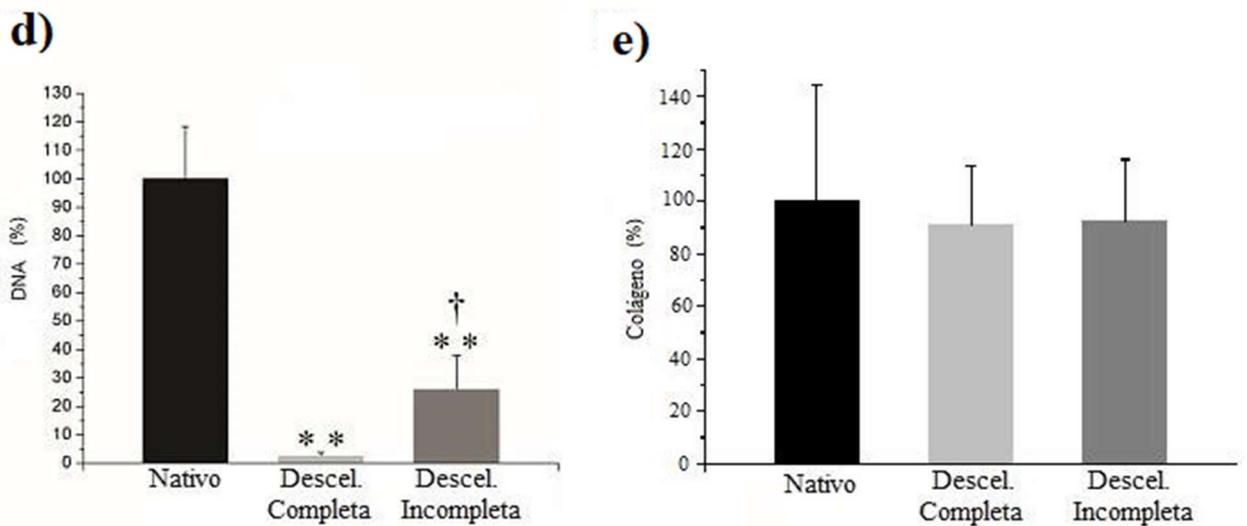
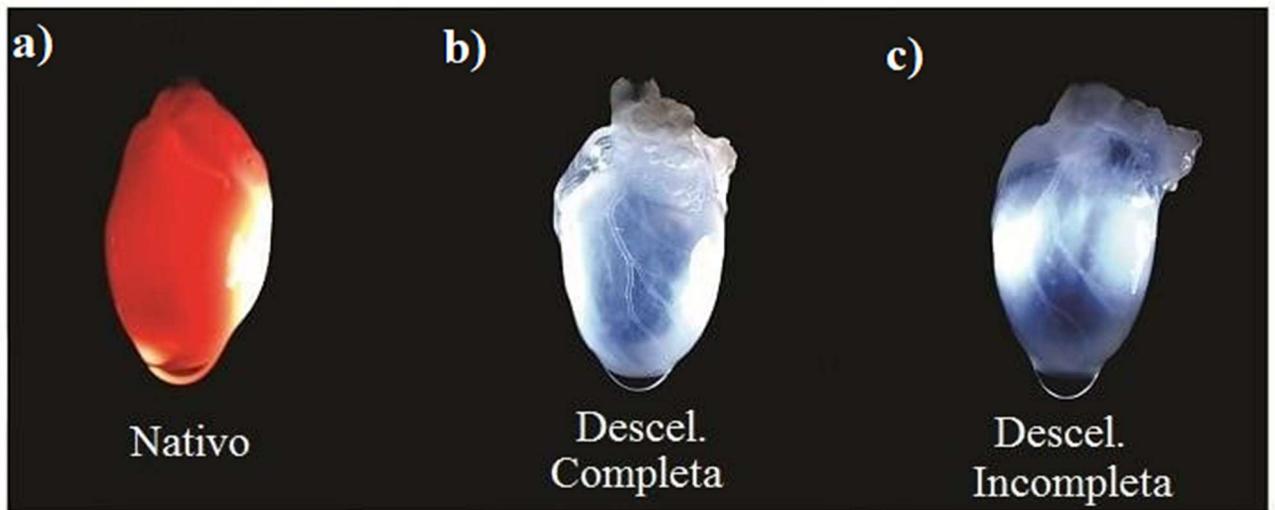


Figura 5. (a) Imagem de um coração de rato do Grupo Nativo, (b) do Grupo Descelularização Completa e (c) do Grupo Descelularização Incompleta. (D) Gráfico de barras de porcentagem de DNA de tecido cardíaco liofilizado do grupo Nativo (n = 6), Descelularização Completa (n = 6) e Descelularização Incompleta (n = 8). ** p = 0,0002 vs. grupo nativo; † p = 0,0036 vs grupo Descelularização Completa. Valores são média ± DP. (e) Gráfico de porcentagem de Colágeno no tecido cardíaco liofilizado, em comparação ao controle (n = 4 por grupo, p>0,05). Modificado de Pereira *et al*, 2019.

As médias das massas dos animais e dos órgãos *in natura* utilizados na descelularização estão expostos na Tabela 1 e mostram diferenças estatisticamente não significantes entre os grupos Descelularização Completa e Descelularização Incompleta. Com uma probabilidade de

26% de se obter esse resultado ao acaso, a massa média dos animais mostrou-se substancialmente maior no grupo Descelularização Incompleta. A massa média dos órgãos, por sua vez, apresentou uma probabilidade de quase 50% de obtenção desse resultado quando não houver o efeito da massa dos órgãos sobre a eficiência da descelularização. Essa avaliação sugere que o efeito massa do animal deve prevalecer sobre o efeito massa do órgão no desenvolvimento de um algoritmo que pontue a probabilidade de eficiência da descelularização futuramente.

Tabela 1. Valores de massa média dos corações *in natura* e da massa dos animais com desvio padrão e valor de *p*, comparativamente entre os grupos Descelularização Completa e Descelularização Incompleta.

GRUPO	MÉDIA DA MASSA DOS ÓRGÃOS (g)	DP	<i>P</i> *
Descelularização Incompleta	1,3	0,07	0,48
Descelularização Completa	1,2	0,14	
GRUPO	MÉDIA DA MASSA DOS ANIMAIS (g)	DP	<i>P</i>
Descelularização Incompleta	320,8	35,03	0,26
Descelularização Completa	287,7	23,0	
Teste T bicaudal para variâncias iguais. * $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.			

II. Sistema de Sensoriamento Óptico da Descelularização

O protótipo desenvolvido está exposto na Figura 6(a, b). Nele, o órgão está centralizado e alinhado com a fonte luminosa por meio de um sistema de alinhamento de três eixos. Todo o sistema está contido no interior de uma câmara escura, que conecta-se externamente a um computador para confecção simultânea do gráfico referente ao perfil óptico (Figura 6-a,b). As descelularizações foram monitoradas pelo sistema de sensoriamento óptico desenvolvido e foram satisfatoriamente modeladas pelo modelo paramétrico não-linear descrito por Gadagkar e Call, 2000, que está exposto na Figura 6 (c), na qual observam-se as curvas típicas estimadas referentes a cada um dos grupos (Descelularização Completa e Descelularização Incompleta).

A evolução temporal das medidas de tensão é baseada na detecção de fótons por um fotodiodo de ampla janela de detecção posicionado linearmente com uma fonte de LED branco. O monitoramento isolado da fonte luminosa em comparação com um processo de descelularização genérico é mostrado na Figura 6 (d) e os registros de tensão *versus* tempo originários de cada grupo estão exemplificados na Figura 6 (e,f).

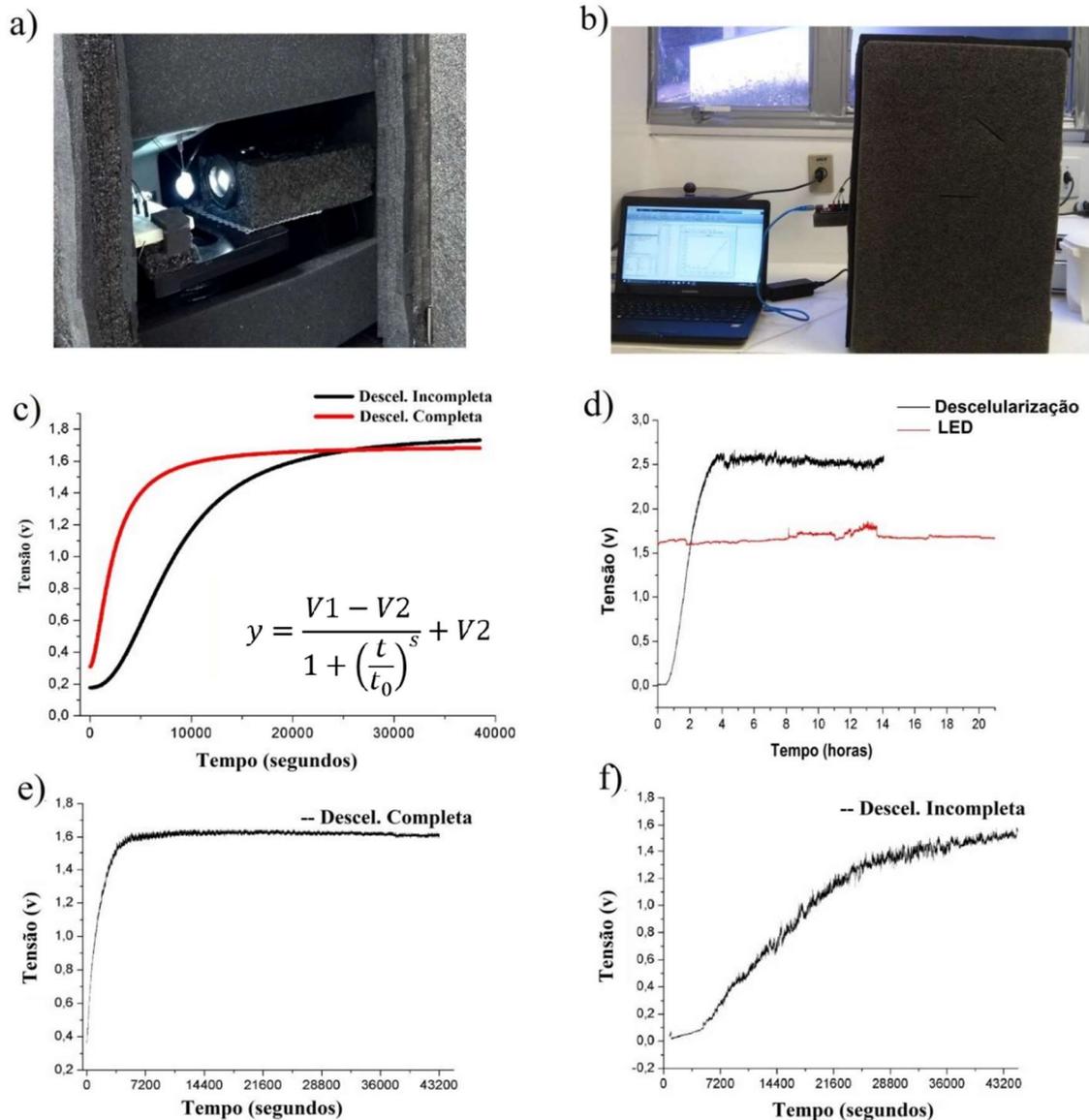


Figura 6. **a)** Imagem do sistema de monitoramento óptico durante um processo de descelularização. **b)** Imagem externa do protótipo conectado ao computador. **c)** Curvas típicas “Tensão vs Tempo” de cada grupo, Descelularização Completa ($n = 6$) e Descelularização Incompleta ($n = 8$), ajustadas pelo teste de máxima verossimilhança nlme versão 3.1 de Pinheiro e Bates. **d)** Tensão emitida pela fonte de LED durante 20 horas de monitoramento em comparação com uma descelularização. **e)** Perfil Óptico da amostra 5 do grupo

Descelularização Completa (conforme Figura 3-a). **d)** Perfil Óptico da amostra 1 do grupo de Descelularização Incompleta (conforme Figura 3-b). Modificado de Pereira *et al*, 2019.

III. Modelo Matemático do Perfil Óptico

Os perfis ópticos foram ajustados para o modelo matemático não linear de efeitos mistos, e os parâmetros foram obtidos usando o pacote R nlme (Modelos Lineares e Não-Lineares de Efeitos Mistos, versão 3.1 de Pinheiro e Bates (2000)). A estimativa de tensão inicial (**V1**), a assíntota máxima (**V2**), o ponto de inflexão (**t₀**) e a inclinação da curva (**s**) (+/- desvios padrão) estão dispostos na Tabela 2 para cada grupo. Observou-se que os parâmetros “**V1**”, “**V2**” e “**s**” apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$). No entanto, o ponto de inflexão (**t₀**), apesar da grande diferença entre as estimativas de cada grupo, não foi significativo devido às suas grandes variações internas ($p = 0,142$), Tabela 1.

Tabela 2. Valores típicos estimados para os parâmetros tensão inicial (V1), assíntota máxima (V2), inclinação da curva (s), ponto de inflexão (t₀), para os grupos Descelularização Completa e Descelularização Incompleta. Parâmetros da equação obtidos usando o pacote R nlme (Modelos Linear e Não-Linear de Efeitos Mistos, versão 3.1 de Pinheiro e Bates.

	DESCEL.INCOMPLETA	DP	DESCEL.COMPLETA	DP	P*
V1	0,178	0,00768	0,31	0,0126	<0.0001
V2	1,776	0,00475	1,6946	0,00263	<0.0001
s	2,271	0,03352	1,653	0,02878	<0.0001
t₀	7352,914	50,455	2067,836	32,51396	0,1424

As curvas ajustadas pelo modelo escolhido, assim como as curvas originais, estão expostas na Figura 7 (a, b) para os grupos Descelularização Completa e Descelularização Incompleta. O grupo Descelularização Incompleta (Figura 7-b) apresentou variação interna maior do que o grupo Descelularização Completa (Figura 7-a).

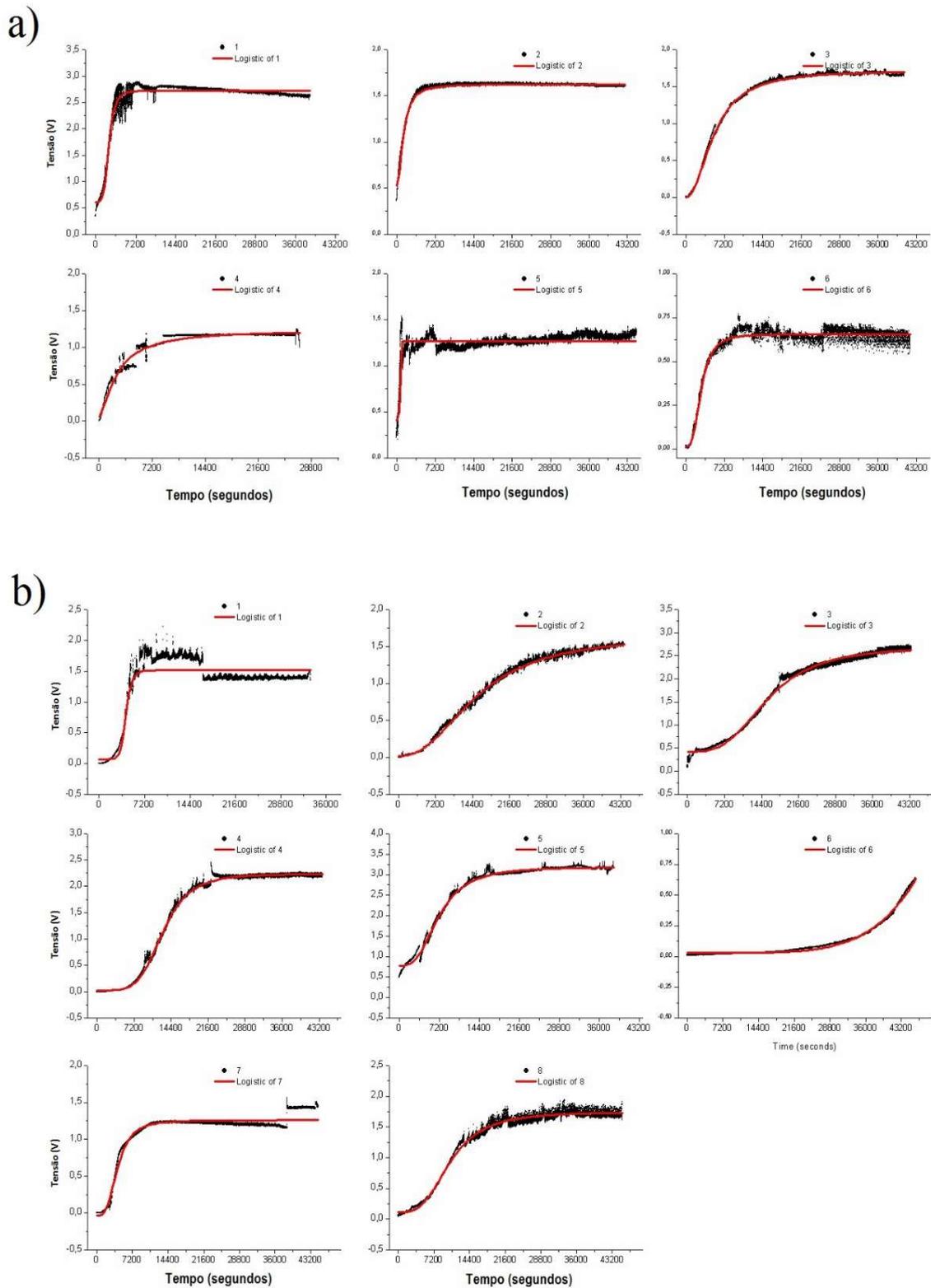


Figura 7. a) Curvas originais do Grupo Descelularização Completa “Tensão x Tempo”, em preto, com suas respectivas regressões não lineares em vermelho. **b)** Curvas originais do grupo Descelularização Incompleta “Tensão x Tempo” em preto com suas respectivas regressões em

vermelho. As curvas foram ajustadas para o modelo paramétrico não-linear descrito por Gadagkar e Call (2000). Modificado de Pereira *et al* (2019).

IV. Avaliação Histológica e Quantificação de Glicosaminoglicanos

As imagens realizadas após a coloração de Hematoxilina e Eosina dos grupos Nativo, Descelularização Completa e Descelularização Incompleta estão dispostas na Figura 8 (a-c). Nela, observa-se o tecido muscular cardíaco intacto para o grupo Nativo e apenas a matriz extracelular para os grupos Descel. Completa e Descel. Incompleta. Esses dois últimos não apresentaram diferenças qualitativas perceptíveis entre si, ou seja, evidenciaram uma estrutura da matriz igualmente preservada e ausente de material celular visível.

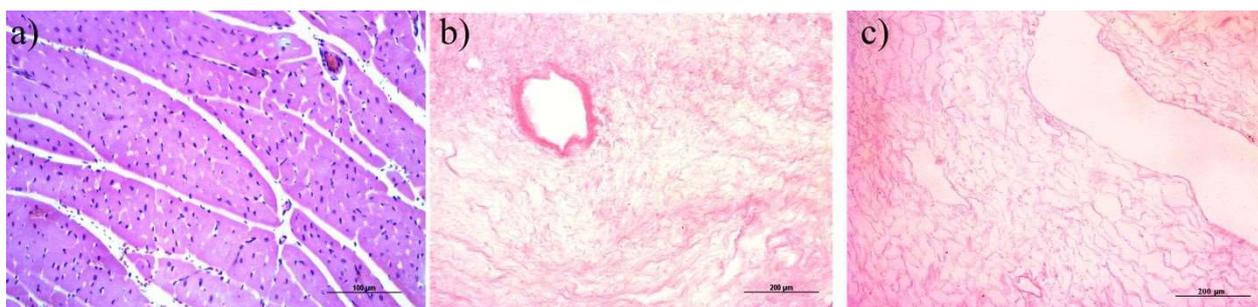


Figura 8. Imagens de microscopia óptica após a coloração com Hematoxilina & Eosina do tecido cardíaco dos grupos Nativo (a), Descelularização Completa (b) e Descelularização Incompleta (c). Barras de escalas: 100µm para o grupo Nativo e 200µm para os grupos submetidos à decelularização.

As avaliações Imunohistoquímicas e de quantificação de glicosaminoglicanos foram realizadas para os grupos Nativo e Descelularização Completa com o intuito de caracterizar a matriz extracelular completamente decelularizada e, devido ao ineditismo do sistema óptico, validar a decelularização sob a incidência ininterrupta de LED branco. Sendo assim, observou-se que os anticorpos anti-fibronectina e anti-laminina evidenciaram a presença desses componentes na matriz extracelular mesmo após o processo de decelularização (Figura 9,a-d). Além disso, ao avaliar a manutenção de proteoglicanos, através da quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados, identificou-se a manutenção desses polímeros, ou seja, não

houve redução estatisticamente significativa desses componentes após o processo de descelularização (Figura 9-e).

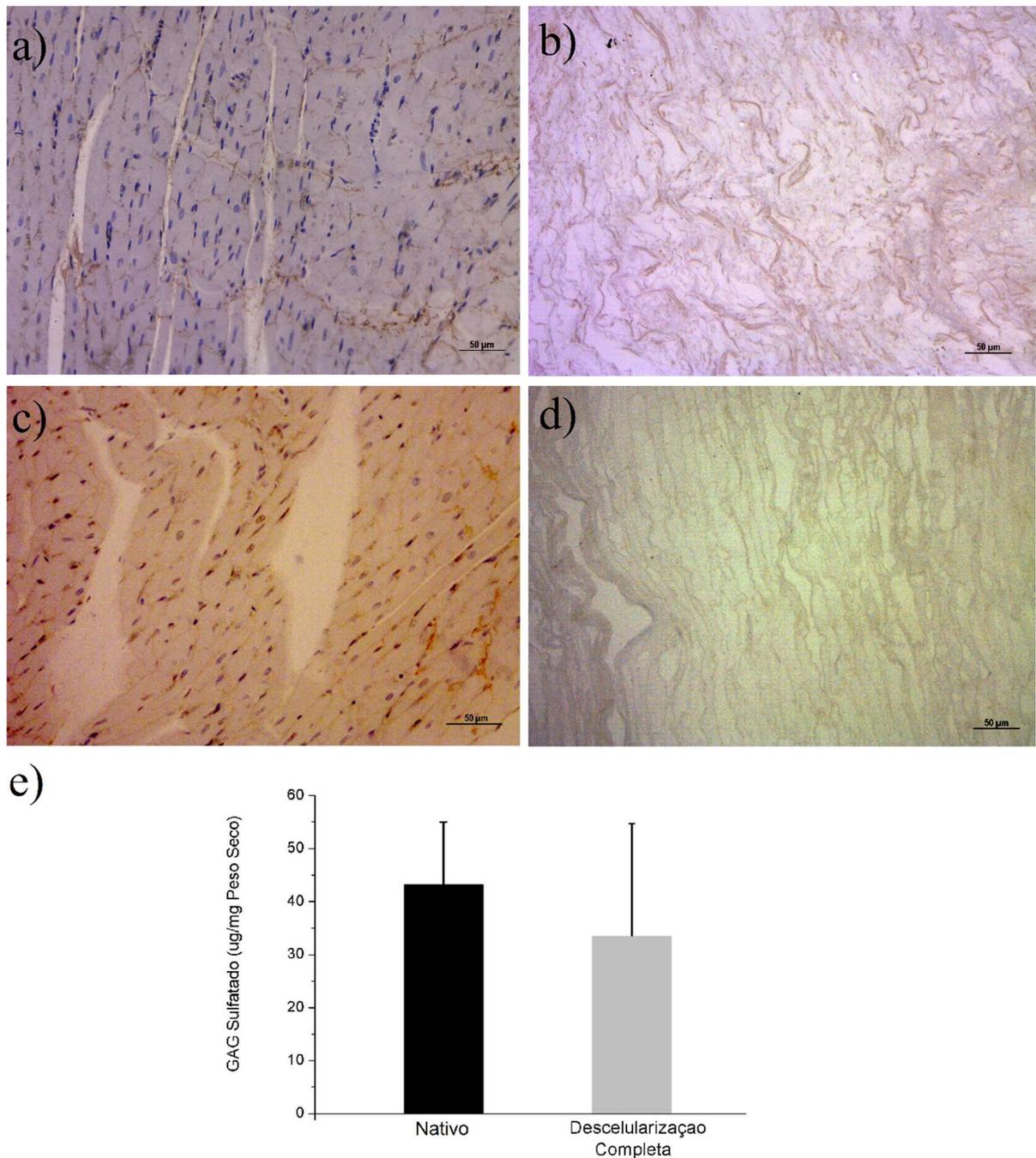


Figura 9 (a). Marcação imunohistoquímica com anticorpos anti-fibronectina de tecido cardíaco Nativo **(b)** e do grupo Descelularização Completa **(c)**. Marcação imunohistoquímica com anticorpos anti-laminina de tecido cardíaco Nativo **(d)** e do grupo Descelularização Completa. (Marcações em marrom para os dois testes, Barra de escala: 50 µm). **(e)** Gráfico de barras da concentração de Glicosaminoglicanos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de tecido cardíaco liofilizado) para os grupos Nativo e Descelularização Completa, $p>0,05$ (Teste T bicaudal para variâncias iguais).

V. Espectroscopia no Infravermelho e Espalhamento Raman

Os espectros de infravermelho foram realizados para os três grupos: Descelularização Completa, Descelularização Incompleta e Nativo, e estão expostos na Figura 10. As frequências vibracionais das principais bandas das amostras Descelularização Completa I e II, Descelularização Incompleta I e II e dos espectros do grupo Nativo I e II estão dispostas na Tabela 3. A partir da análise, identificou-se que o grupo Nativo obteve maior semelhança entre as diferentes amostras, mantendo constantes praticamente todos os modos vibracionais identificados. Já os grupos Descel. Completa e Descel. Incompleta apresentaram maior variação interna, especialmente nas regiões associadas aos principais componentes glicoproteicos e proteicos da matriz extracelular ($1000-1300\text{ cm}^{-1}$ e $1500-1700\text{ cm}^{-1}$). Observaram-se também alterações nos formatos e na intensidade dessas bandas.

Tabela 3. Frequências vibracionais das principais bandas evidenciadas pela espectroscopia de infravermelho para os três grupos estudados (Descel. Completa, Descel. Incompleta e Nativo).

Descel. Completa I (cm-1)	Descel. Completa II (cm-1)	Descel. Incompleta I (cm-1)	Descel. Incompleta II (cm-1)	Nativo I (cm-1)	Nativo II (cm-1)
	2922	2920	2920	2922	2922
2871	2853	2851	2851	2853	2853
2363	2359	2363	2363	2363	2363
2322	2322	2337	2322	2342	2331
2111	2089	2098	2098	2109	2105
1742	1742	1742	1742	1749	1742
1636	1625	1636	1636	1636	1636
1541	1541	1541	1541	1541	1541
1507		1507	-		
1457	1457	1457	1457	1457	1457
1395	1395	1395	1395	1388	1395
1364	1339		1339	1304	1308
1285	1235	1241	1230	1235	1237
1243	1202				
1185	1159			1168	1168
1093	1071	1079	1062	1079	1080
	1032				
950	974	982	980		984
829	827		812		
			719		

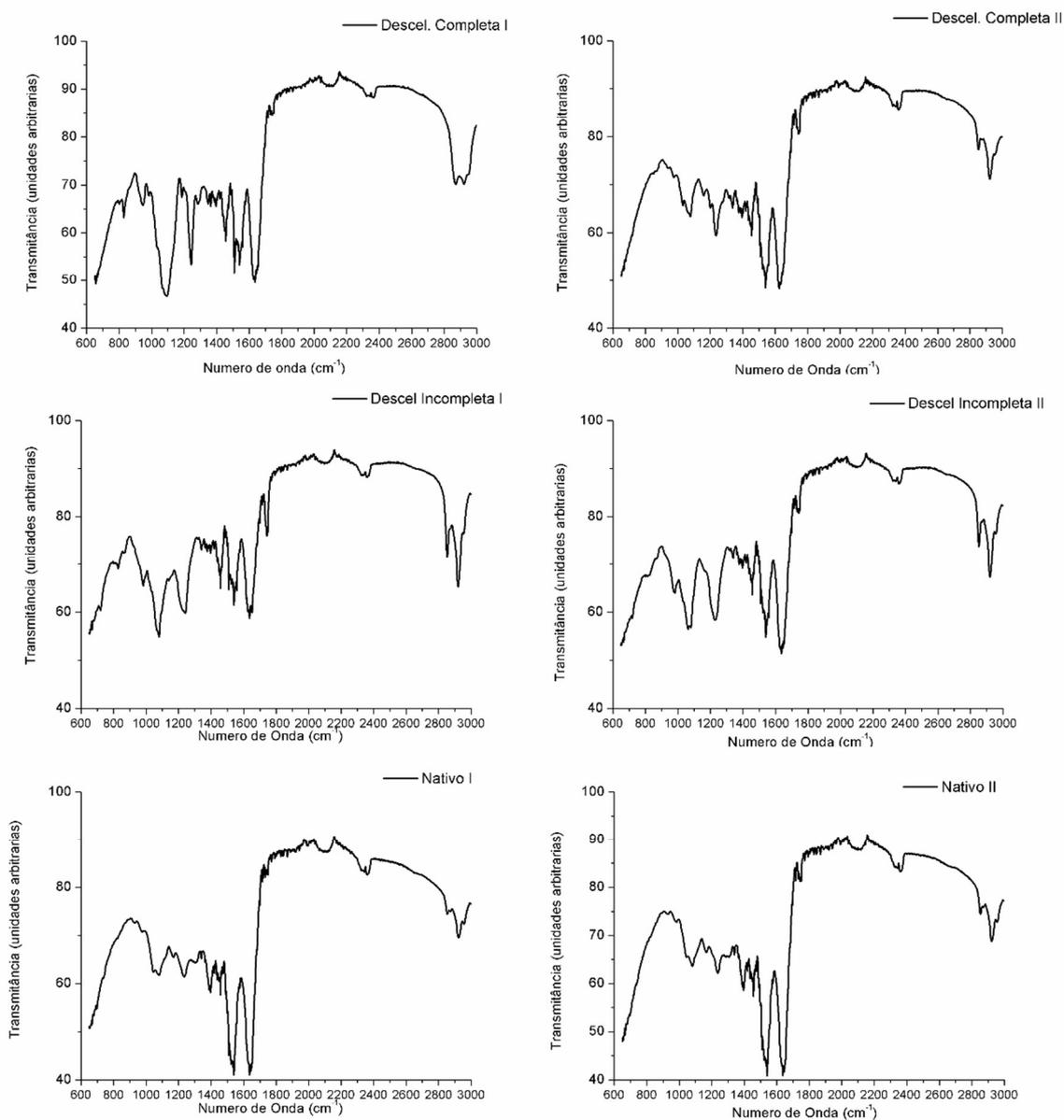


Figura 10. Espectros de infravermelho (FTIR) dos Grupos Descelularização Completa (**a-I,II**), Descelularização Incompleta (**b-I,II**) e Nativo (**c-I,II**).

O espalhamento Raman, por sua vez, evidenciou a presença de bandas conjugadas no entorno de $1100/1200\text{ cm}^{-1}$ para ambos os grupos descelularizados, porém, com maior resolução para o grupo Descelularização Incompleta. Observou-se, também, maior resolução das bandas nos espectros referentes aos grupos submetidos à descelularização quando comparados aos órgãos do grupo Nativo. Nele, a intensa fluorescência omitiu as bandas independentes, manteve o formato global e aumentou a intensidade das bandas. As principais variações de intensidade, formato e posição entre os grupos descelularizados foram percebidas

entre 1500 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} e entre 1000 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} (Figura 11). As bandas principais observadas no grupo Descelularização Completa, Descelularização Incompleta e grupo Nativo estão expostas na Tabela 4. Observou-se que os grupos Nativo e o grupo Descelularização Completa mantiveram a maior parte dos modos vibracionais praticamente constante quando avaliados internamente entre as duas diferentes amostras, sugerindo maior homogeneidade intragrupo. Por outro lado, o grupo Descelularização Incompleta revelou o oposto, ou seja, a menor parte das bandas manteve a frequência vibracional praticamente inalterada, evidenciando heterogeneidade.

Tabela 4. Frequências vibracionais das principais bandas evidenciadas pela espectroscopia de espalhamento Raman para cada uma das duas amostras dos três grupos estudados (Descel. Completa I e II, Descel. Incompleta I e II e Nativo I e II).

Descel. Completa I (cm-1)	Descel. Completa II (cm-1)	Descel. Incompleta I (cm-1)	Descel. Incompleta II (cm-1)	Nativo I (cm-1)
1650	1648	1651	1673	
			1506	
1441	1443	1440	1440	1440
1379			1358	1373
		1295	1247	
1266	1263	1263		1208
1101	1108	1081	1065	1105
971	971	968	946	935
			871	805
			541	
484	476	476	480	476
		418	414	414

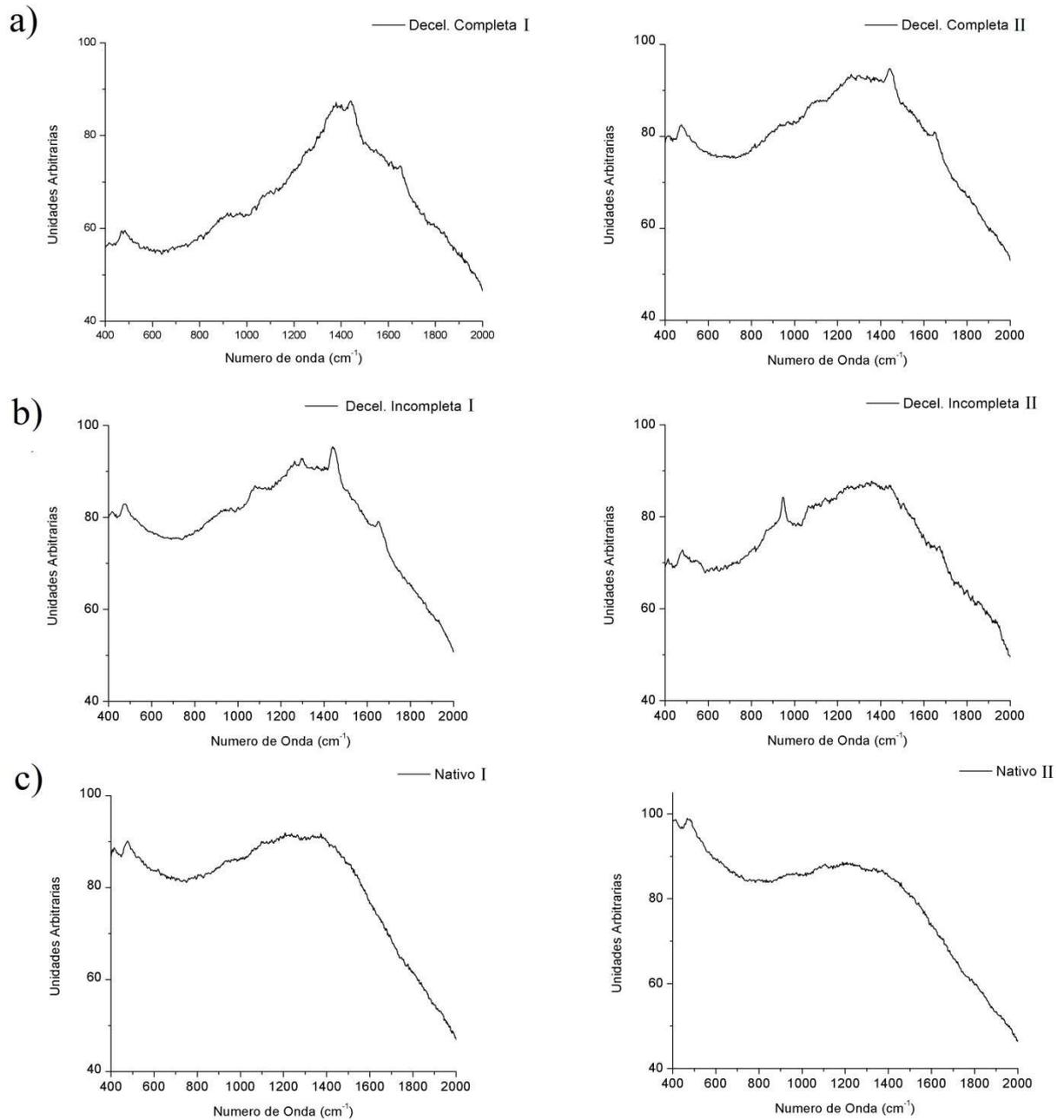


Figura 11. Espectros de espalhamento Raman dos Grupos Descolorização Completa (**a-I,II**), Descolorização Incompleta (**b-I,II**) e Nativo (**c-I,II**).

VI. Espectro Eletromagnético do Perfil Óptico

Para a análise espectral, duas fibras ópticas monomodo de sílica conectadas a um espectrofotômetro foram posicionadas a 180° e 90° em relação à fonte de luz. Isso foi feito com a finalidade de registrar os efeitos de transmitância e reflectância da luz branca ao incidir

sobre o órgão durante a descelularização completa. O esquema da configuração experimental está representado na Figura 12 (a). A intensidade de reflectância relativa em 450 nm aumentou durante o processo de descelularização, e a intensidade de reflectância absoluta apresentou valor máximo entre 1 e 2 horas de perfusão de SDS (Figura 12-b, c). Já em 600 nm, a banda deslocada observada no início do processo (vermelho-alaranjado) não é observada após uma hora de perfusão de SDS. Já os espectros relativos à transmitância demonstraram um aumento global de intensidade no tempo (Figura 12-d). Quando comparados, tanto os espectros de transmitância quanto os de reflectância evidenciaram a banda deslocada em 600 nm, observada apenas na primeira hora de monitorização (Figura 12-e).

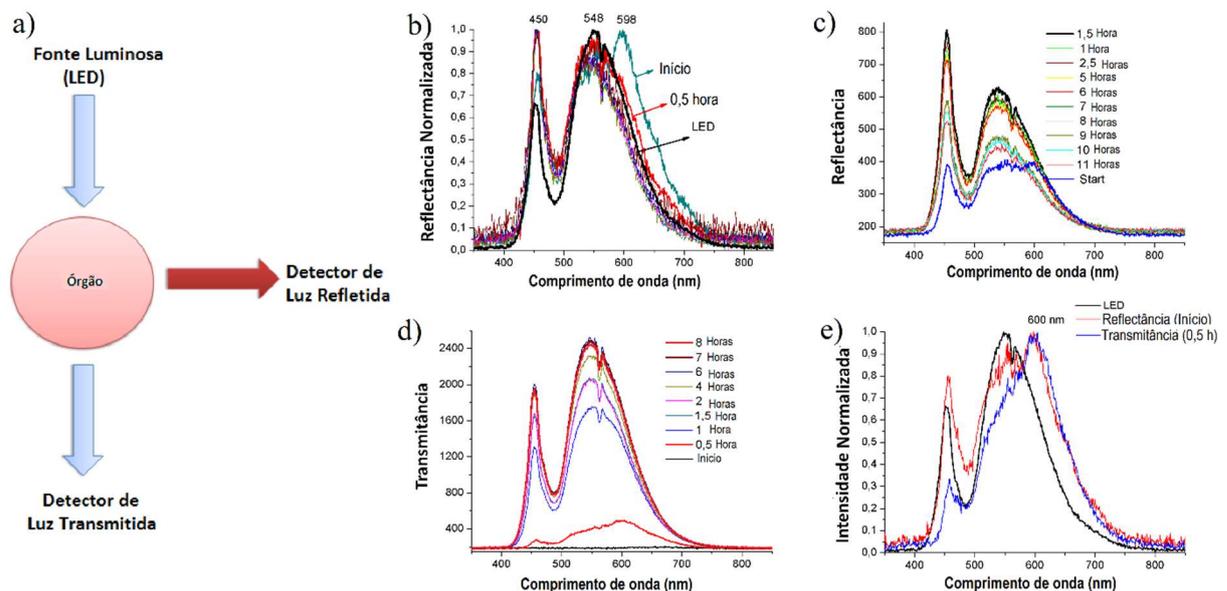


Figura 12. Análise espectral do perfil óptico do processo de descelularização. **a)** Configuração esquemática das posições das fibras ópticas em relação ao órgão e à fonte luminosa. **b)** Intensidades normalizadas (0-1) do espectro de reflectância *versus* comprimento de onda obtido durante a perfusão com SDS. **c)** Intensidades absolutas dos espectros de reflectância demonstrando valor máximo entre 1 e 2 horas. **c)** Intensidades absolutas dos espectros de transmitância demonstrando aumento global da intensidade no tempo, mas em taxas decrescentes. **d)** Espectros de reflectância normalizados (0-1), no primeiro momento de perfusão com SDS, e de transmitância aos 30 minutos de perfusão de SDS, em comparação com o perfil da fonte de luz, evidenciando o deslocamento da banda em 600 nm. Modificado de Pereira *et al*, 2019

VII. Perfil Óptico e Imagens com Fontes Luminosas de Diferentes Comprimentos de Onda.

Para construção dos perfis ópticos, os valores de tensão foram coletados a cada 30 minutos para todos os 7 LEDs empregados. O teste mostrou que o fotodiodo utilizado é adequado para os comprimentos de onda contemplados, exceto para as regiões do verde e do ultravioleta, regiões nas quais a sua sensibilidade mostrou-se menor do que a necessária (Figura 13). As regiões do vermelho e amarelo apresentaram perfis semelhantes aos perfis ópticos produzidos pela incidência da cor branca. Já a região do infravermelho, iniciou-se com um aumento acentuado de intensidade de transmitância, mas a partir de duas horas estabilizou-se abruptamente (Figura 13).

As imagens realizadas foram comparadas entre as duas câmeras utilizadas e ambas evidenciaram a presença de fluorescência vermelha, sob incidência de luz branca, que ocorreu apenas na primeira hora do processo (Figura 14-a, b). Esse achado reforça a hipótese de fluorescência em 600 nm observada durante a análise espectral realizada com espectrofotômetro de fibra óptica. Ainda sob a incidência de luz branca, observou-se uma coloração azulada no órgão após 6 horas de início do processo. Em relação à radiação infravermelha, a câmera para visualização global (sem aumento) não detectou a radiação infravermelha, e, portanto, a imagem permaneceu escura durante todo o processo. Já na câmera destinada à ampliação da imagem, a radiação foi detectada e observou-se oscilação da coloração do órgão durante o processo, o qual variou entre tonalidades roxas (Figura 15, a-d). A radiação ultravioleta, por sua vez, foi detectada pela câmera de visualização global desde o início do processo e realçou os remanescentes celulares quando comparada às imagens obtidas pela luz branca. Isso pode ser observado após 2 horas do início da perfusão e está exposto na Figura 16-c. Já a câmera destinada à ampliação da imagem não detectou radiação ultravioleta no início do processo, no entanto, após a primeira hora é possível visualizar uma luz de cor azul proveniente do órgão, a qual aumenta de intensidade conforme a descelularização progride (Figura 16, b,d,f). As radiações vermelha, âmbar e amarela demonstraram um perfil semelhante em relação à coloração do órgão, refletindo a coloração incidida com leve alteração da tonalidade no decorrer do processo (Anexos Figura A2-A4). O mesmo comportamento foi observado pela radiação verde, i.e., o órgão refletiu a cor incidida com leves alterações de tonalidade no decorrer da descelularização (Anexo Figura A1).

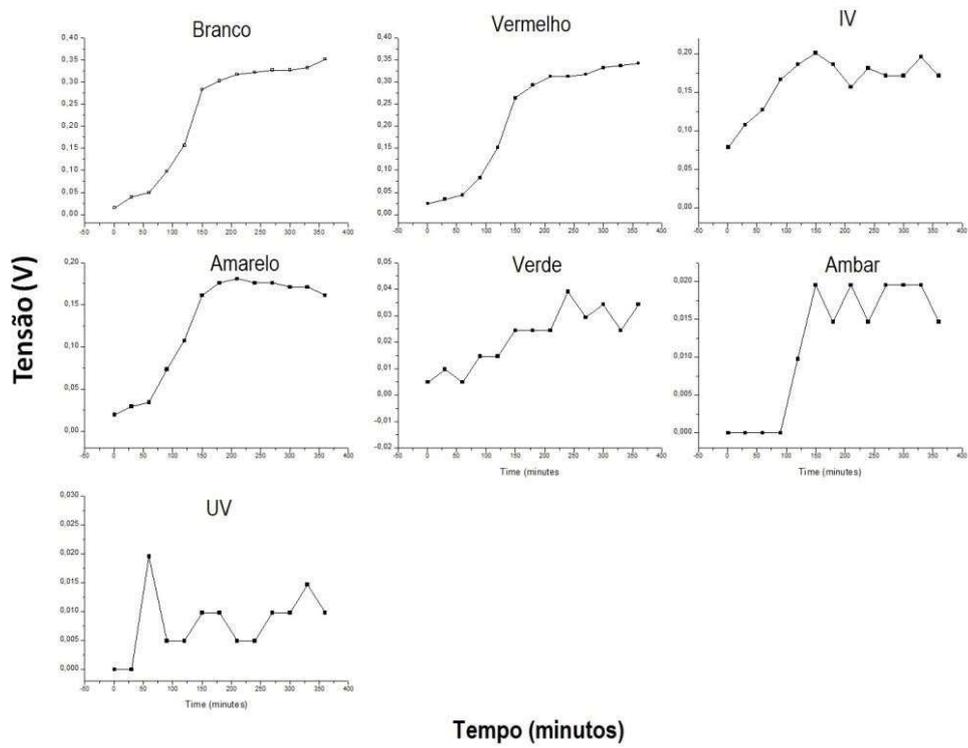


Figura 13. Leituras de Tensão vs Tempo da descelularização a cada 30 minutos, utilizando LEDs de diferentes cores e fotodiodo de amplo espectro para detecção.

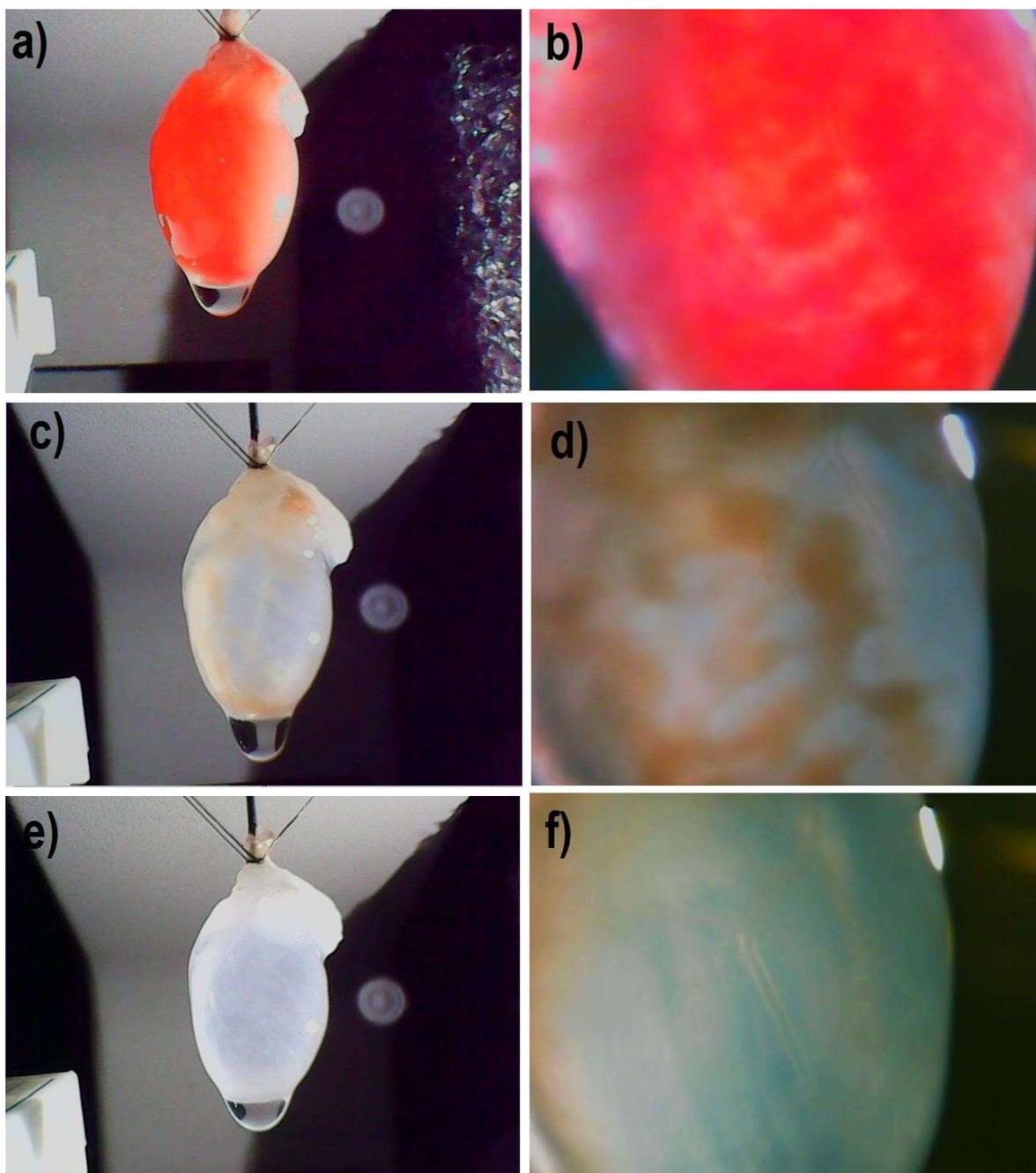


Figura 14. Imagens do órgão realizadas com duas câmeras de vídeo durante a descélularização e sob a incidência de LED branco. Para padronização da posição, utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b**, **d** e **f**. As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo; **c** e **d** a, aproximadamente, 2 horas de descélularização; e as imagens **e** e **f** a, aproximadamente, 6 horas do início do processo.

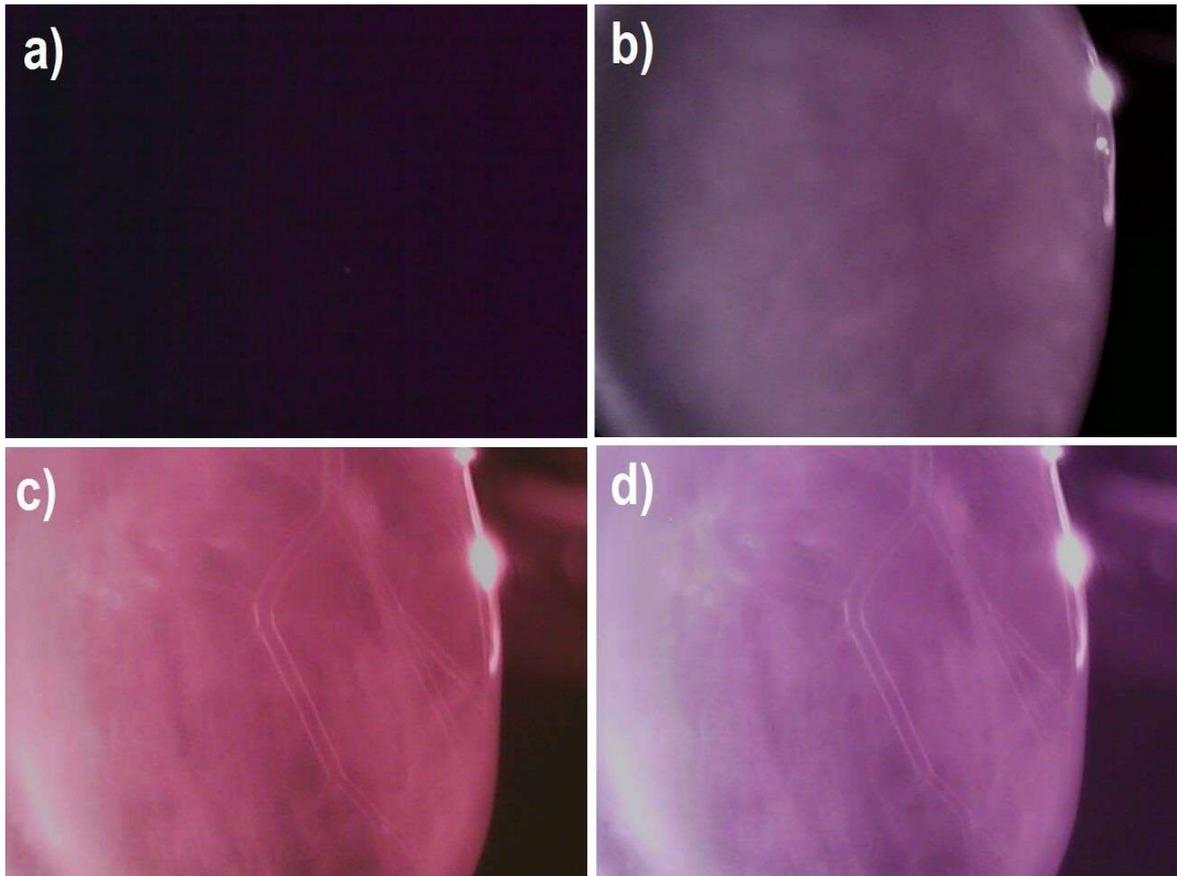


Figura 15. Imagens de duas câmeras de vídeo para monitoramento da descellularização utilizando LED Infravermelho (940 nm) como fonte luminosa. Para padronização da posição utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b**, **c** e **d**). As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo. **c** - aproximadamente 4 horas de descellularização. **d** - após 6 horas do início do processo.

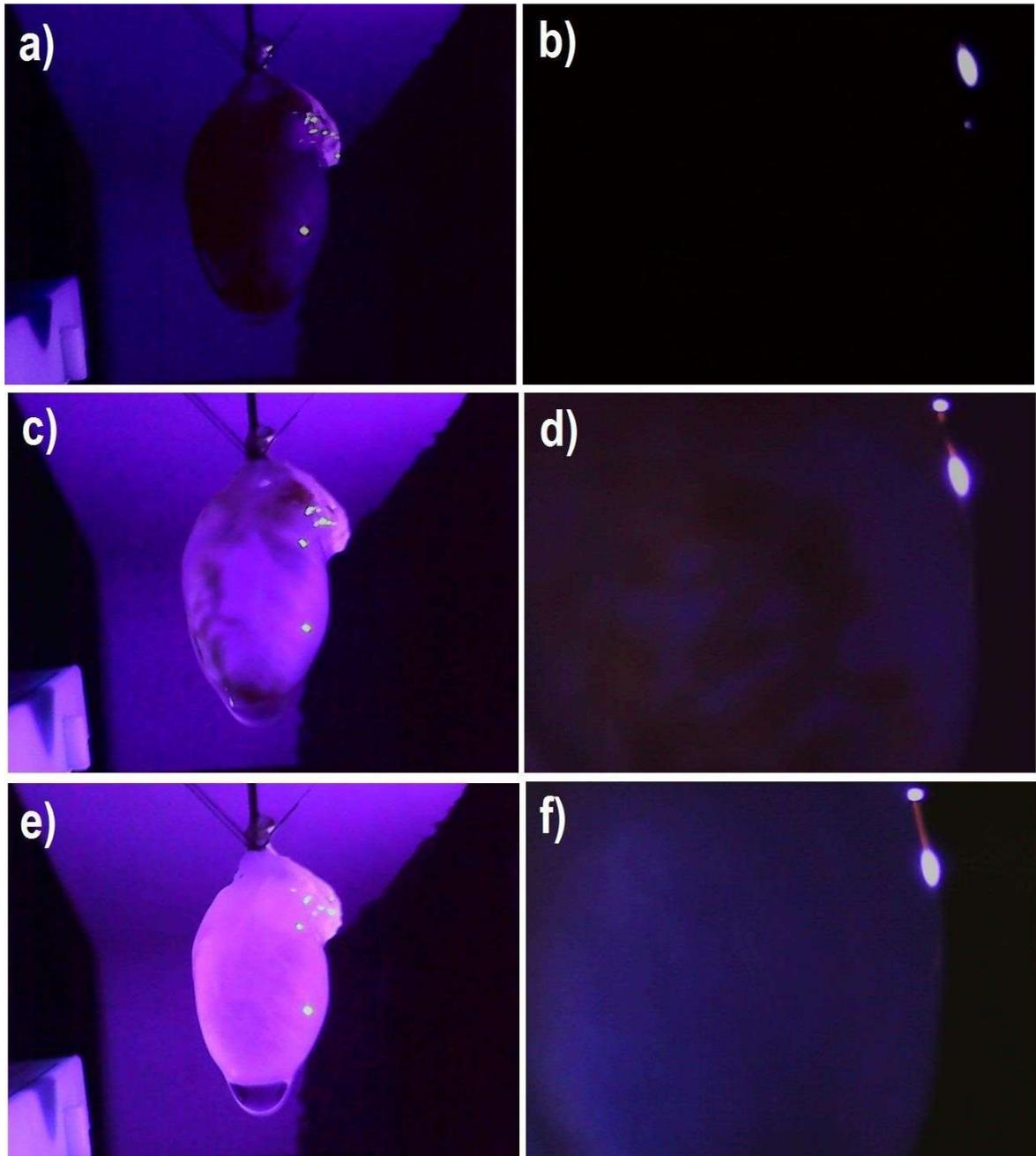


Figura 16. Imagens a partir de duas câmeras de vídeo para monitoramento da descélularização utilizando LED ultravioleta (385 nm). Para padronização da posição, utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b**, **d**, **f**. As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo. **c** e **d** - aproximadamente 2 horas de descélularização. **e** e **f** - aproximadamente 6 horas do início do processo.

5. Discussão

Na análise da quantificação de DNA, os grupos Nativo e Descelularização Completa apresentaram valores absolutos semelhantes aos observados na literatura para as descelularizações com o emprego do surfactante SDS isolado ou mesmo acompanhado de enzimas proteolíticas (GUYETTE *et al*, 2014; LU *et al*, 2013). Uma vez que a porcentagem média de DNA remanescente foi de 2,4% ($\pm 1,63$ SD), quando comparado aos corações murinos cadavéricos, observa-se que a categorização do grupo Descelularização Completa obedeceu, simultaneamente, aos dois principais padrões atuais que estabelecem o conteúdo máximo de DNA remanescente, ou seja, aproximadamente 50 ng.mg⁻¹ de tecido seco (CRAPO *et al*, 2011), ou conteúdo de DNA residual de aproximadamente 4% quando comparado aos órgãos controle (GUYETTE *et al*, 2014).

O perfil óptico produzido pela luz branca no decorrer da descelularização dos corações murinos foi satisfatoriamente descrito pelo modelo de regressão não linear primeiramente proposto por HILL (1910), com modificações posteriores de Gadagkar e Call (2015). Esse modelo sigmoidal é justificado, nos primeiros instantes do processo, pela alta atenuação da luz em praticamente todos os comprimentos de onda em virtude da interação entre o tecido e a luz. Em seguida, com o decorrer da descelularização, essa atenuação diminui à medida que os principais cromóforos endógenos, como a mioglobina, hemoglobina (faixa de absorção de 400 a 600 nm) e gordura (EFIMOV *et al*, 2004; LANE *et al*, 2006), são extraídos do tecido, e até que, finalmente, atinge um platô. Isso é evidenciado nos espectros de transmitância da avaliação espectral da descelularização, Figura 12-d. Neles, evidencia-se uma baixa intensidade de luz transmitida nos espectros iniciais, em todo o espectro, devido à ocorrência tanto de espalhamento quanto de absorção, fenômenos ópticos característicos da interação com tecidos biológicos (EFIMOV *et al*, 2004).

Observou-se também que, a despeito da opacidade do órgão no início do processo, houve detecção de fótons no espectro de transmitância aos 30 minutos de descelularização. Isso pode estar relacionado a uma parcela pequena de transmitância, mas, principalmente, à emissão por estruturas e moléculas autofluorescentes, como as ligações cruzadas de colágeno (400-500 nm) (QUINN *et al*, 2016), NADH (~ 450 nm), FAD (515 nm) (LANE *et al*, 2006) e, predominantemente, por moléculas de emissão em 600 nm, como as porfirinas (faixa de emissão entre 580-640 nm) (DE VELD *et al*, 2004; DE VELD *et al*, 2005).

A emissão foi observada também pelos espectros de reflectância obtidos durante a descelularização, os quais evidenciaram uma banda deslocada em 600 nm durante a primeira hora de perfusão (Figura 12-a). Essa observação indica que a taxa de remoção das porfirinas é um dos principais fatores responsáveis pelo comportamento inicial do perfil óptico, e ocorre durante o preciso intervalo no qual a extensão da remoção celular pode ser prevista. Dessa forma, a taxa de decaimento da fluorescência em 600 nm é, portanto, uma variável importante de ser modelada e agregada a um futuro modelo probabilístico de avaliação da eficiência da descelularização.

Em se tratando dos sinais detectados dos demais comprimentos de onda, observou-se que esses estão, provavelmente, influenciados por interferências de espalhamento, reflexões, fluorescência e absorção. Esse fato evidencia a necessidade de aprimoramento do sensor por meio de fotodetectores específicos e de fontes luminosas de espectro restrito, ou do uso de filtros para separação dos comprimentos de onda constituintes da luz branca, para obtenção de uma análise mais profunda. O emprego da monocromaticidade, nesse caso, poderá permitir maior seletividade de excitação dos fluoróforos, absorvedores e dispersores, acarretando em uma maior variedade de dados úteis para avaliação e estudo em tempo real do processo de descelularização.

Sobre a avaliação dos parâmetros do ajuste polinomial, representados na Figura 6-c, o grupo Descelularização Completa apresentou intervalo inicial e final de tensão com menor amplitude que o grupo Descelularização Incompleta, o que é parcialmente determinado pelo coeficiente s . O parâmetro s , simplificado como o declive correspondente à parte mais íngreme da curva, e denominado coeficiente de Hill (HILL, 1910), apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Conforme exemplificado na Figura A5, o aumento do valor do parâmetro s implica na formação de curvas mais ajustadas ao formato “S” do modelo sigmoidal. De maneira oposta, à medida que o valor do parâmetro s diminui, a curvatura inicial é omitida e a assíntota máxima é reduzida, considerando-se um determinado intervalo de tempo.

As estimativas para o intervalo de tempo típico entre as assíntotas de voltagem mínima e máxima (inflexão da curva, t_0) indicam uma tendência esperada entre os grupos, sendo de 2 horas para o grupo Descelularização Incompleta e de apenas 35 minutos para o grupo Descelularização Completa, ou seja, espera-se um intervalo menor de tempo para as curvas, nas quais a descelularização foi completa, atingirem o ponto de inflexão. No entanto, apesar de esperado, a análise estatística observou uma probabilidade de 14% de se tratar de um efeito aleatório, tornando a diferença entre os grupos estatisticamente não significativa. Posto isso, é

importante relatar que os valores de t_0 sugerem demandar mais tempo para atingir o ponto de inflexão pelos processos ineficientes, porém requer tratamento prévio de sinal, redução de ruído e/ou suavização posterior para minimizar a alta variância encontrada dentro dos grupos, a qual parece ter uma parcela de influência do ruído do sinal, uma vez que algumas suavizações, testadas descritivamente com o emprego do software Origin pro 8, indicaram mudança favorável do referido parâmetro.

Conforme citado anteriormente, é importante ressaltar que o grupo Descelularização Incompleta apresentou maior heterogeneidade, conforme observado pelos erros padrão dos estimadores e pela observação visual das curvas individuais (Figura 7). Na curva 6 (Figura 7-b), por exemplo, há uma taxa de crescimento muito pequena que pode ser interpretada como um processo no qual a remoção das células ocorreu muito lentamente, diferindo das demais. Entretanto, uma característica comum é perceptível entre as amostras do grupo Descelularização Incompleta: trata-se da curvatura de, no mínimo 1 hora, de menor taxa de crescimento no início do processo. Essa curvatura antecede a ascensão abrupta e não é observada no grupo Descelularização Completa. Por outro lado, o grupo Descelularização Completa demonstrou homogeneidade, a despeito dos ruídos do sistema (Figura 7-a). Esse ruído pode ser a soma do ruído elétrico da flutuação da tensão do terminal do LED, flutuação da corrente de fluxo, ruído óptico da flutuação de saída de luz do LED (SAULYS *et al*, 2011) e influência da variação de volume do caminho óptico da luz causada pela pressão oscilante da perfusão peristáltica, os quais necessitam ser investigados e testados.

Dessa forma, é possível prever a ineficiência do processo nas primeiras horas de perfusão do SDS para as descelularizações realizadas. Isso permite, ao pesquisador, interromper o processo e investigar os erros, evitando desperdício de tempo e de reagentes. Esse padrão inicial sugere que a configuração inadequada inicial da perfusão ou as características vasculares intrínsecas dos corações devem ser investigadas como possíveis causas de falha, e não eventos posteriores do decorrer do processo. Perfusões inadequadas podem ser desencadeadas por várias hipóteses, como as características vasculares individuais intrínsecas relacionadas ao padrão de acúmulo de debris celulares no lúmen (CRAWFORD *et al*, 2012), ou devido a erros de procedimento, como posicionamento muito profundo da cânula na aorta, perfurações de órgãos não observadas e possivelmente ocorridas no momento da remoção dos tecidos adjacentes, presença de impurezas dentro das mangueiras de infusão, conexões, agulha ou cânula atuando como pontos de nucleação para formação de aglomerados e, por último, a presença de microcoágulos sanguíneos não perceptíveis na análise visual, os quais foram

identificados a partir da nossa experiência e do que foi relatado no protocolo (GUYETTE *et al*, 2014).

O estudo também evidenciou que cada coração possui um perfil óptico de descélularização individual, que é único e específico para ele. Além disso, observou-se que a transparência não representa o sucesso da descélularização tampouco o tempo padrão de procedimento, os quais não são suficientes para o controle de qualidade da descélularização. O mesmo pode ser afirmado para a aparente estabilização das curvas após alcançada a assíntota máxima, pois essa estabilização não está relacionada ao final do processo, mas sim a uma fase de lenta remoção de resíduos celulares em pequenas concentrações. Portanto, a análise do perfil das curvas necessita ser apoiada pela avaliação estatística dos estimadores do modelo juntamente com a avaliação macroscópica. Método este, que, se obedecido, poderá ser determinante para assegurar uma remoção celular bem-sucedida, principalmente na impossibilidade de se empregar as técnicas destrutivas de quantificação de DNA e histológicas, como é o caso da descélularização de órgãos inteiros destinados à recélularização.

Recentemente, o controle de qualidade de matrizes extracelulares descélularizadas tem recebido grande atenção devido à falta de métodos padronizados e de alternativas à caracterização não destrutiva. Como é o caso do trabalho realizado por Quinn e colaboradores (QUINN *et al*, 2016), o qual demonstrou que a geração de segundo harmônico (SHG) e a microscopia de excitação por dois e três fótons podem prever o comportamento da elastina e do colágeno, e das propriedades mecânicas, após o infarto do miocárdio em matrizes extracelulares descélularizadas sem danificar a amostra. Tais descobertas abrem novas possibilidades para o emprego de dados ópticos diversificados no controle de qualidade de matrizes descélularizadas. A espectroscopia de dispersão Raman - RS (TIMCHENKO *et al*, 2017) é também uma alternativa não invasiva aplicada à bioengenharia de tecidos. Ela identifica mudanças na proporção e na composição da matriz extracelular de tecidos cardíacos descélularizados através das variações na intensidade do sinal captado. Entretanto, apesar de o princípio utilizado evidenciar um grande potencial para aplicação em órgãos inteiros, o atual estágio de desenvolvimento dessa técnica aplica-se, em especial, à avaliação de tecidos. Outros exemplos são a tomografia computadorizada de contraste de raios X - PC-CT (HAGEN *et al*, 2015) e a microtomografia computadorizada - μ -CT (HALLER *et al*, 2013). Em relação a essas duas técnicas, quando as amostras são fragmentos de tecidos biológicos, ambas podem estar direcionadas ao estudo de geometrias de alta complexidade da estrutura tecidual e com alta qualidade de visualização. Já o estudo de órgãos inteiros, só pode ser acessado através da

tomografia computadorizada por meio da análise de radiodensidade. Esse é o caso do trabalho realizado por GEERTS e colaboradores (2016), no qual a escala de unidade *Hounsfield* (HU) foi aplicada ao controle de qualidade de fígados murinos descelularizados por meio da Tomografia Computadorizada (CT) sem contraste. A técnica mostrou boa correlação com o grau de remoção celular e grande potencial para aplicação a órgãos porcos ou humanos. No entanto, a sensibilidade do método foi de $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de DNA (peso úmido) quando o menor valor de HU foi alcançado, ou seja, a sensibilidade ainda é inferior à recomendada pelos padrões aceitos na literatura e, por isso, é importante utilizá-lo como método adicional de apoio ao controle de qualidade, e não isoladamente. Além disso, uma vez que a CT não está incorporada ao sistema de descelularização, não é possível realizar as medidas em tempo real.

Hulsman *et al.* (2015), por sua vez, realizaram a análise *online* do perfusato proveniente da descelularização e associaram as variáveis biomassa, DNA e proporção de proteínas entre si a fim de prevenir a exposição excessiva do órgão aos reagentes utilizados, e de alcançar alto grau de remoção celular. Em relação aos valores de biomassa, o referido estudo encontrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos utilizados, Nativo e Descelularizado, com uma massa remanescente de MEC de 16% em relação ao órgão do grupo Nativo. Similarmente, nosso estudo encontrou uma média de 13% (± 3 DP; $p < 0,001$) de massa de MEC remanescente no grupo Descelularização Completa em relação aos órgãos controle. No entanto, o nosso grupo também analisou a massa residual do grupo Descelularização Incompleta e, ao compará-lo com o grupo Descelularização Completa, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre suas médias (Figura A6). Em relação à análise de DNA, o trabalho de Hulsman *et al.* encontrou, a partir das amostras de perfusato, uma quantidade total de DNA de aproximadamente 47% em relação à quantidade total estimada do órgão. Dessa forma, os achados de Hulsman evidenciam que a análise da biomassa e do perfusato são úteis para complementar o controle de qualidade dos órgãos descelularizados. No entanto, para a remoção de DNA, infere-se que o desenvolvimento de um modelo matemático aplicado à taxa de remoção de DNA no perfusato proverá um resultado mais preciso para a análise da remoção celular do que a quantificação da massa total de DNA das amostras de perfusato. Dado o exposto, observa-se que, no momento, a precisa identificação da qualidade da descelularização requer uma análise multivariada que incorpore a avaliação do perfusato aos dados ópticos do órgão apresentados no presente estudo. Tal abordagem pode ser facilmente acoplada ao sistema de sensoriamento óptico aqui apresentado e representa uma possibilidade de ampliação da capacidade analítica do sensor.

Além disso, nosso sistema ofereceu a sensibilidade adequada por meio de um modelo matemático capaz de discriminar entre amostras com variação da concentração de DNA de 50 ng.mg⁻¹ de massa seca; ofereceu também predição da extensão da remoção celular a partir de uma análise simultânea não destrutiva e propiciou a manutenção dos constituintes importantes para a homeostase da MEC de maneira semelhante aos trabalhos encontrados na literatura (OTT *et al*, 2008; LU *et al*, 2013; AUBIN, 2013; AHN *et al*, 2017). Ou seja, não houve alterações significativas no tecido biológico relativas à quantidade de hidroxiprolina, representante de colágeno, e de glicosaminoglicanos sulfatados, representante dos proteoglicanos. Da mesma forma, foi identificada a presença de fibronectina e laminina nas imagens feitas por imunohistoquímica.

Em relação à caracterização por espectroscopias, os espectros de Infravermelho reproduziram os principais picos relativos aos componentes da matriz extracelular, como colágeno e proteoglicanos, os quais são especialmente identificados pelas bandas entre 1500 e 1700 cm⁻¹ e entre 1000 e 1300 cm⁻¹, confirmando a presença predominante desse conteúdo proteico. No entanto, as análises descritivas também evidenciaram deslocamentos e variações de intensidade nessas regiões. Primeiramente, tem-se as duas bandas dominantes observadas no espectro infravermelho de todos os grupos analisados, uma entre 1500 e 1600 cm⁻¹ e a outra entre 1600 e 1700 cm⁻¹, as quais apresentaram variações de formato, intensidade ou posição. Em relação à banda predominante entre 1500 e 1600 cm⁻¹, variações de intensidade e de formato foram evidenciadas, mas o pico mínimo predominante manteve-se estável, 1541 cm⁻¹ para todos os espectros. O intervalo 1600-1700 cm⁻¹ apresentou notáveis alterações de formato e intensidade, e manteve constante a banda predominante de 1636 cm⁻¹ em todos os espectros, exceto para a amostra Descel, Completa II, a qual evidenciou um deslocamento para 1625 cm⁻¹. É importante salientar que as bandas predominantes estão acompanhadas de bandas adjacentes que não foram deconvoluídas. Essas observações sugerem uma perturbação na proporção estrutural das proteínas da matriz extracelular, pois as bandas espectrais observadas entre 1500-1600 devem-se às vibrações N-H e C-N acopladas de amidas secundárias e as observadas entre 1600 e 1700 cm⁻¹ é resultado do estiramento das ligações C=O de amidas primárias, as quais são sabidamente sensíveis a mudanças conformacionais, sendo, portanto, uma região sensível às alterações na estrutura secundária das proteínas (LIU, 1996; NARA, 2016; RIVERA, 2019).

A região entre 1200 e 1300 cm⁻¹, correspondente às vibrações de ligações N-H de amidas terciárias, também apresentou deslocamentos e alterações de intensidade e forma. A banda

observada em 1235/1237 cm^{-1} no grupo Nativo é deslocada para 1235/1243 cm^{-1} no grupo Descelularização Completa e para 1241/1230 no grupo Descel. Incompleta. Além disso, bandas adicionais foram observadas, 1285 e 1202 cm^{-1} no grupo Descel.Completa. Essas observações, da mesma forma que a análise das vibrações de amidas primárias e secundárias, confirma a presença desses componentes na MEC e indica também alterações conformacionais. Já as vibrações relativas a estiramentos CH_2 e CH_3 encontradas na região entre 2800 e 3050 cm^{-1} foram preservadas quanto às suas posições, mas alterações inespecíficas de intensidade ocorreram, trata-se, no entanto, de uma região complexa para análise a nível molecular (LIU, 1996).

Dessa forma, a análise descritiva da espectroscopia no infravermelho mostrou a manutenção das bandas típicas associadas a moléculas de colágeno e de proteoglicanos, mas evidenciou alterações no espectro relativas à integridade da estrutura secundária de proteínas. No entanto, para uma análise quantitativa das alterações na estrutura secundária proteica, bem como para quantificação das alterações em relação aos proteoglicanos, faz-se necessário, futuramente, ampliar o número de amostras e estabelecer os critérios para padronização da posição e da porção de interesse do órgão a ser analisado uma vez que o mesmo fragmento produz diferentes espectros quando suas faces ou porções são alternadas.

A espectroscopia de espalhamento Raman mostrou-se coerente com os resultados da espectroscopia no infravermelho ao evidenciar os modos vibracionais dos intervalos 1000 cm^{-1} - 1300 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} - 1700 cm^{-1} citados, inclusive, apresentou, nessas regiões, variações no formato, na intensidade e no deslocamento Raman. As bandas de amidas primárias foram observadas em 1650 e 1648 cm^{-1} para as descclularizações completas e 1673 e 1651 cm^{-1} para as incompletas. Um estudo realizado com córneas descclularizadas (NARA *et al*, 2016) atribuiu à deformação das fibras colágenas o deslocamento de bandas de amidas primárias para números de onda mais altos, como o que foi observado no nosso estudo para o pico em 1673 cm^{-1} de uma das duas amostras do grupo Descclularização Incompleta. No grupo Nativo não foram identificadas as bandas dessa região, pois, devido à fluorescência, alguns modos específicos do espectro vibracional do meio foram encobertos.

Amidas terciárias também foram encontradas, 1266 e 1263 cm^{-1} para as descclularizações completas e em 1247 e 1295 cm^{-1} para as incompletas. Considerando que a frequência de 1247 cm^{-1} no deslocamento Raman reflete a presença de fibras colágenas estruturadas em espirais desordenados (*random coil*), que as bandas na região de 1271 cm^{-1} estão associadas à estrutura colágena em alfa-hélice e que os deslocamento para números de onda mais altos são atribuídos

à ruptura de fibras em alfa-hélice para conversão em folhas beta; infere-se que o grupo descelularização completa apresentou predomínio alfa-hélice enquanto as descelularizações incompletas oscilaram entre espirais desordenados e ruptura de alfa-hélice (NARA *et al*, 2016). Ou seja, esse resultado sugere que as descelularizações incompletas foram acompanhadas dessas alterações estruturais. No entanto, para saber se tais alterações estruturais são decorrentes do processo de descelularização ou se são características prévias dos órgãos, as quais ocasionaram a descelularização incompleta, dever-se-ia, futuramente, realizar uma análise estrutural antes e uma após o processo de remoção celular.

Em se tratando do desenvolvimento do segundo protótipo, observou-se que o perfil de tensão obtido durante a descelularização a partir do LED de luz branca foi semelhante ao comportamento registrado sob a incidência dos LEDs de comprimentos de onda relativos à região do vermelho (692 nm), amarelo (590 nm) e âmbar (600 nm), i.e., baixa detecção de sinal no início do processo seguida por uma elevação em formato sigmoidal e finalizada por uma lenta estabilização. Por outro lado, o registro da lâmpada infravermelha (940 nm) apresentou intensidade de radiação transmitida mais elevada desde os primeiros instantes de descelularização, a qual foi seguida por uma abrupta estabilização do sinal. Isso indica uma redução abrupta da capacidade de detecção dos fótons transmitidos em decorrência da introdução de um fator novo ao processo. Uma das hipóteses levantadas recai sobre a possibilidade de maior absorção da radiação infravermelha pelo volume crescente de água no interior do órgão, o qual passa a preencher o volume anteriormente ocupado pelas células. Outro possível interferente é o próprio surfactante, no entanto, análises espectrofotométricas de soluções aquosas de 10% do surfactante SDS mostraram que não houve maior absorção da radiação pelo surfactante, em relação à água, na região do infravermelho.

Em relação à radiação ultravioleta (385 nm) e ao LED verde (525 nm), entende-se que a baixa intensidade do sinal captado pelo sistema atual tenha ocorrido em decorrência da baixa sensibilidade do fotodiodo para essas regiões do espectro eletromagnético. Por isso, faz-se necessário adicionar um fotodiodo específico para esses comprimentos de onda de interesse. Já os sinais recebidos da fonte da região relativa ao âmbar foram de baixa intensidade a despeito da sensibilidade do fotodiodo para essa região (600 nm), sugerindo a necessidade de ajustes da própria fonte luminosa.

As imagens obtidas pelas câmeras de vídeo evidenciaram a presença de fluorescência, com emissão na região correspondente ao vermelho, sob a incidência da luz branca logo no início do processo de descelularização, corroborando a evidência de emissão de fluorescência

observada na análise realizada com o espectrofotômetro de fibra óptica. Ainda sob a incidência da luz branca, porém ao final do processo, observou-se no órgão uma coloração azul esverdeada, a qual pode estar relacionada à emissão de moléculas autofluorescentes, como o colágeno, que, sob excitação de radiação entre 410 nm e 470 nm, emite luz entre 475 nm e 540 nm (SOKOLOV *et al*, 2002).

A radiação ultravioleta, por sua vez, mostrou maior realce da presença de remanescentes celulares no órgão durante as primeiras horas de perfusão quando comparada às demais lâmpadas, inclusive a branca, sugerindo uma possível utilidade da radiação ultravioleta na facilitação da visualização de remanescentes celulares. Além disso, sob a incidência da radiação ultravioleta (385 nm), observou-se a emissão de luz azul pelo tecido nas imagens obtidas pela câmera de aumento após 2 horas e após 6 horas do início da descelularização, que aumenta de intensidade à medida que os componentes celulares são removidos. Associa-se essa cor azul à excitação das fibras colágenas do tecido, pois, conforme observado na literatura, a excitação de fibras colágenas com uma radiação entre 310 e 390 nm produz emissões de luz entre 448 e 455 nm, as quais estão predominantemente relacionadas às ligações cruzadas de colágeno no estroma (SOKOLOV, 2002).

6. Conclusão

O sistema desenvolvido apresentou viabilidade para utilização da transmitância como forma de prever a eficiência da descelularização em tempo real através do emprego de um modelo logístico de regressão não-linear de quatro parâmetros. Ademais, observou-se também que o modelo matemático descrito apresentou poder explanatório do processo de descelularização pela avaliação do perfil óptico apesar dos ruídos do sistema, cujo tratamento é necessário para o melhoramento do protótipo. Uma vez que a padronização do tempo e a observação visual da transparência não são garantias da completa descelularização, a técnica não invasiva aqui apresentada é útil para identificar uma descelularização ineficiente, baseada no critério da remoção de DNA, ainda em estágios iniciais da perfusão. Dessa forma, torna-se possível prevenir as complicações experimentais adicionais decorrentes de sua ineficiência e auxiliar no estudo metodológico. Além disso, revelou-se que o uso da plataforma não implicou em impactos adicionais à matriz extracelular, sendo, nesse aspecto, equivalente aos processos tradicionais de descelularização de órgãos. Por fim, o protótipo mostrou potencial para melhorar as informações extraídas quando adicionado a diferentes fotodetectores para comprimentos de onda específicos e para orientação da detecção da luz; e, ao explorar moléculas com propriedades de autofluorescência, revelou o comportamento de componentes teciduais importantes.

8. Referências

1. AGUILERA I, Alvarez-Marquez A, Gentil MA, et al. Antigluthione S-transferase T1 antibodymediated rejection in C4d-positive renal allografts recipients. **Nephrology Dialysis Transplant** 2008; 23: 2393.
2. AHN, Geunseon et al. Precise stacking of decellularized extracellular matrix based 3D cell-laden constructs by a 3D cell printing system equipped with heating modules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 8624, 2017.
3. ALBERTS, Bruce et al. Blood vessels and endothelial cells. In: **Molecular Biology of the Cell. 4th edition**. Garland Science, 2002.
4. ALEXANDER, Stephen I. et al. Chimerism and tolerance in a recipient of a deceased-donor liver transplant. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 4, p. 369-374, 2008.
5. ATALA, Anthony. **Methods and compositions for organ decellularization**. U.S. Patent n. 6,376,244, 23 abr. 2002.
6. Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO). **Registro Brasileiro de Transplantes**. Ano XXI, n.3., Jan/Set, 2018. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abto03/default.aspx?mn=457&c=900&s=0>. Acessado em 04/03/2019.
7. AUBIN, Hug et al. Decellularized whole heart for bioartificial heart. In: **Cellular Cardiomyoplasty**. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 163-178.
8. BERSENEV, Alexey. Commercialization of organ decellularization. **Stem Cell Assays**. 2014.
9. BODNAR, E. et al. Damage of porcine aortic valve tissue caused by the surfactant sodiumdodecylsulphate. **The Thoracic and cardiovascular surgeon**, v. 34, n. 02, p. 82-85, 1986.
10. BÖHMIG, Georg A. et al. Strategies to overcome the ABO barrier in kidney transplantation. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 12, p. 732, 2015.
11. BONNANS, Caroline; CHOU, Jonathan; WERB, Zena. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 12, p. 786, 2014.
12. BONVILLAIN, Ryan; CHEADLE, John; PETERSON, Thomas. **Automated bioreactor system, system for automatically implementing protocol for decellularizing organ, and waste decontamination system**. U.S. Patent Application n. 15/508,005, 16 ago. 2018.
13. BORN, Max; WOLF, Emil. **Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light**. Elsevier, 2013.

14. CARDINAL, Héloïse et al. Antiperlecan antibodies are novel accelerators of immune-mediated vascular injury. **American Journal of Transplantation**, v. 13, n. 4, p. 861-874, 2013.
15. CEBOTARI, Serghei et al. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. **Circulation**, v. 114, n. 1_supplement, p. I-132-I-137, 2006.
16. CHANG, William G.; NIKLASON, Laura E. A short discourse on vascular tissue engineering. **NPJ Regenerative medicine**, v. 2, n. 1, p. 7, 2017.
17. COZZI, Emanuele; COLPO, Anna; DE SILVESTRO, Giustina. The mechanisms of rejection in solid organ transplantation. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 56, n. 4, p. 498-505, 2017.
18. 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.
19. CRAWFORD, B. et al. Cardiac decellularization with long-term storage and repopulation with canine peripheral blood progenitor cells. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 90, n. 6, p. 1457-1464, 2012.
20. DAI, Yifan et al. Targeted disruption of the $\alpha 1$, 3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 251, 2002.
21. DANN, Otto et al. Trypanocide Diamidine des 2-Phenyl-benzofurans, 2-Phenyl-indens und 2-Phenyl-indols. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 749, n. 1, p. 68-89, 1971.
22. DE VELD, Diana CG et al. Clinical study for classification of benign, dysplastic, and malignant oral lesions using autofluorescence spectroscopy. **Journal of biomedical optics**, v. 9, n. 5, p. 940951 (2004).
23. DE VELD, D. C. G. et al. The status of in vivo autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology. **Oral oncology**, v. 41, n. 2, p. 117-131, 2005.
24. DEDAVID, Berenice Anina; GOMES, Carmem Isse; MACHADO, Giovanna. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. EdiPUCRS, 2007.
25. DENNER, Joachim. Advances in organ transplant from pigs. **Science**, v. 357, n. 6357, p. 1238-1239, 2017.
26. 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, p. 34, 2017.
27. DEUEL, Thomas F.; CHANG, Yunchao. Growth factors. In: **Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)**. 2014. p. 291-308.
28. EDWARDS, C. A.; O'BRIEN, W. D. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. *Clinica Chimica Acta*, v. 104, p. 161-167, 1980.
29. EFIMOV, I. R.; Nikolski, V.P.; Salama, G. OPTICAL imaging of the heart. **Circulation research**, v. 95, n. 1, p. 21-33 (2004).

30. ELLIOTT, Martin J. et al. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2year follow-up study. **The Lancet**, v. 380, n. 9846, p. 994-1000, 2012.
31. EL-KASSABY, Abdel W. et al. Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix. **The Journal of urology**, v. 169, n. 1, p. 170-173, 2003.
32. ERTEN, Evren et al. Detergent-free decellularization of bovine costal cartilage for chondrogenic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells in vitro. **RSC Advances**, v. 6, n. 96, p. 94236-94246, 2016.
33. FRANTZ, Christian; STEWART, Kathleen M.; WEAVER, Valerie M. The extracellular matrix at a glance. **J Cell Sci**, v. 123, n. 24, p. 4195-4200, 2010.
34. FRIEND, P. J. Rejection reactions to different organ transplants. **Eye**, v. 9, n. 2, p. 190, 1995.
35. GADAGKAR, S.R.; Call, G. B. Computational tools for fitting the Hill equation to dose–response curves. **Journal of Pharmacological and Toxicological methods**, v. 71, p. 68-76 (2015).
36. GALVÃO FHF, Waitzberg DL, Bacchella T, Gama-Rodrigues J, Machado MC. Transplante de intestino delgado. **Arq Gastroenterologia**. 2003;40(2):118-25.
37. GEERTS, S., Ozer, S., Jaramillo, M., Yarmush, M. L., Uygun, B. E., Nondestructive methods for monitoring cell removal during rat liver decellularization. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 22(7), 671-678 (2016).
38. GILBERT, Thomas W.; FREUND, John M.; BADYLAK, Stephen F. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. **Journal of Surgical Research**, v. 152, n. 1, p. 135-139, 2009.
39. GILBERT, Thomas W.; HOBSON, Christopher M.; UNGCHUSRI, Ethan N. **Method and Apparatus for Decellularization of Tissue**. U.S. Patent Application n. 15/983,150, 20 set. 2018.
40. GOLDSTEIN, Joseph I. et al. The SEM and Its Modes of Operation. In: **Scanning Electron Microscopy and X-Ray microanalysis**. Springer, Boston, MA, 2003. p. 21-60.
41. GOLDSTEIN, Steven; BLACK, Kirby S. **Tissue decellularization**. WO 1998046165A1; A61F 2/24; 22, oct. 1998.
42. GONFIOTTI, Alessandro et al. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. **The Lancet**, v. 383, n. 9913, p. 238-244, 2014.
43. GOULMY, E. A. J. M. et al. The role of human minor Histocompatibility antigens in graft failure; a mini-review. **Eye**, v. 9, p. 180-184, 1995.
44. GRINYÓ, Josep M. Why is organ transplantation clinically important?. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 6, p. a014985, 2013.
45. GUYETTE, J.P., Gilpin,S.E., Charest,J.M.,Tapias, L.F., Ren,X.,Ott,H.C. Perfusion decellularization of whole organs. **Nature Protocols**; 6, 1451–1468, 2014.
46. GUYETTE, Jacques P. et al. Bioengineering human myocardium on native extracellular matrix. **Circulation research**, v. 118, n. 1, p. 56-72, 2016.

47. HAGEN, C.K. et al. High contrast microstructural visualization of natural acellular matrices by means of phase-based x-ray tomography. **Scientific reports**, 5, 18156 (2015).
48. HALLER, N. et al. Noninvasive analysis of synthetic and decellularized scaffolds for heart valve tissue engineering. **ASAIO Journal**, 59(2), 169-177 (2013).
49. HALLMANN, Rupert et al. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. **Physiological reviews**, v. 85, n. 3, p. 979-1000, 2005.
50. HAMILTON, N. J. et al. Tissue-engineered tracheal replacement in a child: A 4-year follow-up study. **American Journal of Transplantation**, v. 15, n. 10, p. 2750-2757, 2015.
51. HILL, A.V., THE possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. **Journal of Physiology**, 40, IV–VII (1910).
52. HILL, Ryan C. et al. Quantification of extracellular matrix proteins from a rat lung scaffold to provide a molecular readout for tissue engineering. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 4, p. 961-973, 2015.
53. HEINRICHS, A. Stains and fluorescent dyes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, p. S7, 2009.
54. HOLDSWORTH, Gill, et al. "Quantitative and organisational changes in mature extracellular matrix revealed through high-content imaging of total protein fluorescently stained in situ." **Scientific Reports** 7.1, 9963, 2017.
55. HOPKINS, Richard A. et al. Pulmonary arterioplasty with decellularized allogeneic patches. **The Annals of thoracic surgery**, v. 97, n. 4, p. 1407-1412, 2014.
56. HUSSEY, George S.; DZIKI, Jenna L.; BADYLAK, Stephen F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. **Nature Reviews Materials**, p. 1, 2018.
57. JACKSON, Richard L.; BUSCH, Steven J.; CARDIN, Alan D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiological reviews**, v. 71, n. 2, p. 481-539, 1991.
58. JACQUES, Steven L. Origins of tissue optical properties in the UVA, visible, and NIR regions. **OSA TOPS on advances in optical imaging and photon migration**, v. 2, p. 364-369, 1996.
59. JACQUES, Steven L. Optical properties of biological tissues: a review. **Physics in Medicine & Biology**, v. 58, n. 11, p. R37, 2013.
60. JÄRVELÄINEN, Hannu et al. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. **Pharmacological reviews**, v. 61, n. 2, p. 198-223, 2009.
61. JOOSTEN, Simone A. et al. Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy. **American journal of transplantation**, v. 5, n. 2, p. 383-393, 2005.

62. KAPUSCINSKI, Jan. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 70, n. 5, p. 220-233, 1995. Karlsson, m.; Björnsson, s. Quantitation of proteoglycans in biological fluids using alcian blue. **Methods in molecular biology** (*clifton, n.j.*), v. 171, n. 2, p. 159–173, 2001.
63. 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.
64. KITAHARA, Hiroto et al. Heterotopic transplantation of a decellularized and recellularized whole porcine heart. **Interactive cardiovascular and thoracic surgery**, v. 22, n. 5, p. 571-579, 2016.
65. 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.
66. LAFLAMME, Michael A.; MURRY, Charles E. Regenerating the heart. **Nature biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 845, 2005.
67. LANE, Pierre Mark et al. Simple device for the direct visualization of oral-cavity tissue fluorescence. **Journal of biomedical optics**, v. 11, n. 2, p. 024006 , 2006.
68. LENTZ, David J.; POLLOCK, Elisabeth M. **Method for inhibiting mineralization of natural tissue during implantation**. U.S. Patent n. 4,323,358, 6 abr. 1982.
69. LI, Qiyao et al. Proteomic analysis of naturally-sourced biological scaffolds. **Biomaterials**, v. 75, p. 37-46, 2016.
70. LIU, Kan-Zhi et al. Modification of the extracellular matrix following myocardial infarction monitored by FTIR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1315, n. 2, p. 73-77, 1996.
71. LU, T-Y., Lin,B., Kim, J., Sullivan, M., Tobita, K., Salama, G., Yang, L. REPOPULATION of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. **Nature Communications**, 4, 2013.
72. MALDANER, Liane et al. The State Of Art Of Ultra Performance Liquid Chromatography [o Estado Da Arte Da Cromatografia Líquida De Ultra Eficiência]. **Química Nova**, 2009.
73. MORRIS, Aaron H., D. K. Stamer, and T. R. Kyriakides. "The host response to naturally-derived extracellular matrix biomaterials." **Seminars in Immunology**. Academic Press, 2017.
74. 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.
75. NABA, Alexandra et al. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 4, p. M111. 014647, 2012.
76. NARA, Sharda et al. Preservation of biomacromolecular composition and ultrastructure of a decellularized cornea using a perfusion bioreactor. **RSC advances**, v. 6, n. 3, p. 2225-2240, 2016.

77. NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-5**. Artmed Editora, 2013
78. NICHOLS, Joan E. et al. Production and transplantation of bioengineered lung into a large-animal model. **Science translational medicine**, v. 10, n. 452, p. eaao3926, 2018.
79. NIEMZ, Markolf H. **Laser-tissue interactions: fundamentals and applications**. Springer Science & Business Media, 2013.
80. NUNEZ, Silvia; RIBEIRO, Martha Simões; SEGUNDO, Aguinaldo. **Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**. Elsevier Brasil, 2012.
81. ODELL, Ian D.; COOK, Deborah. Immunofluorescence techniques. **The Journal of investigative dermatology**, v. 133, n. 1, p. e4, 2013.
82. OLAUSSON, M.; Kuna, V.K.; Travnikova, G.; Backdahl, H.; Patil, P.B.; Saalman, R.; Borg, H.; Jeppsson, A.; Sumitran-Holgersson, S. In Vivo Application of Tissue-Engineered Veins Using Autologous Peripheral Whole Blood: A Proof of Concept Study. **EBioMedicine**, 1, 72–79, 2014.
83. OLIVEIRA, Ana Celeste et al. Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66538, 2013.
84. ORAND, Laszlo; GRAHAM, Robert M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 4, n. 2, p. 140, 2003.
85. OTT, Harald C. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. **Nature medicine**, v. 14, n. 2, p. 213, 2008.
86. PELOSO, A., Dhal, A., Zambon, JP., Li, P., Orlando, G., Atala, A., Soker, Shay. Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering. **Stem Cell Research & Therapy**, 6:107, 2015
87. 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.
88. PHILIPS, Charlot; CORNELISSEN, Maria; CARRIEL, Víctor. Evaluation methods as quality control in the generation of decellularized peripheral nerve allografts. **Journal of neural engineering**, v. 15, n. 2, p. 021003, 2018.
89. PHILLIPS, Benedict L.; CALLAGHAN, Chris. The immunology of organ transplantation. **Surgery (Oxford)**, v. 35, n. 7, p. 333-340, 2017.
90. PINHEIRO, J. C. and Bates, D.M. Mixed-Effects Models in S and S-plus. **Statistics and Computing** (New York, NY, 2000).
91. PINHEIRO J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D and R Core Team (2018). nlme: **Linear and Nonlinear Mixed Effects Models**. R package version 3.1-137, <https://CRAN.Rproject.org/package=nlme>.
92. PORZIONATO, Andrea et al. Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 12, p. 4117, 2018.

93. RAMAN, Chandrasekhara Venkata. A new radiation. **Indian Journal of physics**, v. 2, p. 387-398, 1928.
94. REARDON, Sara. New life for pig-to-human transplants. **Nature News**, v. 527, n. 7577, p. 152, 2015.
95. REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clinical Biochemistry*, v. 29, n. 3, p. 225–229, 1996.
96. REMUZZI, Andrea et al. Experimental evaluation of kidney regeneration by organ scaffold recellularization. **Scientific reports**, v. 7, p. 43502, 2017.
97. VÁSQUEZ-RIVERA, Andrés et al. Spectral fingerprinting of decellularized heart valve scaffolds. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2019.
98. ROBINSON, James et al. IMGT/HLA Database—a sequence database for the human major histocompatibility complex. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 1, p. 210-213, 2001.
99. ROSMARK, Oskar et al. Quantifying extracellular matrix turnover in human lung scaffold cultures. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 5409, 2018.
100. ROZARIO, Tania; DESIMONE, Douglas W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Developmental biology**, v. 341, n. 1, p. 126-140, 2010.
101. SAIDI, Iyad S.; JACQUES, Steven L.; TITTEL, Frank K. Mie and Rayleigh modeling of visiblelight scattering in neonatal skin. **Applied optics**, v. 34, n. 31, p. 7410-7418, 1995.
102. ŠAULYS, B., Kornijčuk, V., Matukas, J., Palenskis, V., Pralgauskaitė, S., Glemža, K. Optical and electrical noise characteristics of side emitting LEDs. **Acta Physica Polonica A**, 119(2), 244-246, 2011.
103. SCANDLING, John D. et al. Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 4, p. 362-368, 2008.
104. SCANZIANI, Eugenio. Immunohistochemical staining of fixed tissues. In: **Mycoplasma protocols**. Humana Press, 1998. p. 133-140.
105. SCHAEFER, Liliana; SCHAEFER, Roland M. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell and tissue research*, v. 339, n. 1, p. 237, 2010.
106. SERAPIONI, Mauro. Métodos qualitativos e quantitativos na pesquisa social em saúde: algumas estratégias para a integração. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 5, p. 187-192, 2000.
107. SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. In: **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Ltc, 2007
108. SMITH, Michael L. et al. Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. **PLoS biology**, v. 5, n. 10, p. e268, 2007.
109. SOKOLOV, Konstantin V. et al. Realistic three-dimensional epithelial tissue phantoms for biomedical optics. *Journal of biomedical optics*, v. 7, n. 1, p. 148-157, 2002.
110. SPIEVACK, Alan R. **Extracellular matrix for the treatment of intestinal disease and methods thereof**. U.S. Patent Application n. 10/092,678, 9 out. 2018.

111. TAKATSUKI, Mitsuhsa et al. Weaning Of Immunosuppression In Living Donor Liver Transplant Recipients1. **Transplantation**, v. 72, n. 3, p. 449-454, 2001.
112. TALARI, Abdullah Chandra Sekhar et al. Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 52, n. 5, p. 456-506, 2017.
113. 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.
114. TAYLOR, Craig J.; DYER, Philip A. Histocompatibility antigens. **Eye**, v. 9, n. 2, p. 173, 1995.
115. THEOCHARIS, Achilleas D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 4-27, 2016.
116. TITFORD, M. The long history of hematoxylin. **Biotechnic & histochemistry**, v. 80, n. 2, p. 73-78, 2005.
117. TIMCHENKO, E. V. et al. Assessment of decellularization of heart bioimplants using a Raman spectroscopy method. **Journal of biomedical optics**, 22(9), 091511; 2017.
118. TINT, Derrick et al. Spectroscopic Analysis of Human Tracheal Tissue during Decellularization. **Otolaryngology Head and Neck Surgery**, v. 160, n. 2, p.302-309, 2019.
119. TURATO, Egberto Ribeiro. Métodos qualitativos e quantitativos na área da saúde: definições, diferenças e seus objetos de pesquisa. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, p. 507-514, 2005.
120. United Network for Organ Sharing. **Organ Procurement and Transplant Network(OPTN)** Disponível em: <https://optn.transplant.hrsa.gov/data/view-data-reports/national-data/> .Acessado em 04/03/2019.
121. VAN VEEN, Robert LP et al. Determination of VIS-NIR absorption coefficients of mammalian fat, with time-and spatially resolved diffuse reflectance and transmission spectroscopy. In: **Biomedical Topical Meeting**. Optical Society of America, 2004. p. SF4.
122. VO-DINH, Tuan. **Biomedical Photonics Handbook, 3 Volume Set**. CRC press, 2014.
123. VOGEL, V. Mechanotransduction involving multimodular proteins: Converting force into biochemical signals. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, 35:459–488, 2006.
124. WANG, Mengmeng et al. Glycosaminoglycans (GAGs) and GAG mimetics regulate the behavior of stem cell differentiation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 150, p. 175-182, 2017.
125. WARRAICH, Rahat S. et al. Cardiac myosin autoantibodies and acute rejection after heart transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. **Transplantation**, v. 69, n. 8, p. 1609-1617, 2000.
126. WEDLER, Gerd; INOCÊNCIO, A. Armando; INOCÊNCIO, Maria Alice. **Manual de química física**. 2001
127. WEST, Lori J. et al. ABO-incompatible heart transplantation in infants. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 11, p. 793-800, 2001.

128. WILSON, Gregory J. et al. Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement. **The Annals of thoracic surgery**, v. 60, p. S353-S358, 1995.
129. WILSON, Jeremy D.; COTTRELL, William J.; FOSTER, Thomas H. Index-of-refraction-dependent subcellular light scattering observed with organelle-specific dyes. **Journal of biomedical optics**, v. 12, n. 1, p. 014010, 2007.
130. WITZENBURG, Colleen et al. Mechanical changes in the rat right ventricle with decellularization. **Journal of Biomechanics**, v. 45, n. 5, p. 842-849, 2012.
131. WOOD, Kathryn J.; BUSHELL, Andrew; HESTER, Joanna. Regulatory immune cells in transplantation. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 6, p. 417, 2012.
132. YAMAMOTO, Fumi-ichiro et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. **Nature**, v. 345, n. 6272, p. 229, 1990.
133. YANG, Tian T. et al. Histopathology mapping of biochemical changes in myocardial infarction by Fourier transform infrared spectral imaging. **Forensic science international**, v. 207, n. 1-3, p. e34e39, 2011.
134. YUSEN, Roger D. et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-third adult lung and heart–lung transplant report—2016; Focus theme: Primary diagnostic indications for transplant. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 35, n. 10, p. 1170-1184, 2016.
135. ZHANG, Donghui; JIANG, Wei. From one-cell to tissue: reprogramming, cell differentiation and tissue engineering. **BioScience**, v. 65, n. 5, p. 468-475, 2015.
136. ZHOU, Ming et al. Circulating organ-specific microRNAs serve as biomarkers in organ-specific diseases: implications for organ allo-and xeno-transplantation. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 8, p. 1232, 2016.
137. ZIA, Sonia et al. Hearts beating through decellularized scaffolds: whole-organ engineering for cardiac regeneration and transplantation. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 705-715, 2016.
138. ZOU, Dan et al. Preparation of a biomimetic ECM surface on cardiovascular biomaterials via a novel layer-by-layer decellularization for better biocompatibility. **Materials Science and Engineering: C**, v. 96, p. 509-521, 2019.
139. ZVAROVA, B. *et al.* Residual Detergent Detection Method for Nondestructive Cytocompatibility Evaluation of Decellularized Whole Lung Scaffolds. *Tissue engineering. Part C, Methods*, v. 22, n. 5, p. 418–28, 2016.

9. Anexos

I. Figuras Suplementares

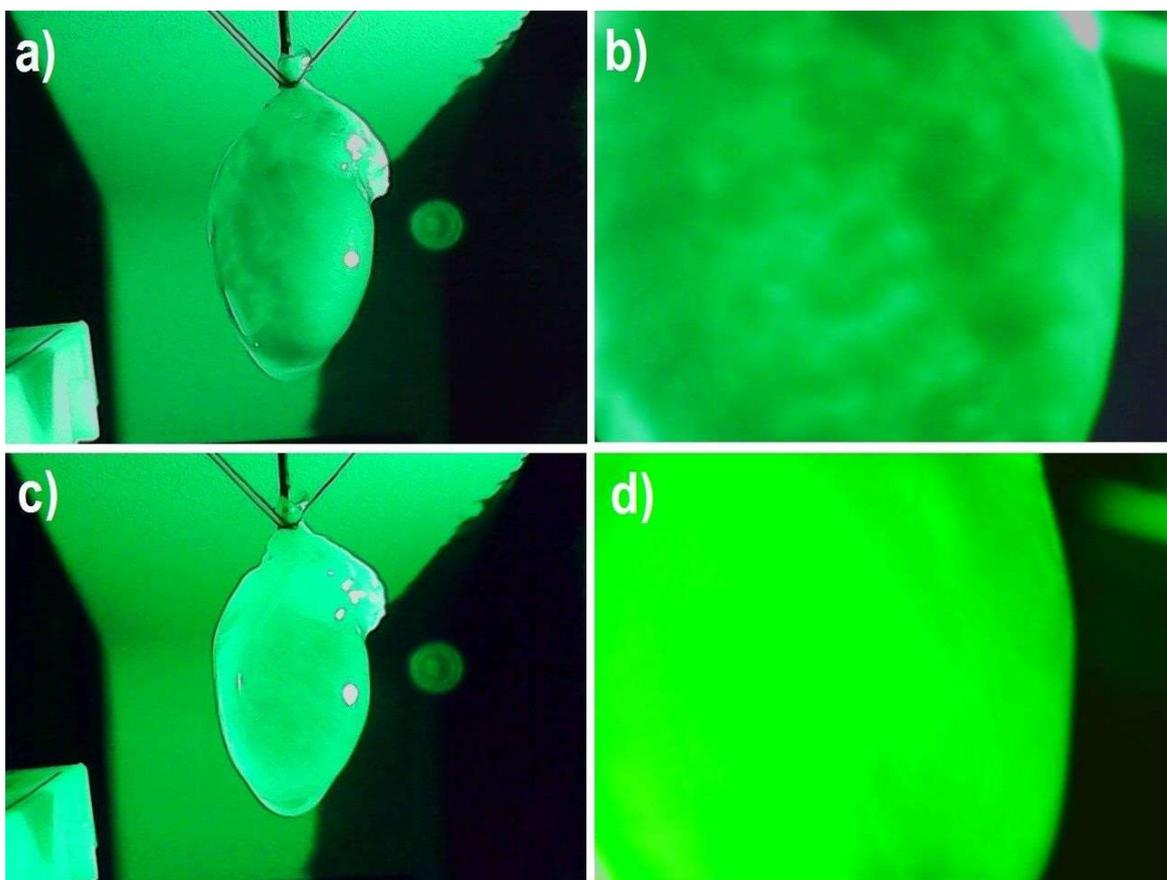


Figura A1. Imagens de duas câmeras de vídeo para monitoramento da descellularização utilizando LED Verde. Para padronização da posição utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b** e **d**). As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo. **c** e **d**, após 6 horas do início do processo.

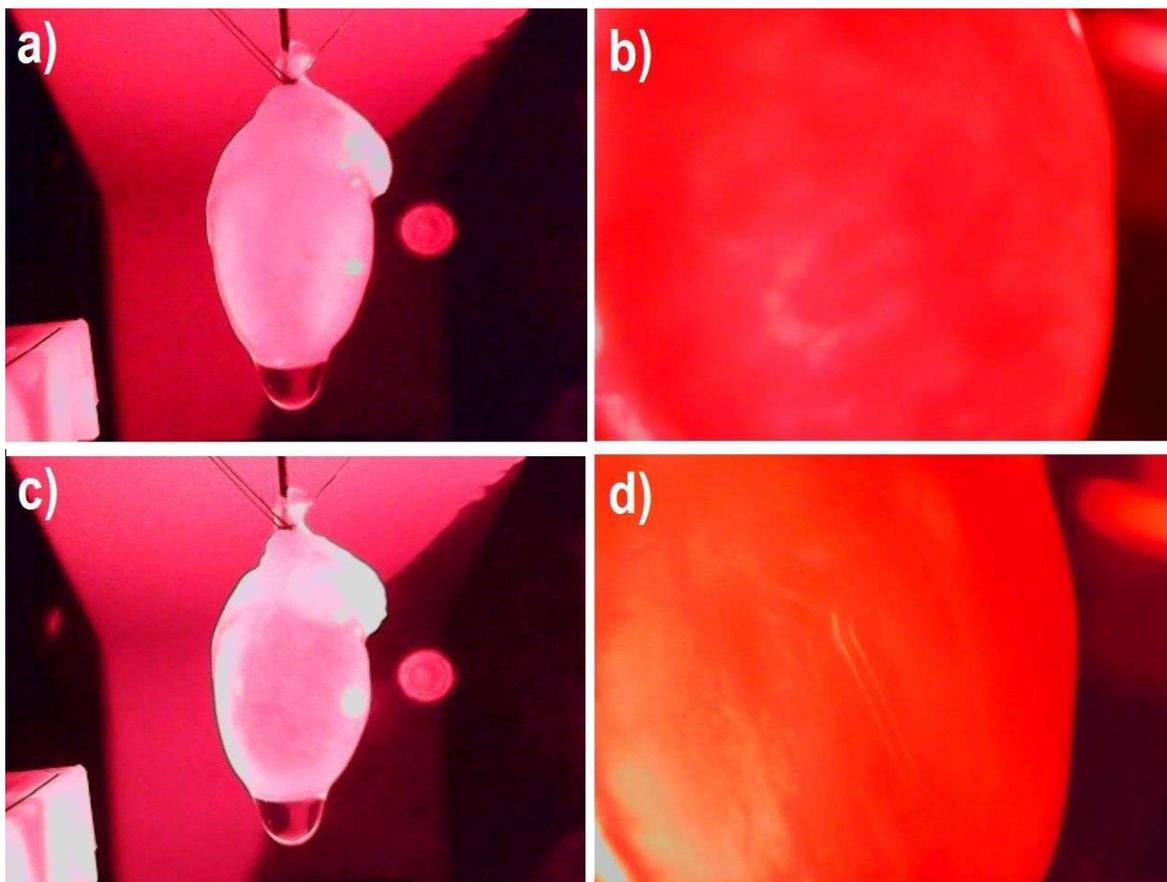


Figura A2. Imagens de duas câmeras de vídeo para monitoramento da descelularização utilizando LED vermelho. Para padronização da posição utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b** e **d**). As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo. **c** e **d**, após 6 horas do início do processo.

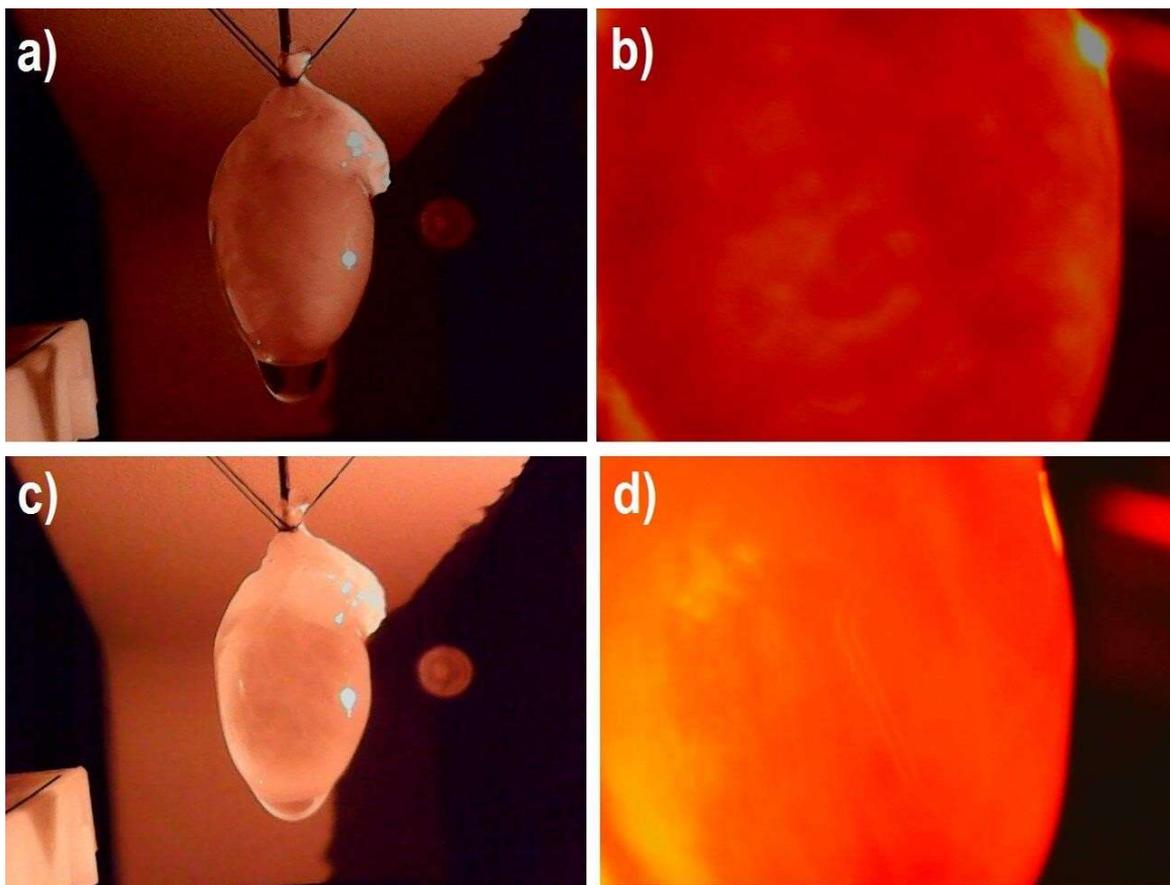


Figura A3. Imagens de duas câmeras de vídeo para monitoramento da descellularização utilizando LED Âmbar. Para padronização da posição utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b** e **d**). As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo. **c** e **d**, após 6 horas do início do processo.

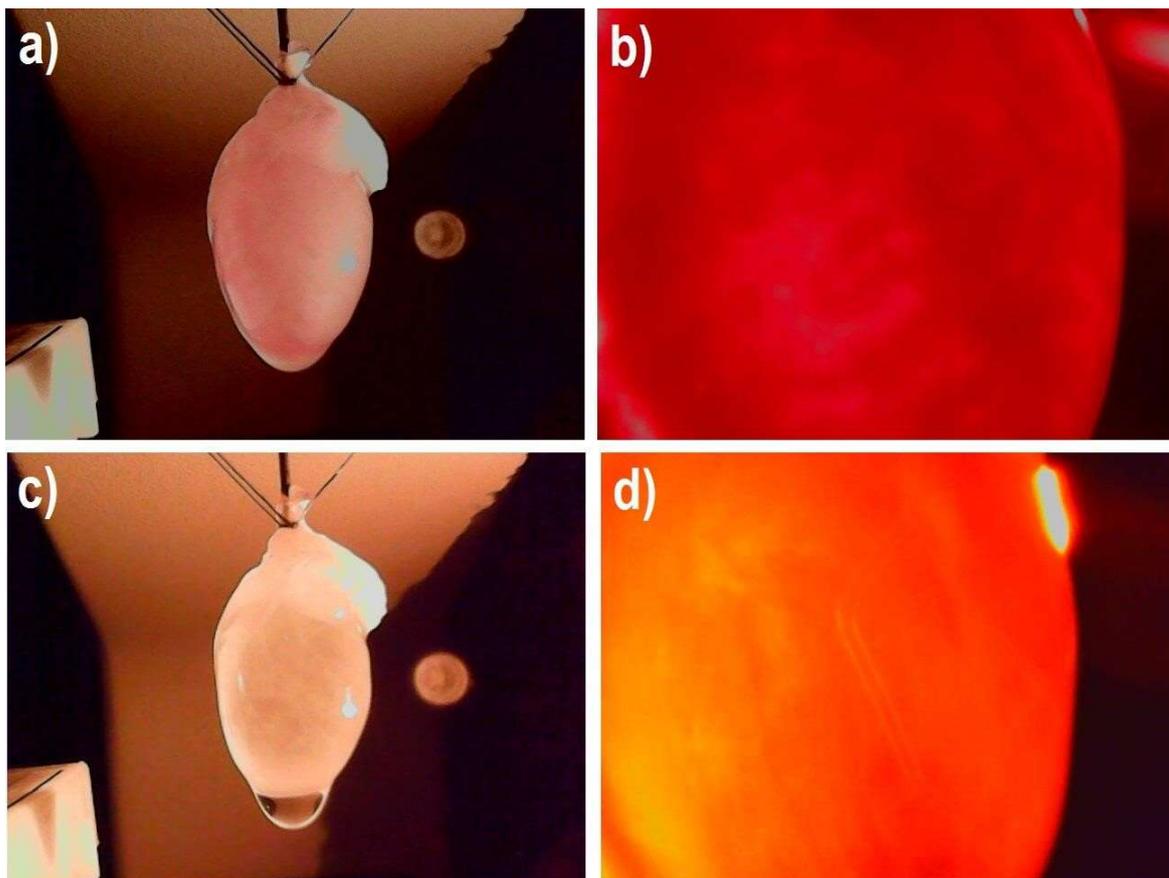


Figura A4. Imagens de duas câmeras de vídeo para monitoramento da descellularização utilizando LED Amarelo. Para padronização da posição utilizou-se a focalização na circulação coronária do miocárdio, a qual pode ser observada nas imagens **b** e **d**). As imagens **a** e **b** referem-se ao início do processo. **c** e **d**, após 6 horas do início do processo.

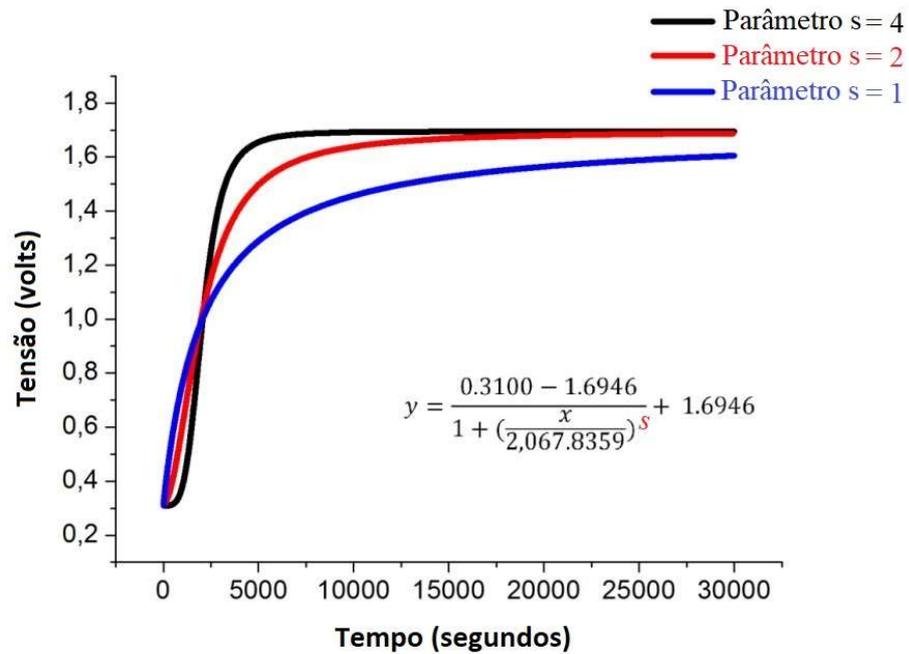


Figura A5. Influência do coeficiente de Hill sobre o formato da curva. Os demais parâmetros da equação foram mantidos enquanto o valor do coeficiente de Hill foi alterado para os valores 4, 2 e 1. Modificado de Pereira *et al*, 2019.

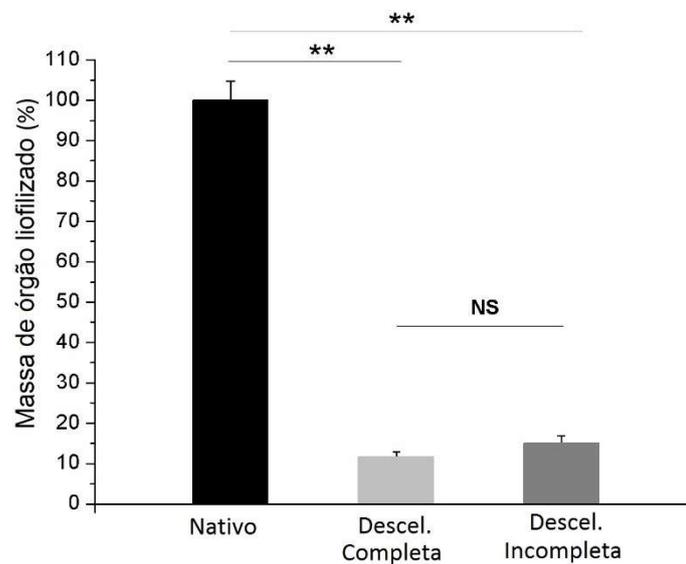


Figura A6. Gráfico de barras representativo das massas liofilizadas, após o processo de descelularização, dos órgãos dos grupos Descel. Completa e Descel. Incompleta em comparação aos órgãos do grupo Nativo. (n=4 por grupo; ANOVA de uma via com correção de Welch) **p<0,001. Modificado de Pereira *et al*, 2019.

II. Certificados

1. Trabalho selecionado para Participar de Evento Internacional de Ciência e Inovação.



2. Trabalho contemplado com o Prêmio do Programa Sinapse da Inovação



GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO
Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Educação Profissional



O Diretor presidente da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo, no uso de suas atribuições, torna público o resultado das propostas classificadas na Fase III - Projetos de Fomento do EDITAL FAPES Nº 01/2017 PROGRAMA SINAPSE DA INOVAÇÃO – CONEXÃO ES

	Título	Nome do Proponente	Temática	Município Proponente
1	Astan Bike	Jose e Guilherme Lirio Pala	Química e Materiais	Cariacica
2	LUDO Thinking - Soluções inovadoras para a educação corporativa	Renata da Silva Machado	Gestão	Vila Velha
3	Quantificação do Volume de Madeira Empilhada	Harilyny de Brito Matias	Biociência	Jerônimo Monteiro
4	Aquicultura Ornamental Marinha: Produção de cavalos-marinhos	Carlos Eduardo Stein	Biociência	Vitória
5	SOMARTECH GRC - Gerenciamento de Riscos e Incertezas na Construção	Fernando Augusto Ramos	Gestão	Vila Velha
6	Bioinformática como solução para análises ambientais	Gerard Ill Raga	Biociência	Vitória
7	Plataforma web para destinação de resíduos com sustentabilidade	Christian José Sabino	Gestão	Serra
8	Sensor Óptico aplicado à Bioengenharia de Órgãos	Rayssa Helena Arruda Pereira	Biociência	Vitória
9	AvançaAgro	Marcio Adonis Miranda Rocha	Biociência	Vitória
10	Laboratório de reprodução de orquídeas in vitro	Michele Sossai Spadele	Biociência	Venda Nova do Imigrante
11	NP VOLTA Central de Agricultura Orgânica Urbana de Vila Velha/ES	Renate Wanke	Biociência	Vila Velha
12	Corrente para içamento de Bobinas - Protegida com Borracha Vulcanizada	Felipe Viana Corti	Automação	Vitória
13	Plataforma online de cálculo e correlagem de seguros	Philippe Alvarenga	Gestão	Vitória
14	Síntese de Protótipos Bioativos Inéditos com Atividade Anticâncer	Eclair Venturini Filho	Química e Materiais	Vila Velha
15	Misturas Betuminosas Especiais em Bloco.	Douglas de Oliveira Joaquim	Química e Materiais	Serra
16	Válvula direcional de múltiplas vias	Ryck Andrade Boroto	Automação	São Mateus
17	Diagnóstico automático auxiliar de citologia de imagem (DAACI)	Célio Siman Mafra Nunes	Biociência	Vila Velha
18	Plataforma esad de organização Advocatícia	Leonardo Silveira Itala Fraga	Gestão	Vitória
19	Emtempo Saúde - Tecnologia da Informação na Área de Saúde	Marcus Vinicius Albernaz Leitão	Gestão	Vitória
20	Spreading - Conectando voluntários à escolas públicas	Raquel Cristina Loyola	Tecnologias Sociais	Vitória
21	Roldana para aparelho de musculação com mecanismo de variação de carga	Paulo Vitor Vidal Aguiar	Tecnologias Sociais	São Mateus
22	Bloqueador de Tampas de Tanques Transportadores de Combustíveis	Márcio Fornaciari Donna	Automação	Cachoeiro de Itapemirim
23	Concreto sustentável	Ludimila Ribeiro Peloso	Química e Materiais	Anchieta
24	DSBio: Inovação de Produtos Bioativos com atividade antimicrobiana	Maria Diana C. Sales	Biociência	Vitória
25	EveryCare Saúde	Renato Storani Pessoa	Tecnologias Sociais	Vitória
26	Mission Life - Jogo do Planejamento Estratégico Pessoal	Mônica Nogueira de Moraes	Gestão	Vitória
27	Pipeta Virtual-Site para cotação de preços de produtos laboratoriais	Rodrigo Moraes	Tecnologias Sociais	Vitória
28	Disposição Construtiva aplicada em Filtro para Irrigação	Ricardo Jacobsen Stinghel	Automação	Itaguapu
29	FrameYou - Soluções em Marketing Simplificado e Baixo Custo	Marcos Martins Ribeiro	Tecnologias Sociais	Vitória
30	Biogel para limpeza de tártaro e cáries nos dentes de cães e gatos.	Wilton Soares Cardoso	Biociência	Venda Nova do Imigrante
31	Uso de GRITS (Resíduo da Fabricação de Celulose) em Pavimentos Urbanos	Fabrizio Soares de Oliveira	Química e Materiais	Aracruz
32	BDGeodesias: Cidades Inteligentes & Resilientes	Mônica Regina da Silva Passos	Tecnologias Sociais	Serra
33	Produção de cogumelos no Espírito Santo com uso de resíduos agrícolas.	Ademir Junior Fornaciari	Biociência	Governador Lindenberg
34	APICUM - Estrutura redutora de poluentes aquáticos	Haysian Silvestre Costa	Biociência	Vila Velha
35	Aioh, o futuro da educação é agora! Você já está preparado para ele?	Maurício Rodrigues Gavina	Eletroeletrônica	Vila Velha
36	TITIBUM - Roupa Flutuante	rita de cassia perini dillem	Tecnologias Sociais	Vitória
37	EasyFood - Cardápio Virtual	Leonardo Moreira Gomes	Automação	Vitória
38	Química e Física no cotidiano: a ciência em suas mãos.	Honorio Coutinho de Jesus	Tecnologias Sociais	Vitória
39	Nano cervejaria escalonável para restaurantes, bares, pubs e hobbyistas	Marcos Tesch Cavicchia	Automação	Vila Velha
40	Stonesprice.com, a solução definitiva para o setor de rochas.	Thales Lemos de Souza	TIC	Cachoeiro de Itapemirim

Aviso publicado no DIO/ES em 14/12/2017.

Jose Antonio Bof Buffon
Diretor presidente da Fapes

3. Declaração do Depósito de Patente



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Instituto de Inovação Tecnológica

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que Breno Valentin Nogueira, Rayssa Helena Arruda Pereira, Adilson Ribeiro Prado, Luiz Felipe Castello Del Caro, Gabriela Modenesi Sirtoli, Jairo Pinto de Oliveira, Tadeu Ériton Caliman Zanardo, Gabriel Henrique Taufner e Afrânio Côgo Destefani, constam como inventores no pedido de privilégio de invenção denominado **"SENSOR ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS"**, sob o número INPI – BR 10 2017 009187 2, depositado junto ao INPI na data de 02/05/2017, tendo a UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES, como titular.

Vitória/ES, 13 de julho de 2017

Antonio Alberto Ribeiro Fernandes
Diretor do INIT/UFES

PROF. ANTONIO ALBERTO RIBEIRO FERNANDES
DIRETOR DO INSTITUTO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PRPPG-UFES

Av. Fernando Ferrari, 514 - Campus Universitário - Goiabeiras - Vitória - ES
CEP 29075-910 - e-mail: nites@prppg.ufes.br - Tel: (27) 4009-7885

4. Comprovante do Depósito de Patente

< Uso exclusivo do INPI >

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PROTÓCOLO GERAL

02/05/2017 02517000033
14:51 REES



BR 10 2017 009187 2

Espaço reservado para o protocolo Espaço reservado para a etiqueta Espaço reservado para o código QR



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Sistema de Gestão da Qualidade

Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**
 - 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
 - 1.2 Qualificação: IES
 - 1.3 CNPJ/CPF: 32479123000143
 - 1.4 Endereço Completo: AV FERNANDO FERRARI N° 514-CAMPUS UNIVERSITARIO GOIABEIRAS
 - 1.5 CEP: 29075-910
 - 1.6 Telefone: (27) 40097885 1.7 Fax:
 - 1.8 E-mail: josecarlos.init@gmail.com

continua em folha anexa
2. **Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição
3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**
SENSOR ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO DE ORGÃOS

continua em folha anexa
4. **Pedido de Divisão: do pedido N°** **Data de Depósito:**
5. **Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)
O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PROTÓCOLO GERAL

02/05/2017 02517000033
14:51 REES



52400.067208/2017-56

continua em folha anexa

5. Artigo Publicado

www.nature.com/scientificreports

**SCIENTIFIC
REPORTS**
nature research

OPEN

A non-linear mathematical model using optical sensor to predict heart decellularization efficacy

Rayssa Helena Arruda Pereira^{1,2}, Adilson Ribeiro Prado³, Luiz Felipe Castello Del Caro³, Tadeu Ériton Caliman Zanardo^{1,2}, Airlane Pereira Alencar⁴ & Breno Valentim Nogueira^{1,2}

Received: 7 November 2018
Accepted: 7 August 2019
Published online: 21 August 2019

One of the main problems of the decellularization technique is the subjectivity of the final evaluation of its efficacy in individual organs. This problem can result in restricted cell repopulation reproducibility and worse responses to transplant tissues. Our proposal is to analyze the optical profiles produced by hearts during perfusion decellularization, as an additional method for evaluating the decellularization process of each individual organ. An apparatus comprised of a structured LED source and photo detector on an adjustable base was developed to capture the relationship between transmitted light during the perfusion of murine hearts, and residual DNA content. Voltage-time graphic records were used to identify a nonlinear mathematical model to discriminate between decellularizations with remaining DNA above (Incomplete Decellularization) and below (Complete Decellularization) the standardized limits. The results indicate that temporal optical evaluation of the process enables inefficient cell removal to be predicted in the initial stages, regardless of the apparent transparency of the organ. Our open system also creates new possibilities to add distinct photo detectors, such as for specific wavelengths, image acquisition, and physical-chemical evaluation of the scaffold, in order to collect different kinds of information, from dozens of studies. These data, when compiled and submitted to machine learning techniques, have the potential to initiate an exponential advance in tissue bioengineering research.

6. Reportagem na Folha de São Paulo

13/08/2018

Brasileiros criam técnica que facilita remontagem de coração para transplante sem rejeição - 17/06/2018 - Reinaldo José Lopes - F...

FOLHA DE S.PAULO



Reinaldo José Lopes (/colunas/reinaldojoselopes/)



Brasileiros criam técnica que facilita remontagem de coração para transplante sem rejeição

Depois de remover células, o que resta é uma estrutura translúcida, espécie de fantasma do órgão

17.jun.2018 às 2h02

 EDIÇÃO IMPRESSA (<https://www1.folha.uol.com.br/fsp/fac-simile/2018/06/17/>)

“Descelularizado” parece neologismo para designar quem está sofrendo uma crise de abstinência por falta de acesso ao smartphone, mas o termo, na verdade, é uma das palavras-chave para quem tenta contornar a escassez de órgãos para transplante no mundo.

E se fosse possível descelularizar totalmente o coração de um doador —ou seja, retirar todas as células e todo o material genético original—, usar o “esqueleto” do órgão como base para células do próprio paciente que vai receber o transplante e, assim, concluir o processo tendo em mãos um coração novo em folha, pronto para ser transplantado sem riscos de rejeição?

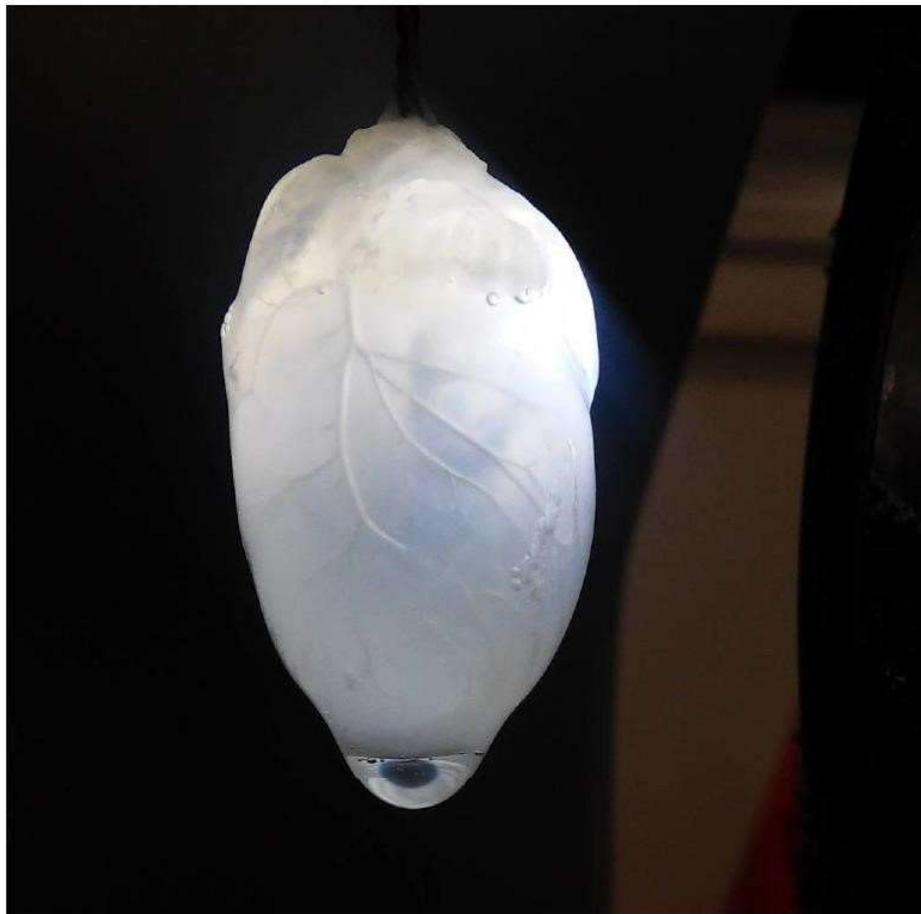
Cinquenta anos depois dos primeiros transplantes

(<http://temas.folha.uol.com.br/transplante-de-coracao-50/>)

No Brasil e no mundo, vários laboratórios mundo afora têm corrido atrás desse novo objetivo. “É algo com

um potencial enorme, que está se aproximando das aplicações em seres humanos”, afirma Rayssa Arruda Pereira, que faz doutorado em biotecnologia na Ufes (Universidade Federal do Espírito Santo).

A pesquisadora, seu orientador Breno Nogueira e outros colegas estão tentando contornar os obstáculos que ainda existem para que a técnica se torne viável, tanto para transplantes de coração quanto para outros órgãos, como rim e baço.



Coração descelularizado, ou seja, após ter suas células removidas; no fim, só resta uma espécie de esqueleto do órgão - Divulgação/UFES

O primeiro passo para isso é fazer com que sobre apenas a chamada matriz extracelular do órgão original, ou seja, o conjunto de proteínas e outras moléculas que dão suporte às células, mais ou menos como os andaimes usados para construir um prédio. Quando esse processo é concluído, o que resta é uma estrutura translúcida, espécie de “fantasma” do coração que será transplantado.

Depois disso, é preciso obter células-tronco da pessoa que receberá o transplante. Tais células se caracterizam, de modo geral, pela capacidade de dar origem a diferentes tipos de tecido, mas algumas são mais maleáveis do que outras. As mais promissoras, no longo prazo, são as reprogramadas geneticamente para voltar a um estado semelhante ao embrionário, mas ainda falta muito trabalho para comprovar a segurança e a eficácia delas.

Outras, com capacidades mais modestas, obtidas da medula óssea, talvez já sejam suficientes no caso do coração, segundo indicam os trabalhos da equipe da Ufes. O próprio contato de tais células com a matriz extracelular poderia ser suficiente para direcionar sua especialização, levando à recriação do órgão.

O problema, porém, é o que poderíamos chamar de controle de qualidade do órgão descelularizado. Ainda que o exame visual indique que a matriz extracelular já está totalmente “desnuda”, a prova dos nove tem de vir da análise de DNA: se ainda houver material genético do doador no órgão, problemas de rejeição podem continuar acontecendo. E a análise genética, por demandar a retirada de uma amostra do arcabouço do órgão, pode acabar colocando sua funcionalidade em risco.

Rayssa e seus colegas desenvolveram um método não invasivo para escapar desse dilema. Um sensor óptico usa o padrão de absorção de luz do coração descelularizado para estimar se ele está apto para o transplante, sem sobras de células ou de DNA. A tecnologia rendeu o registro de uma patente e foi premiada pela Swissnex, iniciativa público-privada da Suíça que incentiva a pesquisa e a inovação.

Outros colaboradores do estudo são pesquisadores do Instituto Federal do Espírito Santo e do Instituto de Matemática e Estatística da USP. A empresa

de tecnologia Qualcomm também apoia a pesquisa.

Reinaldo José Lopes

Jornalista especializado em biologia e arqueologia, autor de "1499: O Brasil Antes de Cabral".

ENDEREÇO DA PÁGINA

<https://www1.folha.uol.com.br/colunas/reinaldojoselopes/2018/06/brasileiros-criam-tecnica-que-facilita-remontagem-de-coracao-para-transplante-sem-rejeicao.shtml>

7. Entrevista para CBN Vitória.

GAZETAONLINE

VERSÃO IMPRESSA CLUBE DO ASSINANTE CLASSIFICAÇÕES RÁDIOS CBN ASSINE PESQUISAR

CBN VITÓRIA REPORTAGENS ENTREVISTAS COMENTARISTAS

ESPECIAL
Mês da Mulher

Entrevistas

ENTREVISTA

Pesquisa na Ufes desenvolve sensor óptico para auxiliar transplantes

Equipamento atua na avaliação das células do órgão que será transplantado

Compartilhar: [f](#) [t](#) [in](#)

Publicado em 16/07/2018 às 13h16
Atualizado em 16/07/2018 às 14h53

Fonte: CBN Vitória (92,5 FM)
EDUARDO DIAS

 **Fabio Botacin**
fbotacin@redgazeta.com.br

Um sensor óptico para ajudar a viabilizar o transplante de órgãos com o uso de células-tronco do próprio paciente. Esta é a ideia realizada por meio de uma pesquisa de um grupo de pesquisadores na área de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes). A iniciativa foi premiada na Suíça, quando a doutoranda em Biotecnologia da Universidade, Rayssa Helena Arruda Pereira, participou do evento chamado Academy-Industry Training.

Em entrevista à Rádio CBN Vitória, a pesquisadora explica que a técnica (com sensor óptico) traz um refinamento para os procedimentos de transplante, pois é aplicada ao órgão que será transplantando, mostrando, pela análise da luz, a qualidade das células implantadas por outra técnica. Isso reduz sensivelmente o quadro de rejeição do novo órgão no corpo do receptor. Ouça as explicações na íntegra:

▶ 0:00 / 20:43 ● ◀ ⋮

Temas relacionados: [cbn vitória](#) [a entrevista](#) [biotecnologia](#)

[ufes. vagas](#)

VER COMENTÁRIOS