

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

Maurício Felisberto Borges

**DESCELULARIZAÇÃO E RECELULARIZAÇÃO DE FÍGADOS PARA
ENGENHARIA DE TECIDOS E MEDICINA REGENERATIVA**

Porto Alegre
Outubro, 2018

Maurício Felisberto Borges

**DESCELULARIZAÇÃO E RECELULARIZAÇÃO DE FÍGADOS PARA
ENGENHARIA DE TECIDOS E MEDICINA REGENERATIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pranke
Coorientadora: Dra. Natasha Maurmann

Porto Alegre
Outubro, 2018

Apresentação

A presente dissertação foi desenvolvida no laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no laboratório de Células-tronco do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da mesma universidade. A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), o Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e o Instituto de Pesquisa com Células-Tronco (IPCT) foram os órgãos fomentadores do trabalho.

Agradecimentos

À minha mãe, Mônica Regina Felisberto, que não somente me incentivou a estudar e trilhar meu próprio caminho, como também forneceu as condições para que pudesse fazê-lo.

À minha madrinha de batismo, Andrea Frasson, que me recebeu de braços abertos em Porto Alegre para que eu pudesse cursar minha graduação, longe de casa, e dar continuidade aos estudos quando iniciei o mestrado.

À minha família que sempre me apoiou nas escolhas que eu fiz e sempre torceu pelo meu sucesso.

À minha namorada, Thainá Ferreira Pereira, pelo suporte emocional, pelo incentivo e pelas críticas sempre necessárias.

Aos colegas do laboratório do Instituto de Pesquisa com Células-tronco, que me forneceram ajuda, tanto técnica quanto intelectual, como também nas zoeiras diárias ou mesmo uma palavra amiga oferecida no momento oportuno.

À minha orientadora, Patricia Pranke, que me recebeu com muito entusiasmo, orientou-me, confiou no meu trabalho e possibilitou esta oportunidade de crescer profissionalmente e intelectualmente.

À minha coorientadora, Natasha Mauramann, que me auxiliou, sanou minhas dúvidas, deu-me todo o apoio necessário e tornou esse trabalho possível.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e à UFRGS pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À banca que avalia esta dissertação, pelo tempo e interesse disponibilizados. Aos professores do Programa de Pós-graduação e a todos os professores que tive na minha vida, por se disponibilizarem a compartilhar seus conhecimentos e experiências.

Muito Obrigado!

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Introdução: O único tratamento definitivo para a falência hepática é o transplante, porém existe um déficit muito grande entre o número de órgãos doados e a demanda de pacientes necessitando-os. Em tal contexto, a engenharia de tecidos propõe-se a produzir alternativas viáveis para sanar esse déficit. Uma técnica que vem ganhando destaque é a da descclularização e recelularização de órgãos. Essa técnica cria um *scaffold* natural e acelular e com as características do órgão utilizado, ideal para ser repovoado por células. As células-tronco mesenquimais são uma ótima opção para o repovoamento do órgão, pois apresentam a capacidade de se diferenciar em hepatócitos e tem uma capacidade replicativa alta. **Objetivos:** Descclularizar e recelularizar, com células-tronco mesenquimais isoladas de tecido pulpar de dente decíduo humano, a matriz extracelular de fígados proveniente de ratos, utilizando-se um biorreator produzido no laboratório. **Métodos:** Um biorreator de perfusão foi desenvolvido para utilização nos procedimentos de descclularização e recelularização do fígado. A descclularização dos fígados foi realizada pela a perfusão de uma solução de 0,5% de SDS. A esterilização do *scaffold* foi realizado com uma solução de ácido peracético 0,1% em etanol 4% durante 3h. A matriz foi lavada com PBS com antimicrobianos. A recelularização foi realizada com 10^8 células-tronco mesenquimais isoladas de dente decíduo as quais foram cultivadas durante 7 dias. Foram realizadas análises funcionais e estruturais nas matrizes descclularizadas e recelularizadas. Foram utilizados 4 fígados descclularizados e 5 fígados recelularizados para as análises. **Resultados:** As matrizes descclularizadas mostraram ausência de DNA com preservação do colágeno e dos GAGs, confirmando a eficiência do processo. A recelularização apresentou uma eficiência de retenção de 97% das células inseridas. As análises funcionais mostram que as células continuaram produzindo albumina e ureia na mesma quantidade que as células cultivadas em placa de cultura. Ocorreu um aumento do LDH nos primeiros dias de cultivo, sugerindo que as células morrem nos primeiros dias após a recelularização, mas estabilizam-se aos 7 dias de cultivo. A análise histológica mostrou conservação da trama de colágeno e algumas células agrupadas próximas aos vasos. **Conclusão:** Foi possível a construção e a utilização de um biorreator no laboratório para descclularizar e recelularizar com sucesso fígados de ratos com células-tronco mesenquimais, as quais mantiveram-se vivas e metabolicamente ativas durante 7 dias de cultivo. Apesar de as células, não terem

sido capazes de se diferenciar em hepatócitos, durante o período estudo, sem nenhum estímulo químico, a recelularização dos fígados de ratos foi efetivada, criando uma nova via de pesquisa no laboratório para a construção de órgãos *in vitro*.

ABSTRACT

Introduction: Orthotopic liver transplantation is the only definitive treatment for hepatic failure, but there is a great deficit between the total number of donated organs and the patients in need of them. In such a context, tissue engineering presents itself for producing viable alternatives to eliminate this deficit. One technique gaining the spotlight is organ decellularization and recellularization of organs. This technique creates a natural and acellular scaffold maintaining the native characteristics of the utilized organ, which makes it ideal for the reseeded of cells. Mesenchymal stem cells are a great option for the reseeded of organs as they have the capacity of differentiating into hepatocytes and have a high proliferative rate. **Aims:** Using mesenchymal stem cells isolated from deciduous teeth, decellularize and recellularize the extracellular matrix from rat livers using a perfusion bioreactor constructed in the laboratory. **Methods:** The perfusion bioreactor was made to use in the process of liver decellularization and recellularization. The liver decellularization was made with a 0.5% solution of SDS. The sterilization of the scaffold was made with a 0.1% solution of peracetic acid in 4% ethanol for 3 hours. The matrix was washed in PBS with antibiotics. The recellularization was made with 10^8 mesenchymal stem cells isolated from deciduous teeth pulp and cultivated for 7 days. Functional and structural analyses were made in both matrixes. Four decellularized livers and five recellularized livers were used for the analyses. **Results:** The decellularized matrixes showed an absence of DNA while preserving the qualities of the collagen and the GAGs, thus confirming the efficiency of the process. The recellularization was carried with the retention of 97% of the inserted cells. The functional analyses showed that the cells continued to produce albumin and urea at the same levels as the cells cultivated in the culture plates. A rise in LDH levels occurred in the first days of the culture, suggesting that there is cell death in the first days after recellularization, but they stabilized on the 7th day. Histological analysis showed conservation of the collagen web and some groups of cells next to the vessels. **Conclusion:** The construction and use of a bioreactor in the laboratory to decellularize and recellularize the rat livers with mesenchymal stem

cells was successful. They were able to survive and be metabolically active during the 7 days in culture. Even though the cells were not able to differentiate into hepatocytes during the time of the study without any chemical stimulus, the liver recellularization was carried out with success, creating a new line of research in the laboratory to produce organs *in vitro*.

Lista de Figuras

Figura 1: <i>Scaffolds</i> poliméricos (adaptado de MAURMANN et al., 2017).....	19
Figura 2: Biorreator de perfusão utilizado para avaliar os efeitos dos parâmetros de cultivo na viabilidade e metabolismo celular (Esq.). Câmara de perfusão giratória utilizada para construção de <i>scaffolds</i> vasculares celularizados (Dir.) (adaptado de BRAGHIROLI, 2017).	20
Figura 3: Estrutura do lóbulo hepático (retirado de SILVERTHORN et al., 2010). ...	24
Figura 4. Vascularização do fígado (retirado de NETTER; RIBEIRO; SALLES, 2015).	26
Figura 5: Órgãos de ratos descelularizados. Coração (sup. esq.)(OTT et al., 2008); Fígado (inf. esq.)(UYGUN et al., 2010); Rins (dir.) (ZHANG et al., 2015).	29
Figura 6: Testes clínicos com células-tronco mesenquimais por região no mundo. (Parâmetros de pesquisa utilizados: mesechymal; cells; stromal; stem; acessado em 01/10/2018)	33
Figura 7: Artéria hepática e veia porta (Esq.). Canulação da veia porta com sonda uretral (Dir.) (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).....	40
Figura 8: Esquema do método de perfusão multi-etapa utilizado para recelularização do <i>scaffold</i> descelularizado.	42
Figura 9: Biorreator de perfusão para descelularização e recelularização montado no Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS.	46
Figura 10: Biorreator utilizado para a descelularização da traqueia (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).	47
Figura 11: Caracterização das CTMs. Microfotografias da diferenciação celular. Controles de diferenciação (A, B e C); Diferenciação adipogênica mostrando depósitos de gordura (D), Diferenciação condrogênica mostrando matriz cartilaginosa (E); Diferenciação osteogênica mostrando depósitos de matriz mineralizada (F). Caracterização imunofenotípica das CTM. Baixa expressão (<2%) para CD45 e CD184 (I), CD14 e CD34 (J). Positividade (>99,5%) para CD44 e CD73 (K), CD90 e CD29 (L), CD105 (M). Imagens retiradas do trabalho de conclusão de curso intitulado:	

Avaliação <i>in vitro</i> do comportamento de células-tronco mesenquimais em <i>scaffolds</i> contendo diferentes concentrações de alginato e cloreto de cálcio como estratégia em medicina regenerativa. ALBRECHT, 2017.	48
Figura 12: Evolução da descelularização no tempo e pela troca de reagentes. Fígado fresco recém colocado no biorreator (Esq.). Fígado após 24h de perfusão com H ₂ O (Centro). Fígado após perfusão por 24h com SDS (Dir.) (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).	49
Figura 13: Quantificação de DNA. Os fígados descelularizados apresentaram $84,8 \pm 13,0$ ng/mg de DNA, uma quantidade menor do que 100ng/mg de tecido, o que caracteriza ausência de células, de acordo com a literatura. Os fígados frescos apresentaram $401,6 \pm 34,8$ ng/mg de DNA. Valores expressos em média e desvio padrão, $p < 0,05$	49
Figura 14: Quantificação de glicosaminoglicanos. Os fígados descelularizados mantiveram aproximadamente 50% da quantidade de glicosaminoglicanos ($2,69 \pm 0,01$ µg/mg), encontrados no fígado fresco ($5,41 \pm 0,01$ µg/mg). Valores expressos em média e desvio padrão, $p < 0,05$	50
Figura 15: Quantificação de colágeno. Os fígados descelularizados mostraram aumento na quantidade de colágeno por massa de tecido ($34,76 \pm 0,87$ µg/mg), quando comparado com o fígado fresco ($14,58 \pm 0,30$ µg/mg). Valores expressos em média e desvio padrão, $p < 0,05$	50
Figura 16: Biorreator após cultivo em incubadora celular com apenas meio de cultura, nota-se a manutenção da coloração translúcida do meio, indicando que não houve alteração do pH do meio e nem crescimento de microrganismos (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).	51
Figura 17: Ensaio de LIVE/DEAD após 7 dias de cultura células vivas visualizadas em verde e células mortas visualizadas em vermelho.	52
Figura 18: Fígado descelularizado (Esq.). Fígado recelularizado após 7 dias de cultivo (Dir.) (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).....	52
Figura 19: Resultado das análises funcionais (albumina, ureia e lactato desidrogenase). Dados apresentados em média e desvio padrão. Resultados foram considerados estatisticamente significativos para um $p < 0,05$	53

Figura 20: Cortes histológicos dos fígados fresco, descelularizado e recelularizado (indicados na figura). A ausência de núcleos e manutenção da matriz extracelular pode ser percebida nas imagens do fígado descelularizado. Presença de células (indicada pelas setas) nas imagens do fígado recelularizado. As células foram capazes de migrar dos vasos para o tecido, apesar de se manterem próximas a eles.
.....54

Figura 21: Microscopia eletrônica de varredura das matrizes descelularizadas. Manutenção dos espaços ocupados pelos hepatócitos no emaranhado de tecido conjuntivo (Esq.). Manutenção das fibras e matriz extracelular no parênquima (Dir.).
.....55

Lista de abreviaturas

2D – Duas dimensões

3D – Três dimensões

7AAD – do inglês *7-Amino Actinomycin D*

APC - Alofococianina

AsAP - Ácido ascórbico 2-fosfato

CD11a – do inglês *Cluster of Differentiation 11a*

CD14 – do inglês *Cluster of Differentiation 14*

CD19 – do inglês *Cluster of Differentiation 19*

CD29 – do inglês *Cluster of Differentiation 29*

CD34 – do inglês *Cluster of Differentiation 34*

CD44 – do inglês *Cluster of Differentiation 44*

CD45 – do inglês *Cluster of Differentiation 45*

CD73 – do inglês *Cluster of Differentiation 73*

CD90 – do inglês *Cluster of Differentiation 90*

CD105 – do inglês *Cluster of Differentiation 105*

CD184 – do inglês *Cluster of Differentiation 184*

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CHAPS – do inglês *3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]- 1zpropanesulfonate*

CID-10 – Classificação Internacional de Doenças

CME – Centro de Microscopia Eletrônica

CTE – Células-tronco embrionárias

CTM – Células-tronco mesenquimais

DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA – do inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*

FDA – do inglês *Fluorescein Diacetate*

FITC – do inglês *fluorescein isothiocyanate*

GAG – Glicosaminoglicanos

HLA-DR – do inglês *Human Leukocyte Antigen - antigen D Related*

IBMX – 3-isobutil-1-metilxantina

IP – Iodeto de Propídio

iPSc – do inglês *Induced pluripotent stem cells*

ISCT – do inglês *International Society for Cellular Therapy*

LDH – Lactato desidrogenase

MDF – Matriz descelularizada do fígado

MEC – Matriz extracelular

NK – do inglês *Natural Killer*

PBS – do inglês *Phosphate Buffered Saline* PE – do inglês *phycoerythrin*

(ficoeritrina)

RNA - Ácido ribonucleico

SDS – do inglês *Sodium dodecyl sulfate*

SFB – Soro Fetal Bovino

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Cultivo celular, <i>scaffolds</i> e biorreatores.....	18
2.2 O fígado.....	23
2.2.1 Estrutura e morfologia hepática	23
2.2.2 Funções hepáticas.....	27
2.3 Descelularização e recelularização	28
2.4 Células-tronco	31
3. HIPÓTESE	35
4. OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo Geral	36
4.2 Objetivos Específicos	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1 Montagem do biorreator	37
5.2 Obtenção dos órgãos	37
5.3 Isolamento, cultivo e caracterização das células-tronco mesenquimais..	38
5.3.1 Isolamento das CTMs	38
5.3.2 Caracterização das CTMs	39
5.4 Descelularização e recelularização dos órgãos	40
5.5 Caracterização da matriz descelularizada e da matriz recelularizada	42
5.6 Análise de viabilidade celular	44
5.7 Análise Funcional	44
5.8 Análise estatística.....	45
6. RESULTADOS	46
6.1 Montagem do Biorreator	46
6.2 Isolamento e caracterização das células.....	47

6.3	Descelularização dos órgãos	49
6.4	Recelularização.....	51
6.5	Histologia.....	54
7.	DISCUSSÃO	56
8.	CONCLUSÃO	62
9.	PERSPECTIVAS.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	ANEXO.....	77

1. INTRODUÇÃO

O fígado é o maior órgão sólido do corpo humano, constituindo aproximadamente 2% do total da massa corporal. Esse órgão é responsável por diversas funções metabólicas importantes, incluindo: filtração e armazenamento de sangue; metabolismo de carboidratos, ácidos graxos, proteínas, hormônios e substâncias químicas exógenas; produção de ureia; produção de bile; produção de fatores de coagulação; armazenamento de vitaminas e ferro; produção e armazenamento de glicogênio (HALL; GUYTON, 2017). Considerando que tais funções estão intimamente ligadas à manutenção da homeostase, seu devido funcionamento é indispensável para que exista um mínimo de qualidade de vida.

O fígado é um órgão complexo, segmentado e extremamente vascularizado. Ele recebe sangue por duas vias: pela artéria hepática, que provê sangue rico em oxigênio, e pela veia porta, que carrega o sangue rico em nutrientes e em produtos da degradação da hemoglobina vindos do estômago, intestinos delgado e grosso, pâncreas e baço. Sua unidade básica de funcionamento é o lóbulo hepático. Essas são estruturas circulares irregulares composta pelos hepatócitos, células funcionais do fígado, pelas ramificações da artéria hepática e da veia porta que formam os sinusoides hepáticos, pelos ductos biliares e por células imunes chamadas de células de kupffer (FIOROTTO et al., 2018; BURT; DAY, 2002).

Os hepatócitos são células metabolicamente muito ativas e necessitam de um constante aporte de nutrientes e oxigênio através da circulação, sendo que 70% da superfície dos hepatócitos fica em contato com os sinusoides. Os sinusóides, por sua vez, drenam o sangue para uma veia central que desemboca nas veias cavas e retornam ao coração.

O fígado possui uma alta capacidade regenerativa, porém em casos onde a estrutura da matriz está comprometida, essa capacidade não é suficiente para a manutenção do funcionamento hepático (MICHALOPOULOS, 2017).

De acordo com dados obtidos do DATASUS, ocorreram no Brasil em 2016 39.502 mortes por doenças hepáticas (segundo a classificação do CID-10), representando 3,02% do número total de mortes daquele ano, sendo a 7ª principal causa definida de morte no país. No mesmo ano, o número de internações hospitalares atribuídos a causas hepáticas foi de 74.962 (Portal da Saúde, Ministério da Saúde).

O único tratamento definitivo para falência hepática é o transplante (VILARINHO; LIFTON, 2012). Porém, existe uma escassez de órgãos resultante do pouco número de doadores, oriunda em grande parte da recusa familiar para a doação, bem como do alto número de rejeição de órgãos doados por não cumprirem os critérios de elegibilidade para transplante. Esse fato cria um déficit crescente de pacientes necessitando de transplante a cada ano (TONIUTTO et al., 2017).

Segundo dados da associação brasileira de transplante de órgãos, foram realizados 2.109 transplantes de fígado no país em 2017, enquanto a necessidade estimada foi de 5.172. No mesmo ano, foram contabilizados 10.629 potenciais doadores, dos quais apenas 3.415 tornaram-se doadores efetivos. Os órgãos que não são aproveitados são descartados (Associação Brasileira de Transplante de Órgãos).

A medicina regenerativa entra nesse cenário com a busca de alternativas viáveis para suprir o déficit existente. A engenharia de tecidos, ramo da medicina regenerativa, intenta criar novos tecidos em laboratório a partir de materiais sintéticos ou naturais (STEFFENS et al., 2018). Nesse contexto, a descellularização de tecidos é uma técnica que vem ganhando bastante destaque nos últimos anos, visto que permite o aproveitamento de órgãos que, de outra forma, não teriam nenhuma utilidade (CHANI et al., 2017; GOH et al., 2013; ORLANDO et al., 2012; OTT et al., 2008; PETERSEN et al., 2010; UYGUN et al., 2010).

A técnica consiste em utilizar detergentes, sais, enzimas ou métodos físicos para retirar todo o material celular, mantendo a estrutura micro e macroscópica, a composição bioquímica da matriz extracelular (MEC) e a estrutura vascular e microvascular (TAYLOR et al., 2018). A MEC consiste em sua maior parte de colágeno e outras proteínas estruturais como elastina e fibronectina. Lipídeos e proteoglicanos também fazem parte dessa composição. Esses componentes são essenciais para a promoção do contato célula-célula e célula-matriz (BADYLAK; FREYTES; GILBERT, 2009; FU et al., 2014).

A descellularização cria uma estrutura (*scaffold*) ideal para a semeadura de novas células. As células, que podem ser utilizadas para repovoar a MEC, podem ser originadas de diversas fontes, tais como as células-tronco mesenquimais (CTM) (JI et al., 2012; NAVARRO-TABLEROS et al., 2015; PAN et al., 2016; UYGUN et al., 2010). O uso dessas células oferece a vantagem de poderem ser retiradas do próprio paciente, evitando assim reações imunogênicas ao enxerto criado.

Mimetizar de maneira mais próxima possível as condições fisiológicas encontradas no órgão alvo *in vivo* torna-se uma condição necessária para a promoção de um melhor crescimento e amadurecimento das células, durante e após a recelularização desses *scaffolds*. Dessa forma, a utilização de cultura dinâmica, a qual é realizada em biorreatores, torna-se indispensável no processo (SCARRIT; PASHOS; BUNNELL, 2015).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultivo celular, *scaffolds* e biorreatores

O cultivo celular é uma abordagem bem estabelecida e de uso abrangente na pesquisa biológica, pois permite avaliar interações celulares fora de um corpo vivo, controlando parâmetros experimentais com maior precisão. Partindo do princípio de que as células podem sobreviver fora do corpo, uma vez fornecidos os nutrientes e ambiente necessários, as primeiras técnicas de cultivo celular surgiram há mais de um século. Harison e colaboradores (1907) demonstraram que, além da sobrevivência, as células ainda desempenham suas funções celulares *in vitro*. Iniciava-se uma nova era na pesquisa celular.

Os modelos de cultivo celular tradicionais utilizam-se de ambientes em duas dimensões (2D), onde as células são mantidas em uma superfície plana, embora algumas células ainda sejam cultivadas em suspensão no meio de cultura não aderindo a nenhuma superfície (CUKIERMAN, 2001). Tais modelos, enquanto úteis para estudar interações célula-célula, por exemplo, não são suficientes para reproduzir as intrincadas interações que ocorrem nos organismos vivos. Diante desse problema, os modelos de cultura em três dimensões (3D) surgem como uma alternativa de cultivo (CUKIERMAN, 2001; HOSSEINKHANI et al., 2014).

Para gerar ambientes em 3D, empregam-se técnicas da engenharia para a produção de arcabouços (*scaffolds*) porosos, com tamanhos micrométricos, permitindo assim a migração das células por sua espessura (Figura 1). As técnicas para a produção de *scaffolds* são as mais variadas, entre elas: o *electrospinning*, que produz emaranhados porosos de fibras poliméricas nano ou micrométricas, a reticulação por luz UV, que pode formar géis a partir de polímeros solúveis e a descelularização de órgãos, a qual pode produzir *scaffolds* que mantêm a arquitetura do órgão original (O'BRIEN, 2011). Os materiais utilizados para a produção dos *scaffolds* podem ser tanto sintéticos como naturais (HUBBELL, 1995).

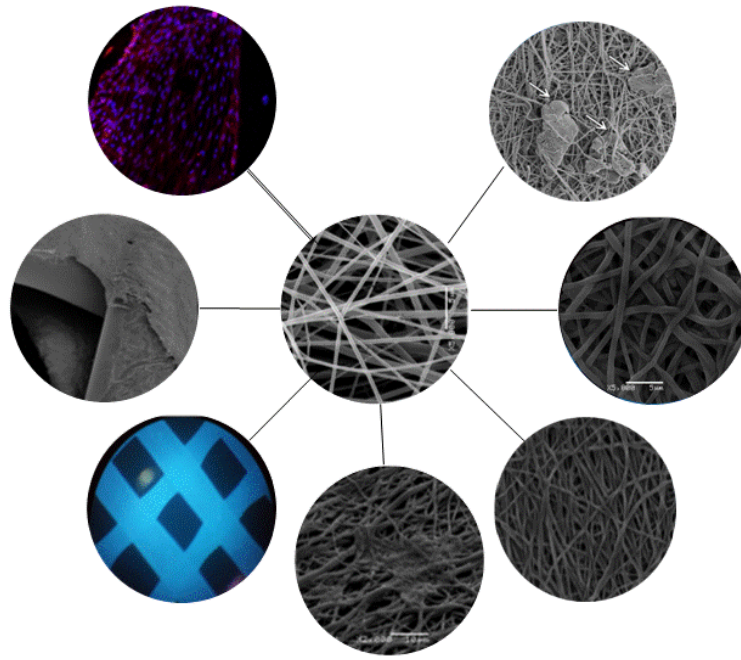


Figura 1: *Scaffolds* poliméricos (adaptado de MAURMANN et al., 2017).

Ainda que as culturas 3D ofereçam um ambiente estrutural mais parecido com o ambiente *in vivo* para as células, favorecendo as interações entre elas (CUKIERMAN, 2001; STEFFENS et al., 2018), os efeitos benéficos provenientes do constante fluxo de líquidos pelo corpo não se faz presente no cultivo estático. Essa espécie de cultivo, no qual as células, tanto no ambiente 2D ou em *scaffolds* (3D), são apenas imersas em meio de cultivo em placas de cultura não gera movimentos dinâmicos dos líquidos de cultura. Sendo assim, o cultivo dinâmico, caracterizado pela aplicação de uma força sobre a cultura de células, torna-se indispensável para mimetizar com maior fidedignidade as condições encontradas *in vivo* (BHUMIRATANA et al., 2014; CHEN; HU, 2006).

Os biorreatores, por sua vez, são aparatos capazes de criar condições dinâmicas de cultivo. Um biorreator pode ser definido, de uma forma geral, como aparelhos onde processos biológicos ou bioquímicos ocorrem sob condições monitoradas e controladas. Tais condições incluem o pH do meio, a temperatura, a pressão, o fornecimento de nutrientes e as trocas gasosas, mas não se limitam apenas a esses parâmetros (MARTIN; WENDT; HEBERER, 2004; SCARRIT; PASHOS; BUNNELL, 2015). A possibilidade de controlar adequadamente os parâmetros dos processos dentro do biorreator permite alta reprodutibilidade e processamento em escalas industriais dos produtos gerados (ZHAO et al., 2016). Os biorreatores já são

utilizados em laboratórios e pela indústria na fermentação, tratamento de resíduos na água, processamento alimentício, cultivo celular e produção farmacêutica de proteínas recombinantes (anticorpos, vacinas, fatores de crescimento e antibióticos) (TIKHOMIROVA; TARASKEVICH; PONOMARENKO, 2018).

Para aplicação na cultura de células e tecidos, existem principalmente duas classes gerais de biorreatores. A primeira classe são biorreatores voltados a analisar variáveis de cultivo e suas interações com as células antes da sua aplicação na engenharia de tecidos. Nesse caso, a estrutura tridimensional dos *scaffolds* não possui grande relevância, visto que seu principal objetivo é avaliar como variações em diferentes parâmetros, tais como o fluxo e a pressão, podem influenciar no crescimento e comportamento celular (FRESHNEY et al., 2007). Tais biorreatores são geralmente utilizados em estudos preliminares na engenharia de tecidos, destinados a definir os parâmetros ideais para a realização dos processos biológicos a que se destinam. Exemplos de biorreatores para essa finalidade já foram utilizados no laboratório para medir, por exemplo, o efeito do estresse de cisalhamento nas células gerado pelo fluxo constante de líquidos (Figura 2) (PAIM et al., 2018a).



Figura 2: Biorreator de perfusão utilizado para avaliar os efeitos dos parâmetros de cultivo na viabilidade e metabolismo celular (Esq.). Câmara de perfusão giratória utilizada para construção de *scaffolds* vasculares celularizados (Dir.) (adaptado de BRAGHIROLI, 2017).

A segunda classe de biorreator é o biorreator de engenharia de tecidos propriamente dito. Esse biorreator é voltado ao desenvolvimento e produção de tecidos para serem utilizados em estudos *in vivo* e para a produção em larga escala destinados à utilização clínica. Nesse caso, quanto mais próxima as condições de cultivo forem das condições fisiológicas, mais próximo o resultado vai ser do tecido original que se pretende reproduzir (FRESHNEY et al., 2007).

Para atingir tal objetivo, o biorreator precisa possuir algumas características específicas, com o propósito de gerar o melhor produto final possível. Cada tecido, ou tipo celular, terá suas particularidades inerentes. Porém, algumas observações podem ser feitas acerca de algumas características gerais. A primeira, e talvez a mais importante, é que ele seja capaz de manter os produtos em condição de esterilidade. Precisa ser capaz de promover um transporte adequado de nutrientes e oxigênio, bem como ser capaz de retirar com eficiência os dejetos metabólicos. É desejável que eles sejam fáceis e rápidos de montar e manusear, possibilitando a produção de seus produtos com rapidez e eficiência. O material utilizado para sua fabricação deve ser ausente de toxicidade e deve ser facilmente lavável e esterilizável, possibilitando a sua reutilização (ZHAO et al., 2016).

Os biorreatores devem também possuir formas de monitoramento dos parâmetros desejados, como, por exemplo, sensores de fluxo, bem como permitir também o seu controle e ajuste. Quanto mais sensível for o controle, melhor será o resultado obtido e sua reprodutibilidade (SANTORO et al., 2010; SHAHIN; DORAN, 2011).

Para manter a esterilidade, o ambiente de cultivo dentro do biorreator deve estar hermeticamente isolado do ambiente externo. Todo o manuseio do aparato deve ser conduzido em ambientes estéreis, como em capelas de fluxo laminar. O emprego de autoclavagem ou de irradiação gama, até mesmo de ambas, é preferível como meio de esterilização, visto que não deixam resíduos químicos que podem provocar toxicidade nas células. Porém, por não serem aplicáveis em alguns casos, o uso de agentes químicos se faz necessário. Um exemplo muito empregado é o ácido peracético, utilizado como método permitido pela legislação vigente, como consta na portaria nº 15/1988 da ANVISA e seus anexos. A suplementação dos meios utilizados com antimicrobianos é desejável para evitar o crescimento de agentes indesejáveis durante o cultivo celular (FIDALGO et al., 2018).

O transporte de massas adequado é fornecido ao tecido em condições fisiológicas pela vasculatura, que provê um sistema de transporte convectivo e de difusão que se adapta às necessidades metabólicas do tecido (MARTIN; VERMETTE, 2005). A melhor forma de reproduzir isso em um biorreator é com a aplicação de sistemas de perfusão. Um sistema de perfusão consiste no uso de uma bomba que propulsione o meio pelo *scaffold*. Esses sistemas garantem uma distribuição homogênea de nutrientes por todo o *scaffold*, garantindo que mesmo as células mais

distantes, dentro da estrutura 3D, recebam o aporte necessário de nutrientes. Além disso, o sistema promove a rápida retirada dos dejetos metabólicos, resultante da ininterrupta atividade celular presente nos cultivos (BHUMIRATANA et al., 2014; RÖDLING et al., 2017; ZHONG, 2010).

Diversos sistemas de funcionamento podem ser empregados em um biorreator para a engenharia de tecidos, entre esses sistemas encontram-se: o de parede rotatória, o de parede membranosa, o de fibra oca, o de recipiente giratório, o de leito rotatório, o de perfusão e o de perfusão associado ao leito rotatório (FRESHNEY et al., 2007; PAIM et al., 2018c).

Os sistemas de perfusão vêm sendo amplamente utilizados na engenharia de tecidos e já provaram promover a proliferação, a diferenciação e a mineralização de células ósseas (BANCROFT et al., 2002), a proliferação de queratinócitos (NAVARRO et al., 2001), o aumento na síntese de albumina por hepatócitos (KIM et al., 2000), o aumento da expressão de marcadores cardíacos em cardiomiócitos (CARRIER et al., 2002) e a síntese e acúmulo de GAGs por condrócitos (DAVISSON; SAH; RATCLIFFE, 2002).

A taxa de fluxo do meio é de grande importância em tais sistemas. O fluxo deve promover um equilíbrio entre a entrega de nutrientes e a remoção de dejetos, enquanto promove a retenção dos componentes da matriz celular recém secretados. O estresse de cisalhamento também deve ser controlado evitando danos excessivos nas células. Nesse contexto os modelos matemáticos e computacionais são uma poderosa ferramenta de auxílio. Tais modelos ajudam a definir os parâmetros a serem utilizados no processo, em função do tamanho do enxerto a ser produzido e da necessidade metabólica dos tipos celulares envolvidos, podendo eliminar, assim, um longo processo de tentativa e erro (CHUNG et al., 2008; MARTIN; WENDT; HEBERER, 2004; PAIM et al., 2018c).

Dependendo da necessidade do tecido a ser estudado, as culturas realizadas em um biorreator ainda podem ser influenciadas por outros parâmetros. Estímulos mecânicos, elétricos ou químicos podem ser exercidos sob as células direcionando a expressão ou a manutenção de fenótipos desejados (BUTLER; GOLDSTEIN; GUILAK, 2000; HRONIK-TUPAJ; KAPLAN, 2012; PARK et al., 2009).

Estímulos elétricos ajudam na maturação de astrócitos ou neurônios, sendo que o valor da frequência aplicada pode definir qual o caminho de diferenciação de células progenitoras (MATOS; CICERONE, 2010). A aplicação de uma corrente

elétrica na forma de pulsos de 1Hz, com intervalo de 2ms entre cada pulso, resultou em uma melhor organização estrutural, alinhamento e sincronidade na contração de cardiomiócitos cultivados *in vitro* (RADISIC et al., 2004).

Já foi demonstrado que forças mecânicas têm grande importância na modulação da sinalização celular, principalmente na formação do tecido musculoesquelético. Condrócitos submetidos a ciclos de compressão expressam um aumento na síntese de proteoglicanos e proteínas de forma dependente da força, duração e frequência dos estímulos (BRADY; WALDMAN; ETHIER, 2015). A aplicação de torsão em cultura de células-tronco da medula óssea favoreceu a diferenciação em linhagens de células de ligamentos alinhadas na direção da força resultante (ALTMAN et al., 2002).

A aplicação de estresse pulsátil em construtos arteriais favorece a formação da parede vascular de forma a mimetizar a parede dos vasos *in vivo*. A rotação dos construtos favorece a distribuição homogênea das células pela parede do vaso produzido (SONG et al., 2012).

Os biorreatores podem ainda ser programados para injetar fatores de crescimento em diferentes concentrações, por diferentes tempos e em diferentes estágios da cultura, criando um gradiente desses fatores (CHUNG et al., 2005). Não obstante, a aplicação em conjunto das diversas técnicas citadas, observando as particularidades do tecido a ser produzido, é capaz de produzir condições fisiológicas e de desenvolvimento mais próximas às naturais, resultando em enxertos mais biologicamente similares e compatíveis.

Desta forma, a interdisciplinaridade aplicada na produção e utilização de biorreatores mostra-se como uma via promissora no desenvolvimento de enxertos funcionais para a substituição e tratamento de tecidos danificados.

2.2 O fígado

2.2.1 Estrutura e morfologia hepática

O fígado é o órgão sólido interno com a maior massa e maior volume do corpo, o que se traduz na sua responsabilidade por diversas funções fisiológicas e bioquímicas.

Estruturalmente, o fígado divide-se em 5 sistemas teciduais: o lóbulo hepático e os hepatócitos, as células hepáticas sinusoidais, o sistema vascular, o sistema biliar e o estroma. A população celular do fígado é diversa, sendo dividida em dois tipos: as células parenquimais, que são os hepatócitos, e as não parenquimais. Os hepatócitos compõem cerca de 80% do volume total do fígado, sendo a principal célula funcional do órgão (ISHIBASHI et al., 2009).

O lóbulo hepático (Figura 3) é a unidade funcional do fígado. Ele consiste em um arranjo hexagonal de hepatócitos formando uma placa de células com uma célula de espessura e contendo cerca de 20 hepatócitos em sua extensão. Entre uma placa e outra, o sangue flui da tríade portal formando os sinusoides hepáticos. A tríade portal é composta por uma veia, uma artéria e um ducto biliar. Uma veia central passa pelo meio dos lóbulos hepáticos drenando o sangue que flui pelos sinusoides (GUMUCIO, 1989; RAPPAPORT et al., 1954).

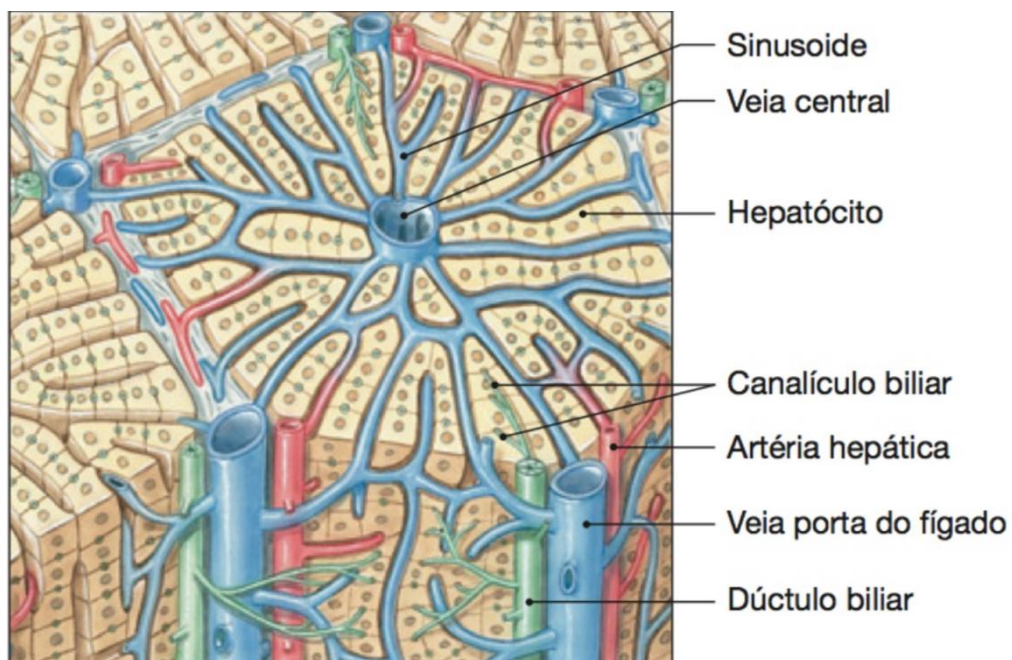


Figura 3: Estrutura do lóbulo hepático (retirado de SILVERTHORN et al., 2010).

Os hepatócitos estão localizados em diferentes locais do lóbulo, entre a tríade portal e a veia central, expressam diferentes genes e desempenham diferentes funções. Essa característica faz com que o sangue seja gradualmente modificado enquanto atravessa o lóbulo hepático permitindo que o fígado exerça sua imensa gama de processos biológicos (ISHIBASHI et al., 2009).

Os hepatócitos possuem elevada atividade metabólica, a qual é suportada por um alto número de mitocôndrias, cerca de 1.000 por célula. Os mesmos possuem 15% do seu volume composto por retículo endoplasmático liso e rugoso e um grande número de lisossomos e peroxissomos (MALARKEY et al., 2005). Em consequência dessa alta atividade, existe uma grande demanda de oxigênio e nutrientes pelas células, por isso os hepatócitos arranjam-se de tal forma que nunca estão a mais de uma célula de distância do aporte sanguíneo e 70% de sua superfície encontra-se em contato com eles (CRAWFORD; BIOULAC-SAGE; HYTIROGLOU, 2018; SILVERTHORN et al., 2010).

Os hepatócitos são responsáveis pela produção da bile, cerca de 15mL/kg/dia em humanos (MALARKEY et al., 2005). A bile é secretada nos canalículos biliares, que fluem paralelos aos sinusoides, porém em sentido contrário ao fluxo sanguíneo. Os canalículos desembocam nos ductos biliares que levam a bile para o intestino delgado e para a vesícula biliar. Com esse sistema, o fígado excreta substâncias nas fezes e participa da digestão fornecendo os ácidos biliares que auxiliam a absorção de gorduras pelo intestino (ISHIBASHI et al., 2009).

O fígado recebe da veia porta sangue rico em nutrientes, vindos do intestino e sangue rico em substâncias secretadas pelo pâncreas e baço, drenado das veias mesentérica, esplênica, gástrica e pancreática. O órgão recebe, pela artéria hepática, o sangue proveniente do coração (Figura 4). Por essas vias, o fígado recebe aproximadamente 25% do débito cardíaco total (CRAWFORD; BIOULAC-SAGE; HYTIROGLOU, 2018; WYNNE et al., 1989).

Dessa forma, a veia porta fornece aproximadamente 70% do sangue hepático contendo 40% do oxigênio entregue ao fígado. Os outros 30% vêm da artéria hepática que também fornece os outros 60% do oxigênio (ISHIBASHI et al., 2009). A artéria hepática e suas ramificações acompanham a veia porta e suas ramificações as quais, junto com os dutos biliares, constituem a chamada tríade portal. Cada tríade, apesar do nome, pode conter de 1 a 2 artérias, 1 veia porta, 1 a 2 ductos biliares, além dos vasos linfáticos e nervos. Cada conjunto é envolvido por tecido conjuntivo primariamente composto por colágeno tipo I (CRAWFORD; BIOULAC-SAGE; HYTIROGLOU, 2018).

O fluxo sinusoidal é extremamente regulado e é coletado nas veias centrais dos lóbulos hepáticos que liberam seu fluxo em vasos maiores até finalmente desembocar na veia cava (EKATAKSIN; KANEDA, 1999; MCCUSKEY, 2000).

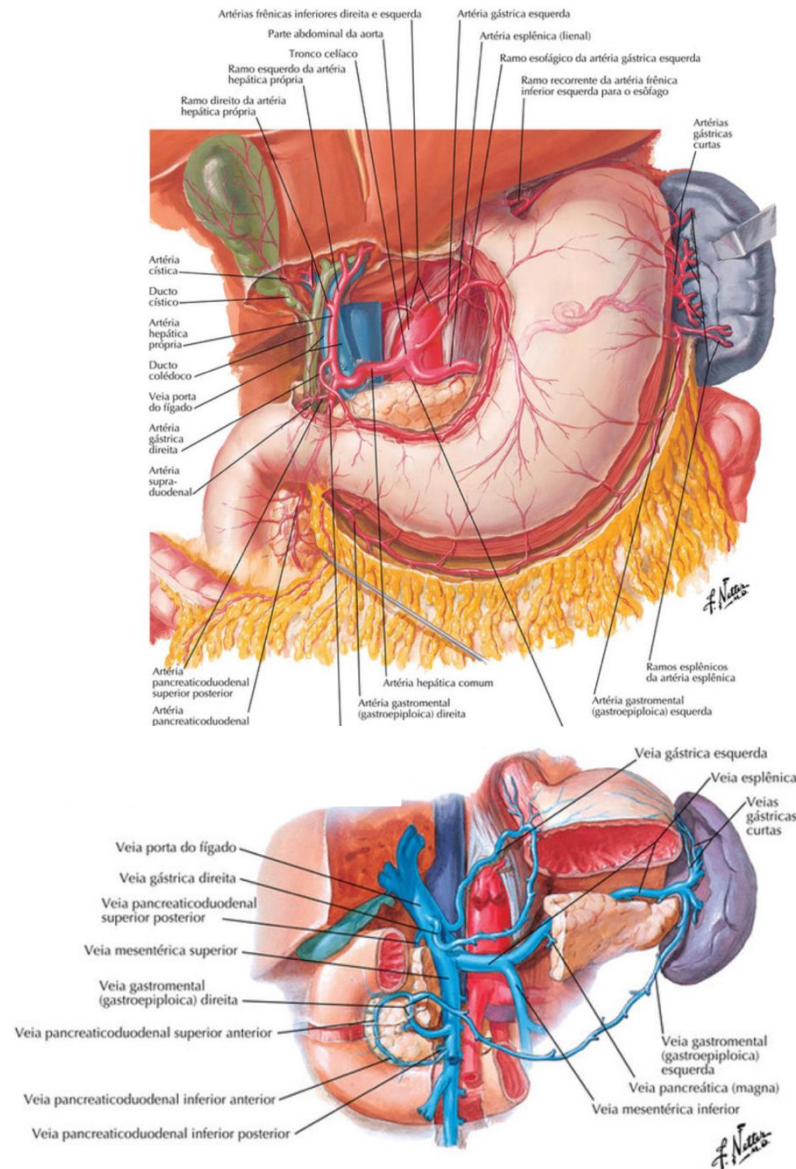


Figura 4. Vascularização do fígado (retirado de NETTER; RIBEIRO; SALLES, 2015).

A linfa acumula-se no espaço que existe entre os hepatócitos e as células epiteliais dos sinusoides, chamado espaço de Disse, antes de drenar para o ducto linfático torácico pelos vasos linfáticos.

As células não parenquimais, também chamadas de células sinusoidais hepáticas por habitarem os sinusoides hepático, englobam as células de Kupffer, as células endoteliais, as células estreladas (células armazenadoras de gordura, também chamadas de células Ito) e os linfócitos *natural killer* (NK), que por serem residentes no fígado, também são chamados de “*pit cells*” e se localizam na superfície dos fibroblastos, abaixo das células endoteliais dos vasos. (ISHIBASHI et al., 2009; MALARKEY et al., 2005).

As células endoteliais formam a parede dos sinusoides, os quais possuem fenestrações permitindo a troca de substâncias entre o sinusoide e o espaço de Disse. As células de Kupffer são os macrófagos residentes do fígado, responsáveis por remover partículas grandes da circulação por fagocitose e por produzir citocinas, agindo como mediadores da inflamação. As células estreladas armazenam e metabolizam a vitamina A e os lipídeos, produzem e secretam matriz extracelular e possuem importante participação na formação de fibrose formada na injúria hepática. (CRAWFORD; BIOULAC-SAGE; HYTIROGLOU, 2018; MALARKEY et al., 2005; SILVERTHORN et al., 2010).

2.2.2 Funções hepáticas

O fígado é responsável pelo controle e regulação dos níveis de glicose no corpo. Essa regulação envolve três processos: a produção de glicogênio, através da glicose circulante e seu armazenamento, a glicogenólise, que é a reação da quebra da molécula do glicogênio armazenado em glicose e sua liberação na circulação e pela síntese de glicose, a partir de precursores não carboidratos como ácidos graxos e aminoácidos, chamada gliconeogênese (HALL; GUYTON, 2017).

Os lipídeos sofrem oxidação nesse órgão, onde também os triglicerídeos são metabolizados para produzirem energia. O fígado ainda regula a desaminação e transaminação de aminoácidos e regula a remoção de amônia pela síntese da ureia, sendo responsável pelo ciclo da ureia no corpo humano (SILVERTHORN et al., 2010).

A albumina, a principal proteína carreadora na circulação, tem sua síntese realizada no fígado, responsável também pela síntese de diversos fatores de coagulação. A metabolização das toxinas e fármacos que são ingeridos é um processo hepático, ocorrendo através principalmente das enzimas que compõem o complexo do citocromo P450 (HALL; GUYTON, 2017; SILVERTHORN et al., 2010).

O fígado possui a propriedade única entre os órgãos internos de se regenerar espontaneamente na ocorrência de redução tecidual hepática. Em resposta a danos agudos, os hepatócitos, células maduras e quiescentes, passam a expressar genes do ciclo celular e dividem-se sincronizadamente, enquanto ainda expressam os genes necessários para desempenhar suas funções metabólicas, ou seja, a divisão celular sucede sem detrimento da função hepática. Essa replicação dos hepatócitos é seguida da replicação coordenada das células não parenquimais, levando a uma

rápida reposição da massa hepática. Porém, doenças que levam a alterações estruturais, como a cirrose, não permitem a restauração da arquitetura e funcionamento normal do fígado (MICHALOPOULOS, 2017; OGOKE; OLUWOLE; PARASHURAMA, 2017).

O fígado humano possui aproximadamente 2×10^{11} hepatócitos, uma densidade elevada de células. Entretanto, o fígado ainda consegue desempenhar suas funções com apenas 10% desse valor (OGOKE; OLUWOLE; PARASHURAMA, 2017; SOHLENIUS-STERNBECK, 2006).

A alta complexidade estrutural e funcional do fígado, bem como a necessidade da manutenção da quantidade mínima de suas células são aspectos que devem ser considerados quando objetiva-se construir estratégias para a regeneração do fígado.

2.3 Descelularização e recelularização

A descelularização de tecidos e órgãos vem sendo amplamente utilizada na engenharia de tecidos, pois é uma técnica que permite criar um *scaffold* natural. Esse *scaffold* natural deve manter a composição geral do tecido, mantendo também os elementos da macro e microarquitetura e suas propriedades mecânicas como a força tênsil do tecido. Em tecidos vascularizados, o processo de descelularização é capaz de preservar a árvore vascular e suas ramificações mais internas (TAYLOR et al., 2018).

A técnica de descelularização consiste na utilização de substâncias capazes de remover as células do tecido alvo preservando a integridade da MEC. Diversos métodos e substâncias foram investigados com esse propósito e podem ser divididos em duas categorias: métodos físicos e métodos químico-biológicos (SHAKOURI-MOTLAGH et al., 2017).

Os métodos físicos de descelularização incluem ciclos de congelamento e descongelamento, agitação ou sonicação aplicados em imersão em agentes químicos, aplicação de ciclos de pressão e o uso de fluidos supercríticos. Embora esses métodos sejam eficientes em promover a remoção do material celular, os mesmos provocam uma alta taxa de danificação da ultraestrutura da MEC e alteração das propriedades mecânicas dos *scaffolds* (GILPIN; YANG, 2017; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015; TAYLOR et al., 2018).

Os métodos químico-biológicos incluem os métodos enzimáticos, que consistem no uso de enzimas específicas: nucleases, proteases, colagenases, para provocar a ruptura das interações entre as células e a matriz e entre as interações célula-célula. O emprego de soluções ácidas ou alcalinas, álcoois ou detergentes iônicos ou não-iônicos para causar a ruptura celular e sua remoção também fazem parte dessa categoria. A utilização de soluções ácidas ou alcalinas e de álcoois causam degradação de proteínas fibrilares e rompem interações moleculares entre as proteínas residuais da matriz (GILPIN; YANG, 2017; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015; TAYLOR et al., 2018). A utilização de detergentes iônicos e não iônicos, quando perfundidos pela vasculatura nativa do órgão, provaram ser o melhor método até o momento para realizar a descelularização de órgãos inteiros. Esse método consegue eliminar o material celular com grande eficiência, enquanto mantém a quantidade de colágeno inalterada e preserva a ultraestrutura, as propriedades mecânicas e parte das proteínas funcionais da matriz. Os detergentes mais utilizados são o dodecil sulfato de sódio (SDS), o deoxicolato de sódio como detergentes iônicos, o Triton-X 100 como detergente não iônico e o detergente zwitterionico 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1zpropanesulfonate (CHAPS) (GILPIN; YANG, 2017; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015; TAYLOR et al., 2018).

O primeiro órgão a ser completamente descelularizado por perfusão foi um coração de rato (OTT et al., 2008). Desde então, diversos órgãos como pulmão (PETERSEN et al., 2010), rins (SULLIVAN et al., 2012), pâncreas (GURUSWAMY DAMODARAN; VERMETTE, 2018) e fígado (UYGUN et al., 2010) já foram submetidos, com sucesso, por esse procedimento. Não apenas órgãos oriundos de ratos, mas de suínos e também de humanos (MAZZA et al., 2015) já foram submetidos ao processo descelularização por perfusão.

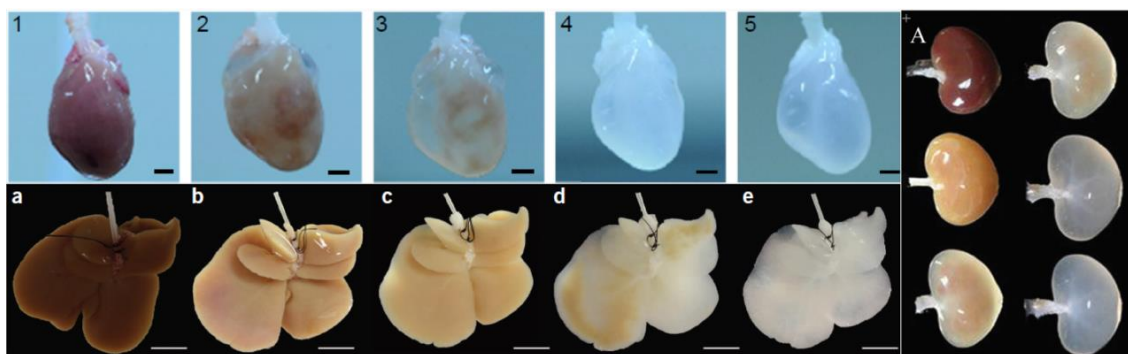


Figura 5: Órgãos de ratos descelularizados. Coração (sup. esq.)(OTT et al., 2008); Fígado (inf. esq.)(UYGUN et al., 2010); Rins (dir.) (ZHANG et al., 2015).

A recelularização, por sua vez, consiste na repopulação do *scaffold* por células cultivadas em laboratório. Para que o procedimento tenha sucesso é necessário, além do *scaffold* manter a sua composição natural e a estrutura tridimensional do órgão desejado, a escolha dos tipos celulares corretos, um método eficiente de semeadura dessas células, bem como de um ambiente de cultivo celular o mais similar possível ao fisiológico (STEFFENS et al., 2018).

As células progenitoras fetais, que possuem alta capacidade proliferativa e são capazes de se tornar células adultas do tecido que originam, já foram testadas com sucesso para o processo de recelularização (SABETKISH et al., 2015; SONG et al., 2012; WANG et al., 2014). Células progenitoras fetais de ratos foram capazes de desempenhar funções fisiológicas, como a troca gasosa em pulmões recelularizados (OTT et al., 2010). Apesar do fato dessas células apresentarem evidência da capacidade de reestabelecimento da função celular em *scaffolds* descelularizados, tais células não são as mais desejáveis para a aplicação clínica, devido a preocupações éticas advindas da obtenção dessas células, as quais como o nome sugere são isoladas de fetos (SCARRIT; PASHOS; BUNNELL, 2015).

As células adultas provenientes de cultura primária, outra candidata a serem usadas no processo de recelularização, apresentam a vantagem de já estarem diferenciadas e expressando os genes necessários para desempenhar as funções do tecido de origem (O'NEILL et al., 2013; OTT et al., 2008; UYGUN et al., 2010). Porém, essas células são geralmente obtidas ou de biopsias do órgão do paciente ou de órgãos doadores (PALAKKAN et al., 2013). No primeiro caso, um defeito genético nas células inviabilizaria o seu uso. Já no segundo caso, há o problema da rejeição imunológica do órgão doado. Somando-se isso ao fato dessas células possuírem baixa capacidade proliferativa, sua aplicação clínica torna-se bastante limitada (SCARRIT; PASHOS; BUNNELL, 2015).

Hepatócitos adultos, em contrapartida, por possuírem alta capacidade proliferativa, apresentam uma alternativa ainda viável para a clínica. Porém, apresentam uma deterioração da sua função, quando cultivados em métodos tradicionais (WALLDORF et al., 2004), o que é evitado quando cultivados em *scaffolds* descelularizados (UYGUN et al., 2010; YAGI et al., 2013). Além disso, a perfusão de sangue em *scaffolds* recelularizados com hepatócitos primários e sua subsequente implantação em vivo mostrou que esses enxertos mantêm-se funcionais, com alta taxa

de sobrevivência dos hepatócitos e mínimo dano isquêmico no tecido (UYGUN et al., 2010).

Outro grupo de células que apresentam utilidade para a recelularização são as células-tronco. Essas células, que possuem alta capacidade proliferativa e podem se diferenciar nos tipos celulares desejados, são as mais utilizadas em estudos de recelularização por sua inerente vantagem aos demais tipos celulares (MIZUKAMI; SWIECH, 2018). As matrizes descelularizadas, por sua vez, facilitam a diferenciação dessas células (SHAKOURI-MOTLAGH et al., 2017). A utilização dessas células e suas características serão discutidas adiante em um item específico.

Outro desafio da recelularização é reestabelecer a função vascular dos tecidos. Os vasos possuem uma estrutura própria de células epiteliais e células musculares lisas, que fornecem a barreira e os meios de controle do fluxo sanguíneo. A estrutura ainda precisa manter as fenestrações capilares que permitem as trocas de gases e nutrientes nos tecidos (PELLEGATA; TEDESCHI; DE COPPI, 2018). A recelularização de fígados com células epiteliais mostrou que essas células são capazes de se organizar ao redor dos vasos e manter as fenestrações nos capilares (KOJIMA et al., 2018; SULLIVAN et al., 2012).

A utilização de diferentes tipos celulares para a recelularização de cada estrutura interna diferente do órgão vem sendo utilizada com frequência, mostrando que a tarefa de produzir órgãos em laboratórios é extremamente complexa. Apesar de grandes avanços terem sido alcançados na área, ainda há muito a se elucidar antes de resolver o problema da falta de órgãos para os transplantes.

2.4 Células-tronco

As células-tronco são células não especializadas, não comprometidas ou pouco comprometidas com alguma linhagem celular e, não existindo estímulos contrários, possuem a capacidade de se replicarem indefinidamente sem mudança no seu fenótipo. Quando são adicionados estímulos favoráveis, essas células podem mudar sua expressão gênica e se diferenciar em diversos tipos de células adultas (WEI et al., 2013).

As células-tronco dividem-se de acordo com sua capacidade de diferenciação em: totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As totipotentes são células-tronco embrionárias (CTE) retiradas do oócito recém-fecundado até 3 dias após a

fecundação, e podem originar todos os tipos celulares adultos mais os anexos embrionários. As células-tronco pluripotentes podem ser também as CTEs extraídas da massa interna do blastocisto, correspondendo ao quarto e quinto dia após a fecundação, ou células pluripotentes induzidas (do inglês iPSCs– *induced pluripotent stem cells*), que são células adultas retornadas a um estado de pluripotência por meio de manipulação gênica. Essas células podem gerar qualquer tipo de célula adulta, menos os anexos embrionários (YU; THOMSON, 2008). As iPSC foram produzidas pela primeira vez por Yamanaka e colaboradores, o que lhe rendeu o prêmio Nobel de medicina em 2012 (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

As células-tronco multipotentes, que incluem as células-tronco adultas podem gerar um número de células adultas correspondentes ao seu folheto embrionário de origem. Essas células estão presentes nos tecidos já formados e desenvolvidos do corpo humano e normalmente servem para reparação tecidual (PAIM et al., 2018b).

Por residirem nos órgãos ou tecidos já formados do corpo, as células-tronco adultas, podem ser retiradas do próprio paciente evitando os riscos provenientes da rejeição imunológica que pode ocorrer nesse tipo de tratamento, tornando-se atrativas como alternativa para o uso na terapia celular e na engenharia de tecidos.

As células-tronco adultas mais utilizadas na clínica são as células-tronco hematopoéticas. Elas foram as primeiras células-tronco a serem descobertas e são transplantadas com altas taxas de sucesso no tratamento de leucemias, linfomas e diversas outras doenças hematológicas ou não.

Outra população de células-tronco adultas que têm despertado o interesse de pesquisadores são as células-tronco mesenquimais. Essas células são encontradas em diversos tecidos do corpo-humano como tecido adiposo, tecido ósseo, polpa dentária (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008) entre outros e podem se diferenciar além dos tipos celulares mesenquimais (adipócitos, condrócitos e osteócitos), em outros tipos celulares como cardiomiócitos, fibroblastos e hepatócitos (PITTENGER et al., 1999).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) foram primeiro descritas por Friedenstein e colaboradores, em 1974 (FRIEDENSTEIN et al., 1974). Desde então, o interesse nessas células, que representam apenas 0,01% a 0,001% das células nucleadas da medula óssea, vem crescendo (SALEM; THIEMERMANN, 2010). Uma busca rápida no site *clinicaltrials.gov* mostra que existem 1.039 estudos clínicos que utilizam CTMs, sendo que a maior parte ocorre na China e Estados Unidos (Figura 6).

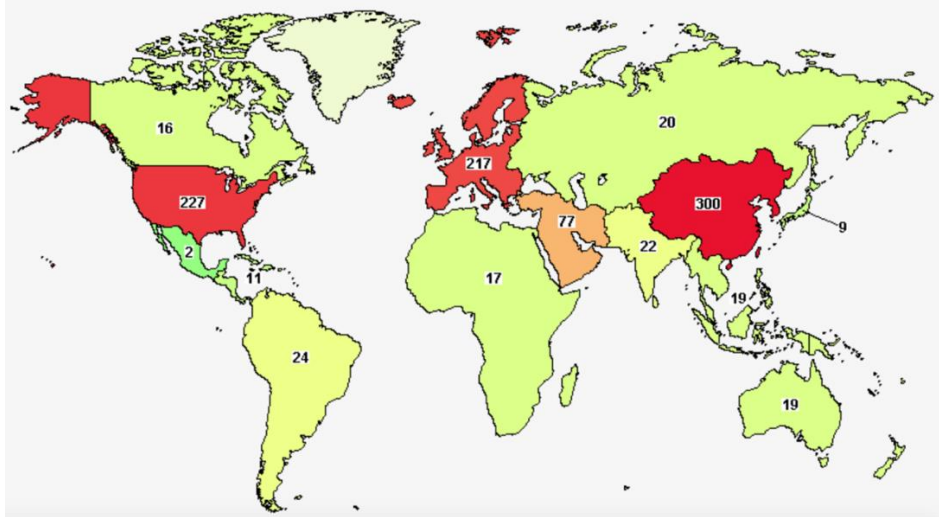


Figura 6: Testes clínicos com células-tronco mesenquimais por região no mundo. (Parâmetros de pesquisa utilizados: mesechymal; cells; stromal; stem; acessado em 01/10/2018)

As CTMs podem ser facilmente isoladas do tecido do qual fazem parte, tais como medula óssea, produto de lipoaspirado, entre outras fontes. As mesmas podem ser expandidas em culturas em até 40 duplicações em pouco tempo, cerca de 8 a 10 semanas. Porém os diferentes métodos de isolamento e cultivo, como também suas diferentes origens, levam a diferenças de fenótipos nas células isoladas (SALEM; THIEMERMANN, 2010).

A dificuldade em identificar as CTMs levou a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) a estabelecer critérios mínimos para a caracterização de uma população de CTMs. Os critérios definidos são: aderência ao plástico em condições padrão de cultura; expressão positiva dos marcadores celulares CD73, CD90 e CD105, concomitante à ausência de expressão dos marcadores de superfície hematopoéticos, tais como CD34, CD45, CD11a, CD19 e HLA-DR; e capacidade de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos, sobre estímulos específicos *in vitro*. Também existe a recomendação de se utilizar na nomenclatura a origem das células, como por exemplo caso extraídas do tecido adiposo nomeá-las CTMs derivadas do tecido adiposo (HORWITZ et al., 2005)¹.

Uma das propriedades inerentes dessas células, que as tornam atrativas para o tratamento clínico, é sua capacidade para se dirigir ao local de inflamação que

¹ A ISCT também preconiza o uso da nomenclatura células estromais mesenquimais, mantendo o acrônimo MSC (do inglês mesenchymal stem cells ou mesenchymal stromal cells), porém para esse trabalho o termo células-tronco mesenquimais foi utilizado mantendo a padronização existente no laboratório de hematologia e células-tronco da UFRGS.

sucedo o dano tecidual, garantindo que elas possam exercer seus efeitos nos locais desejados (CHAPEL et al., 2003).

Entre os efeitos que as células-tronco exercem estão os anti-inflamatórios e imunossupressores, que em conjunto com sinalizações parácrinas emitidas por essas células, podem atenuar os efeitos maléficos da inflamação após uma lesão, bem como direcionar a regeneração e o crescimento das células adjacentes ao sítio lesionado (CHAMBERLAIN et al., 2007).

A facilidade de isolamento e cultivo, a alta plasticidade dessas células, sua capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares as torna, além de boas candidatas para uso em terapia celular, ótimas candidatas para o uso na engenharia de tecidos. Soma-se isso ao fato de poderem ser isoladas de tecidos do próprio paciente, existindo a possibilidade da criação de enxertos funcionais que não causam rejeição do hospedeiro. Porém, para alcançar esse objetivo é necessário utilizar as CTMs em associação com outras técnicas da engenharia de tecidos. Por exemplo cultivá-las em um *scaffold* que dê a sustentação e o microambiente necessários para seu crescimento e diferenciação em conjunto com a aplicação de fatores químicos que promovam seu crescimento e diferenciação nos tipos celulares desejados. A descelularização de órgãos pode fornecer um *scaffold* ideal para a construção do órgão desejado, e que também já possui alguns desses fatores químicos em sua composição.

Muito já foi elucidado sobre a capacidade regenerativa das CTMs, mas muito conhecimento ainda precisa ser gerado até que possamos produzir um órgão funcional em laboratório com as células do próprio paciente.

3. HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que é possível obter um enxerto hepático funcional por meio da descelularização e subsequente recelularização de fígados de ratos, utilizando-se células-tronco mesenquimais isoladas de tecido pulpar de dente decíduo humano, através de sistema dinâmico, utilizando-se um biorreator construído no laboratório.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Descelularizar e recelularizar, com células-tronco mesenquimais proveniente de tecido pulpar de dente decíduo humano, a matriz extracelular de fígados provenientes de ratos, utilizando-se um biorreator produzido no laboratório.

4.2 Objetivos Específicos

- Montar um biorreator de perfusão para a descelularização e recelularização de órgãos
- Descelularizar fígados de rato no biorreator
- Recelularizar com células-tronco mesenquimais, no biorreator, fígados de rato descelularizados
- Cultivar no biorreator fígados de rato recelularizados durante 7 dias

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Montagem do biorreator

Visando o fortalecimento e a formação de parcerias com a indústria tecnológica brasileira, a montagem do biorreator, o treinamento e capacitação para seu uso realizou-se em conjunto com a empresa *Eva Scientific*, localizada no parque tecnológico de Sorocaba - SP. A empresa possui experiência na montagem e capacitação do uso de biorreatores para diversos propósitos em cultivo celular (KAASI et al., 2011). O biorreator utilizado no projeto foi montado utilizando-se de componentes presentes no laboratório.

Um recipiente de vidro graduado, com capacidade para um litro foi utilizado como câmara de órgão, onde o órgão em procedimento foi mantido submerso nas soluções de trabalho (Figura 9). A tampa utilizada possui 4 entradas para mangueiras, podendo ter o diâmetro de entrada variado conforme a necessidade. Para o fígado, foram utilizadas mangueiras de silicone de 6mm de diâmetro externo e 3mm de diâmetro interno. Uma entrada foi utilizada para a passagem do líquido para dentro da câmara e outra entrada para sua retirada. Das duas entradas restantes, uma foi utilizada como entrada de ar e, para que fosse mantida a esterilidade nela, uma mangueira contendo um filtro de 0,22 μ m na ponta externa foi empregada. A última abertura permaneceu fechada.

Conectores espiga de tamanho adequado foram utilizados para fazer as ligações necessárias entre as mangueiras e o órgão. Uma torneira *luer lock* de três entradas foi colocada entre dois segmentos de mangueira externamente à câmara de órgão fornecendo um meio de entrada para as células. Uma bomba peristáltica foi utilizada para gerar a força motriz propulsora do líquido pelo aparato.

O biorreator foi utilizado para descelularizar fígados de ratos e também traqueias de porco, para testar sua capacidade com diferentes órgãos.

5.2 Obtenção dos órgãos

Os fígados submetidos ao processo de descelularização e recelularização, bem como aqueles utilizados como controle, foram obtidos de ratos Wistar eutanasiados provenientes de outros projetos em andamento no laboratório de hematologia e

células-tronco já aprovados pelo CEUA, respeitando, dessa forma, a diretriz de reduzir o número de animais utilizados em pesquisa. De acordo com resolução do CEUA, por se tratar de material cadavérico e não existir nenhuma intervenção com os animais, não é necessária a submissão do projeto ao comitê de ética.

Os animais, após eutanasiados, tiveram seu abdômen aberto e o fígado retirado, tomando-se a precaução de manter bem conservada a totalidade da veia porta. Após retirados, os fígados foram lavados com PBS contendo 2mM de EDTA para evitar a coagulação e então congelados em freezer a -80°C.

As traqueias utilizadas foram obtidas de um abatedouro de animais para o consumo. Por se tratar de material cadavérico e não existir nenhuma intervenção com os animais, não foi necessária a submissão do projeto ao comitê de ética.

5.3 Isolamento, cultivo e caracterização das células-tronco mesenquimais

5.3.1 Isolamento das CTMs

A obtenção das CTMs foi realizada a partir do isolamento da polpa de dentes decíduos de pacientes submetidos à extração como designado pelo dentista responsável pelo tratamento da criança. A assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foi realizada pelo responsável pela criança após aprovação no Comitê de Ética (CAAE nº. 68383417.0.0000.5347, ANEXO 1).

Após a extração, os dentes foram colocados em recipientes contendo meio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco de baixa glicose (DMEM). O material foi então transportado para o laboratório para o processamento.

Em capela de fluxo laminar, a polpa do dente foi extraída, macerada e incubada por 60min a 37°C em tampão contendo 0,2% de colagenase tipo 1 (Gibco). Após esse tempo a suspensão resultante foi centrifugada a 800g por 10 minutos e o *pellet* foi colocado em meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina (P/E) e cultivado em placas de 12 poços. Ao atingir 90% da confluência, foi realizada a primeira passagem utilizando-se uma solução 0,5% de tripsina-EDTA para soltar as células da superfície do poço (BERNARDI et al., 2011).

5.3.2 Caracterização das CTMs

As células foram caracterizadas na quinta passagem por sua morfologia, capacidade de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos e por imunofenotipagem através de citometria de fluxo.

A morfologia foi analisada em microscópio de ótico de luz invertida com contraste de fase para comprovar a aderência celular ao plástico e morfologia alongada fibroblastoide das células.

A diferenciação celular foi realizada submetendo as células ao cultivo com meios de diferenciação. Para a diferenciação osteogênica, as células foram cultivadas em meio DMEM com baixa glicose suplementado com 15% de SFB, 1% de P/E, 50 μ M de ácido ascórbico 2-fosfato (AsAP), 15mM de β -glicerolfosfato e 0,1 μ M de dexametasona. Após 25 dias, a diferenciação osteogênica foi confirmada pela coloração com *alizarin Red*, que identifica em vermelho a deposição de nódulos de cálcio.

Para a diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de P/E, 0,01mg/mL de insulina humana recombinante, 5,5 μ g/mL de transferrina humana e 5ng/mL de selenito de sódio, 10ng/mL de TGF beta1 e 50nM de AsAP. Após 30 dias, a diferenciação foi confirmada com *alcian blue* que confere uma cor azul para os glicosaminoglicanos produzidos pelos condrócitos.

Para a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de P/E, 0,5mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 1 μ M de dexametasona, 1,74 μ M de insulina, 50 μ M de indometacina e 1 μ M de rosiglitazona. Após 30 dias a diferenciação foi confirmada com *oil red* que cora de vermelho as gotículas de gordura presentes nas células.

A citometria de fluxo foi utilizada para realizar a imunofenotipagem das células, utilizando-se dos marcadores de células mesenquimais CD29, CD44, CD73 CD90 e CD105, e os marcadores de células hematopoiéticas CD14, CD34, CD45 e CD184.

As células mantidas em cultivo foram dissociadas utilizando-se uma solução de 0,5% de tripsina-EDTA. As células foram incubadas durante 30 min ao abrigo da luz e em temperatura ambiente com 2 μ L de anticorpo monoclonal anti-humano conjugados com ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC) e alofocianina (APC) (Pharmingen, Becton Dickinson, San Jose, CA) para cada uma das moléculas

citadas. Após esse período, as células foram lavadas e suspensas em 1 mL de PBS. Para que apenas as células vivas fossem consideradas, as células foram incubadas por 15min em uma concentração de 1µg/mL de 7-aminoactinomicina D (7AAD) (Molecular Probes, Eugene), desconsiderando as células positivas para 7AAD.

As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSAria III (BD Biosciences). Utilizou-se 10.000 eventos para a aquisição de dados de cada amostra, e para o ajuste de fluorescência foram utilizados os controles isotípicos para FITC, PE e APC. A análise dos dados foi realizada com auxílio do software FACSDiva versão 6.0 (BD Biosciences) (ANDRADE et al., 2017; BRAGHIROLI et al., 2013; MAURMANN et al., 2017; STEFFENS et al., 2013).

5.4 Descelularização e recelularização dos órgãos

Os órgãos congelados foram descongelados em capela de fluxo laminar sob luz UV por no mínimo 3h. Após o descongelamento, sempre trabalhando dentro da capela de fluxo laminar, a veia cava superior foi canulada com uma sonda uretral de plástico 6fr (Figura 7). A escolha do material para o procedimento ocorreu após realizados testes com diferentes candidatos. Foram utilizadas agulhas de seringa dos diâmetros 21G, 18G e 16G bem como sondas uretrais de plástico dos diâmetros de 4fr e 6fr. Para firmar a sonda foi utilizado fio de sutura de nylon 0-2. A sonda uretral foi ligada por um conector espiga a uma mangueira de silicone fazendo passagem por uma das entradas da tampa da câmara de órgão e ligada a bomba peristáltica do biorreator.



Figura 7: Artéria hepática e veia porta (Esq.). Canulação da veia porta com sonda uretral (Dir.) (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

A câmara de órgão foi preenchida com H₂O destilada. Uma outra mangueira, que serviu para a remoção do líquido da câmara, foi colocada em uma das entradas da tampa e imersa na câmara de órgão.

Após fechar a câmara de órgão, a bomba peristáltica foi ligada com uma taxa de fluxo de 5mL/min, taxa inferior ao fluxo regular ao qual o fígado do rato está sujeito em condições fisiológicas. Tal escolha justificou-se pela necessidade de minimizar os danos físicos à matriz durante o procedimento, enquanto se mantêm os parâmetros necessários para que a troca de massas seja suficiente.

O protocolo de descelularização foi padronizado a fim de obter o protocolo que removesse o material celular do órgão em menos tempo e possuísse o menor potencial de dano à MEC. O protocolo final utilizado para o processo foi a perfusão por 24h com H₂O destilada e 24h de uma solução com 0,5% de SDS diluído em H₂O destilada, seguido por mais 24h H₂O destilada.

Após a descelularização a matriz descelularizada do fígado (MDF) foi submetida a um procedimento de esterilização. Testes com diferentes métodos resultaram na utilização de uma solução de ácido peracético 0,1% em etanol 4% durante 3h, a qual foi perfundida pelo órgão da mesma maneira já mencionada. Após esse procedimento, a MDF foi lavada por 24h com PBS contendo anfotericina, penicilina e estreptomicina na concentração de 1% e gentamicina na concentração de 0,4µg/mL. A esterilização da MDF foi realizada em capela de fluxo laminar com luz UV.

Os componentes do biorreator foram todos autoclavados em 120°C antes da descelularização. Entre a descelularização e a recelularização ocorreu uma outra autoclavagem. Entre os procedimentos, a MDF foi mantida submersa em PBS e antimicrobianos na capela de fluxo laminar e luz UV.

Para a recelularização, a MDF, após esterilizada, foi submetida a perfusão de meio de cultura DMEM contendo anfotericina, penicilina e estreptomicina na concentração de 1% e gentamicina na concentração de 0,4µg/mL, por 24h. Esse procedimento serviu tanto para ambientar o órgão para receber as células como para confirmar a esterilização através da análise da turbidez e pela cultura de 200µL do meio em placas de ágar sangue e ágar sabouraud.

A semeadura das células foi conduzida em 4 intervalos de 10min (Figura 8). A cada intervalo, foi semeada uma quantidade de 25 milhões de células totalizando 100 milhões de células, o equivalente a 20% do número total de células do fígado de um

rato (UGYUN, 2010). Após a semeadura, o perfusato restante foi coletado para contagem de células não retidas em câmara de Neubauer com azul de tripan. O biorreator foi colocado na incubadora a 37°C e 5% CO₂. O órgão foi mantido em cultivo durante 7 dias em 100mL de meio, com perfusão constante. O meio de cultura foi trocado diariamente.

• Utilização de semeadura multi-etapa

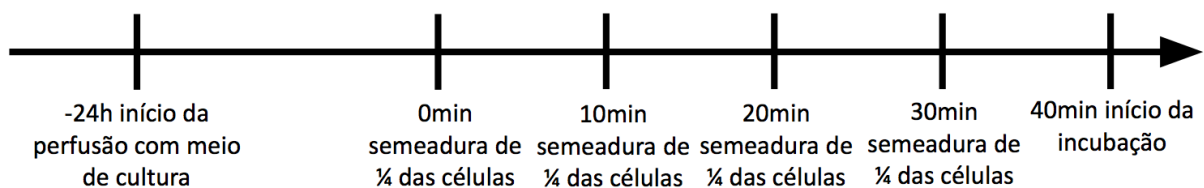


Figura 8: Esquema do método de perfusão multi-etapa utilizado para recelularização do *scaffold* descelularizado.

5.5 Caracterização da matriz descelularizada e da matriz recelularizada

A descelularização foi avaliada em um primeiro momento visualmente pela aquisição de uma coloração branca e translúcida no órgão, indicando a remoção do material celular e manutenção dos componentes da matriz.

A MDF foi então avaliada por testes de quantificação de DNA, colágeno, glicosaminoglicanos e análise histológica. Os resultados foram comparados com os resultados dos testes realizados com o fígado antes da descelularização.

Para quantificação de DNA total, colágeno e glicosaminoglicanos, foram isoladas pequenas porções do tecido (aproximadamente 50mg) retiradas de diferentes regiões dos órgãos para cada análise.

As porções do tecido destinadas a análise de DNA foram homogeneizadas em 1mL de TRIzol (Invitrogen) e incubadas em tubos de centrifugação de 2mL durante 5min em temperatura ambiente. 200µL de clorofórmio foram adicionados ao homogenato que foi centrifugado em 12.000g por 15min para separação de fases. A fase aquosa contendo o RNA foi descartada e ao restante foi adicionado 300µL de etanol 100%. Os tubos foram invertidos diversas vezes para misturar e então deixados parados por 3min em temperatura ambiente antes de serem novamente centrifugados dessa vez por 5min a 2.000g. O sobrenadante foi removido e o *pellet* resultante foi submetido a 3 lavagens com solução de 0,1M de citrato de sódio em etanol 10%. Entre

cada lavagem, os tubos foram centrifugados por 5min a 2.000g. Ao final, os *pellets* de DNA foram ressuspensos em 600µL de uma solução de NaOH 8mM.

A quantidade de DNA isolado foi medida por espectrofotometria (Nanodrop, Thermo Scientific, EUA). As densidades ópticas de 260nm e 280nm foram utilizadas para estimar a pureza e o rendimento de ácidos nucleicos.

A quantidade de colágeno foi medida indiretamente pela quantidade de OH-prolina. As porções do tecido foram hidrolisadas com 6N HCl a 105°C por 18h. O HCl foi evaporado em dessecador a vácuo. Após a evaporação as amostras foram diluídas em 50µL de H₂O. Foram adicionados 450µL de uma solução de cloramina-T (0,056M) às amostras que foram mantidas em temperatura ambiente por 25min para oxidação. Depois desse tempo foram adicionados 500µL do reagente de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldeído dissolvido em metanol) e as amostras foram incubadas por 20min em 60°C. Uma curva controle foi realizada utilizando-se uma solução de colágeno 2.000ng/mL diluído serialmente. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro em 570nm de comprimento de onda (REDDY; ENWEMEKA, 1996).

Para quantificar os glicosaminoglicanos, as porções do tecido foram homogeneizadas em solução de tripsina-EDTA e incubadas por 18h em 37°C. Em 20µL do homogenato resultante foi adicionado 200µL de uma solução de azul de dimetilmetileno. Uma curva controle foi estabelecida com uma solução de sulfato de condroitina 500µg/mL diluída serialmente. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro em 450nm de comprimento de onda (FARNDALE; SAYERS; BARRETT, 1982).

Para as análises histológicas, os órgãos foram fixados em paraformaldeído 4% durante no mínimo 24h. As amostras foram desidratadas com xilol por 24h e subsequentemente em etanol 100%. Após a desidratação as amostras foram embebidas em parafina por 24h. Os blocos resultantes foram seccionados em micrótomo (RM2155, LEICA) com uma espessura de 0,5mm por corte. Os cortes foram desparafinizados, reidratados com etanol 100% e corados com hematoxilina e eosina para visualização dos núcleos e citoplasma, por coloração do tricrômio de masson para visualizar as estruturas da MEC e por *Sirius Red* para visualizar colágeno.

Para análise ultraestrutural, as amostras foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A MDF foi fixada em paraformaldeído 4% durante no mínimo 24h. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e um bisturi foi

utilizado para seccioná-las. As secções foram colocadas sobre uma fita de carbono nos *stubs* de microscopia e metalizadas com ouro. As análises foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS em um microscópio eletrônico de varredura JSM-6060 (JEOL).

5.6 Análise de viabilidade celular

A viabilidade celular foi medida por ensaio de LIVE/DEAD. Esse ensaio de marcação fluorescente permite distinguir as células vivas das células mortas. Após 7 dias de cultivo no biorreator, os órgãos recelularizados foram imersos, ao abrigo da luz, em uma solução de 0,04mg/mL de iodeto de propídeo (PI) e 0,02mg/mL de diacetato de fluoresceína (FDA) em PBS. Por esse método, o FDA é incorporado no citoplasma de células vivas onde é clivado por lipases emitindo fluorescência verde. O PI é facilmente expelido por células vivas, mas não pelas células apoptóticas, sendo, deste modo, um marcador de células mortas, visualizado em fluorescência vermelha.

Pedaços de tecidos foram retirados dos órgãos marcados e inseridos entre duas lâminas de vidro e visualizadas em microscópio invertido de fluorescência (Nikon Eclipse Ti).

5.7 Análise Funcional

Alíquotas do meio de perfusão utilizados na cultura dinâmica em biorreator foram retiradas logo após a recelularização e nos tempos de 1, 3 e 7 dias. Os níveis de albumina, ureia, lactato desidrogenase (LDH) foram avaliados através de métodos enzimáticos-colorimétricos no equipamento de automação Konelab30i (Thermo Scientific). Como controle foram semeadas 100.000 células em uma placa de 6 poços e cultivadas durante 7 dias. Nos dias 1, 3 e 7 além de coletar os meios para a análise em um dos poços foi adicionado 10% de Triton X-100 por 10min, esses poços foram utilizados como controle de morte celular. Ainda os mesmos exames foram realizados apenas no meio de cultura sem ter sido utilizado em células.

5.8 Análise estatística

Para a quantificação de colágeno, DNA e glicosaminoglicanos, foi aplicado o teste t de Student para amostras não pareadas. Para as análises de LDH albumina e ureia foi aplicado uma ANOVA de duas vias seguida pelo teste Tukey HSD. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. Para todos os testes foi considerado estatisticamente significativo um p de 0,05.

6. RESULTADOS

6.1 Montagem do Biorreator

O biorreator (Figura 9) foi montado de acordo com as especificações necessárias para sua utilização tanto para o processo de descelularização como para o processo de recelularização.

O aparato manteve-se estéril após a autoclavagem do material e manuseio sob condições de esterilidade em capela de fluxo laminar. Após ser colocado em funcionamento nas condições de cultivo em incubadora celular com apenas meio de cultura, o meio não apresentou crescimento microbiano comprovado pela ausência de turbidez e pela negativa de crescimento de microrganismos, em placas de ágar sangue e ágar sabouraud.

A realização de testes com traqueias provenientes de suínos (Figura 10), além dos fígados provenientes de ratos, demonstra que o aparato pode ser adaptado para diversos órgãos, respeitando-se o tamanho da câmara de órgão, a qual pode ser substituída por uma maior em caso de necessidade para tal.



Figura 9: Biorreator de perfusão para descelularização e recelularização montado no Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS.



Figura 10: Biorreator utilizado para a descelularização da traqueia (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

6.2 Isolamento e caracterização das células

As células obtidas adquiriram uma morfologia alongada característica de célula-tronco mesenquimal em cultivo. Quando submetidas aos meios de diferenciação, foram capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos (Figura 11).

Na imunofenotipagem as células expressaram positividade para CD29 (99,8%), CD44 (99,8%), CD73 (99,8%), CD90 (99,7%), e CD105 (99,7%). Os marcadores de células hematopoiéticas de CD14 (0,1%), CD34 (<0,1%), CD45 (<0,1%) e CD184 (0,1%) apresentaram baixa expressividade (Figura 11).

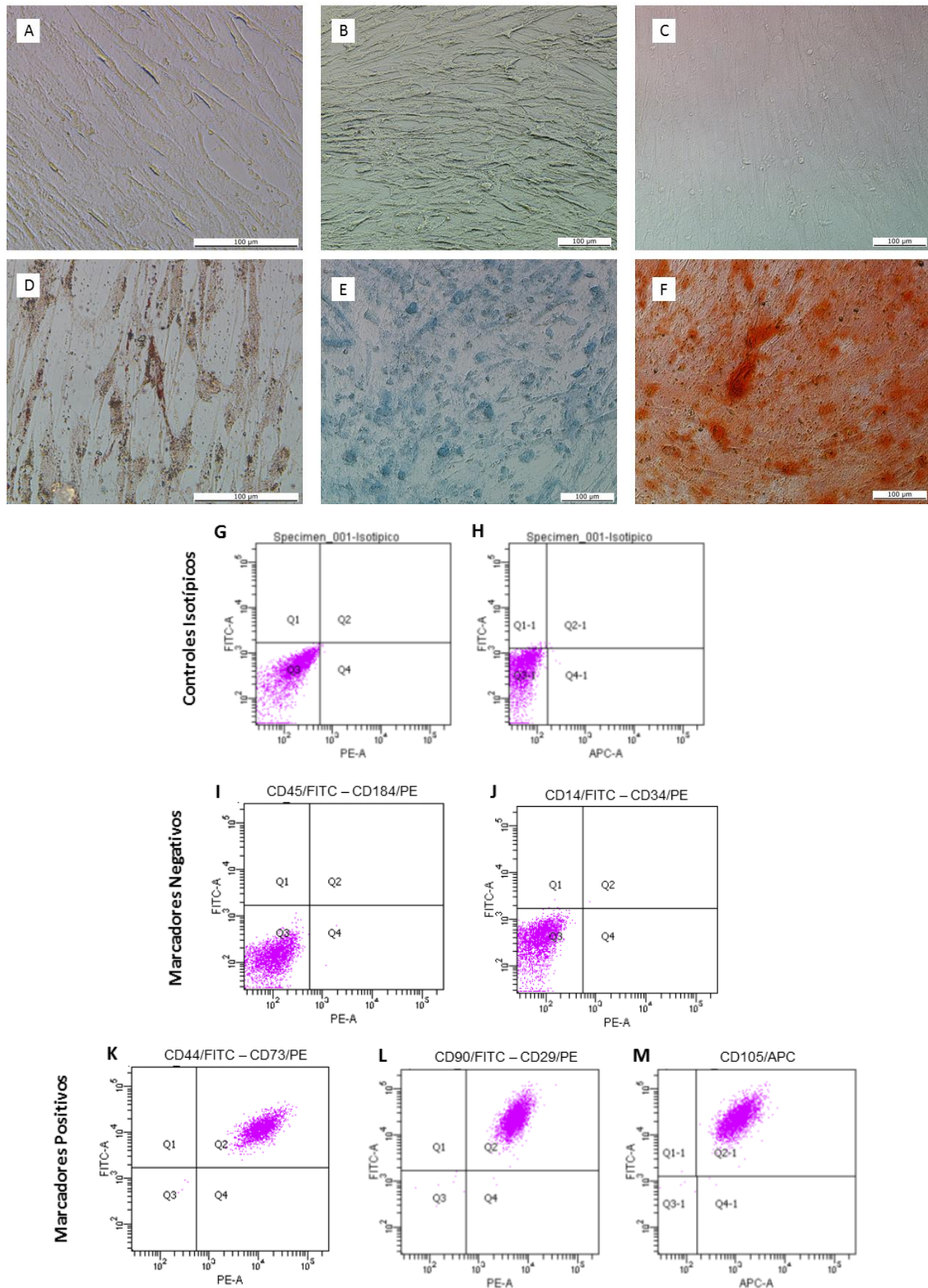


Figura 11: Caracterização das CTMs. Microfotografias da diferenciação celular. Controles de diferenciação (A, B e C); Diferenciação adipogênica mostrando depósitos de gordura (D), Diferenciação condrogênica mostrando matriz cartilaginosa (E); Diferenciação osteogênica mostrando depósitos de matriz mineralizada (F). Caracterização imunofenotípica das CTM. Baixa expressão (<2%) para CD45 e CD184 (I), CD14 e CD34 (J). Positividade (>99,5%) para CD44 e CD73 (K), CD90 e CD29 (L), CD105 (M). Imagens retiradas do trabalho de conclusão de curso intitulado: Avaliação *in vitro* do comportamento de células-tronco mesenquimais em *scaffolds* contendo diferentes concentrações de alginato e cloreto de cálcio como estratégia em medicina regenerativa. ALBRECHT, 2017.

6.3 Descelularização dos órgãos

Após as primeiras 24h do processo, o órgão já mostrou alteração em sua coloração (Figura 12). Com a troca da água para a solução de SDS, em poucos minutos a eliminação de material celular foi visualizada e em 24h o órgão alterou sua coloração, adquirindo uma cor branca e translúcida. No fígado descelularizado foi possível visualizar macroscopicamente as ramificações da árvore arterial (Figura 18).



Figura 12: Evolução da descelularização no tempo e pela troca de reagentes. Fígado fresco recém colocado no biorreator (Esq.). Fígado após 24h de perfusão com H₂O (Centro). Fígado após perfusão por 24h com SDS (Dir.) (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

A quantidade de DNA no fígado descelularizado foi inferior a 100ng/mg de tecido ($84,8 \pm 13,0$ ng/mg, n=3), enquanto a quantidade de DNA no tecido fresco foi de $401,6 \pm 34,8$ ng/mg de tecido, n=3 (Figura 13).

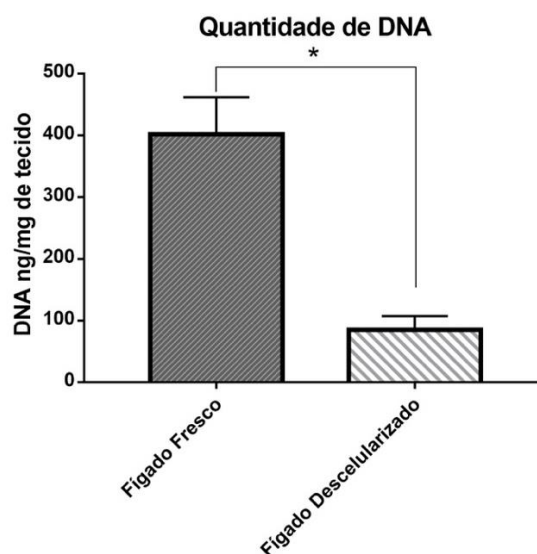


Figura 13: Quantificação de DNA. Os fígados descelularizados apresentaram $84,8 \pm 13,0$ ng/mg de DNA, uma quantidade menor do que 100ng/mg de tecido, o que caracteriza ausência de células, de acordo com a literatura. Os fígados frescos apresentaram $401,6 \pm 34,8$ ng/mg de DNA. Valores expressos em média e desvio padrão, $p < 0,05$.

Os glicosaminoglicanos foram conservados nos fígados descclularizados em 50% de sua quantidade total ($2,69 \pm 0,01\mu\text{g}/\text{mg}$, $n=4$) comparado com os fígados controles ($5,41 \pm 0,01\mu\text{g}/\text{mg}$, $n=3$) (Figura 14).

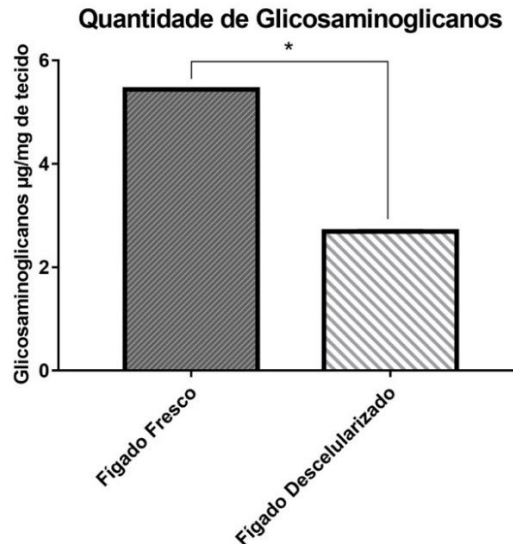


Figura 14: Quantificação de glicosaminoglicanos. Os fígados descclularizados mantiveram aproximadamente 50% da quantidade de glicosaminoglicanos ($2,69 \pm 0,01\mu\text{g}/\text{mg}$), encontrados no fígado fresco ($5,41 \pm 0,01\mu\text{g}/\text{mg}$). Valores expressos em média e desvio padrão, $p<0,05$.

A quantificação de colágeno mostrou um aumento significativo da quantidade de colágeno por miligrama de tecido no fígado descclularizado ($34,76 \pm 0,87\mu\text{g}/\text{mg}$, $n=3$) em comparação com o fígado fresco ($14,58 \pm 0,30\mu\text{g}/\text{mg}$, $n=3$) (Figura 15).

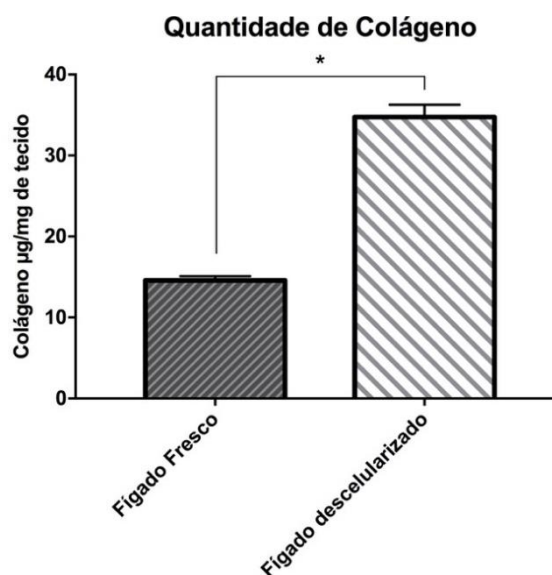


Figura 15: Quantificação de colágeno. Os fígados descclularizados mostraram aumento na quantidade de colágeno por massa de tecido ($34,76 \pm 0,87\mu\text{g}/\text{mg}$), quando comparado com o fígado fresco ($14,58 \pm 0,30\mu\text{g}/\text{mg}$). Valores expressos em média e desvio padrão, $p<0,05$.

6.4 Recelularização

A avaliação do sucesso da esterilização da matriz foi confirmada pela ausência de crescimento microbiano no meio de cultura perfundido pela matriz descelularizada (Figura 16) e pela negativa de crescimento do meio colocado em placas de cultura ágar sangue e ágar sabouraud.

Após 10 minutos da última etapa de semeadura, a contagem em câmara de Neubauer das células no meio restante revelou uma incorporação de 97% de células na matriz, conferindo alta eficiência ao processo.

As CTMs mantiveram-se vivas durante os 7 dias de cultivo, como mostram os resultados das análises bioquímicas e da análise de LIVE/DEAD (Figura 17). O aspecto do fígado recelularizado, após 7 dias de cultivo, pode ser observado na Figura 18.

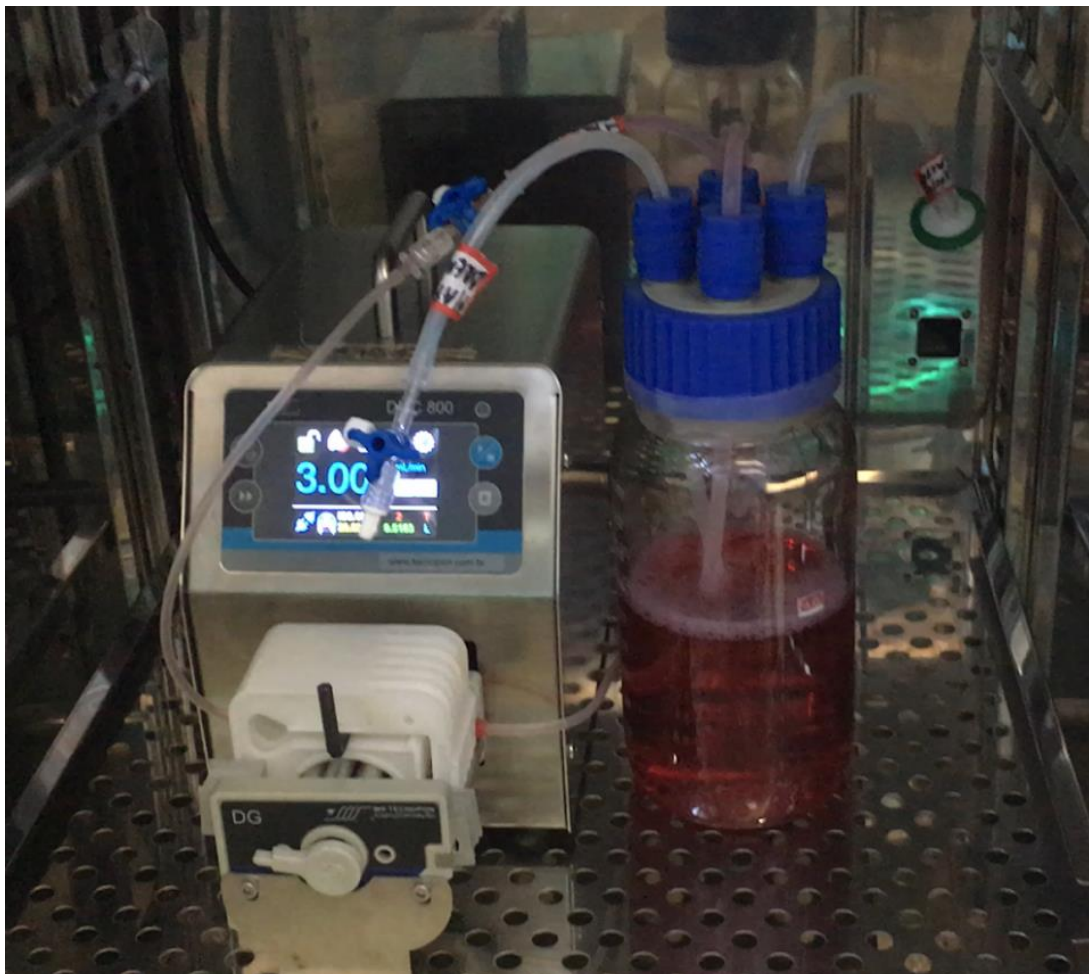


Figura 16: Biorreator após cultivo em incubadora celular com apenas meio de cultura, nota-se a manutenção da coloração translúcida do meio, indicando que não houve alteração do pH do meio e nem crescimento de microrganismos (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

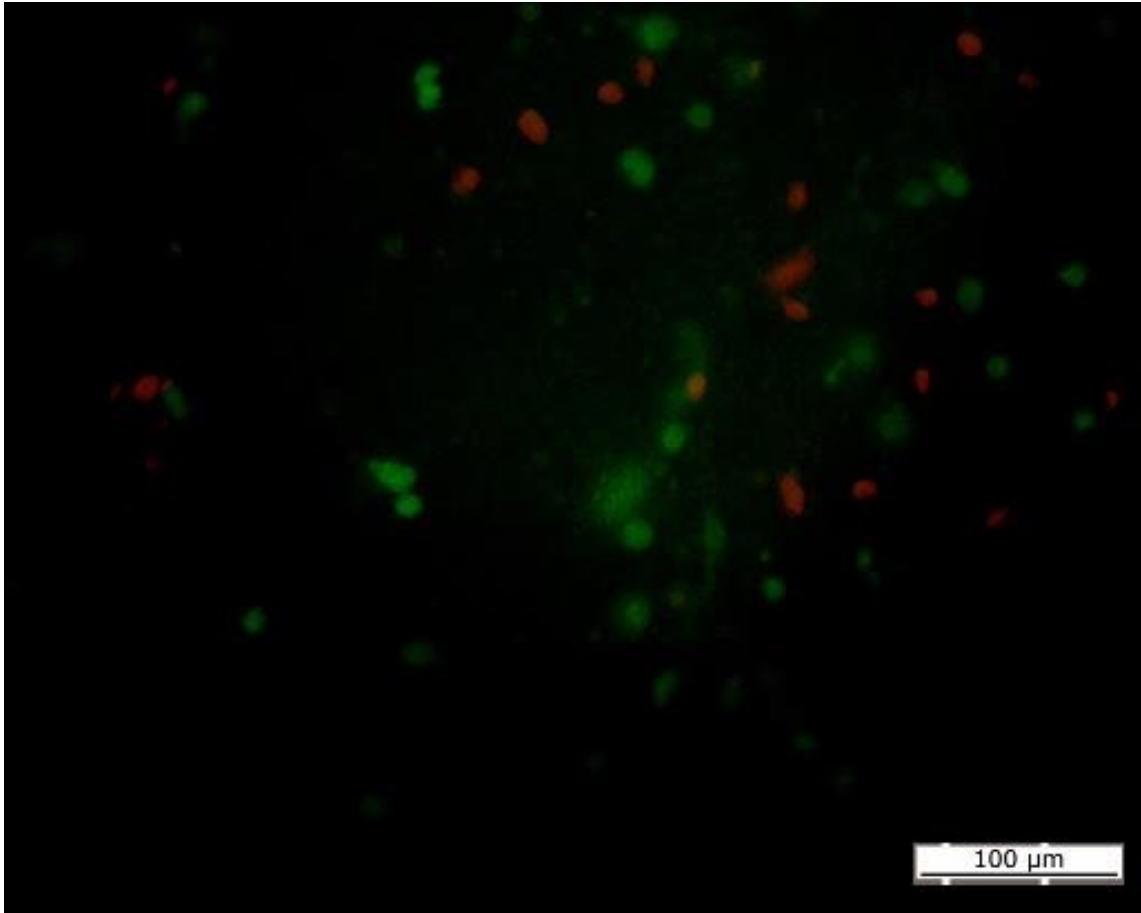


Figura 17: Ensaio de LIVE/DEAD após 7 dias de cultura células vivas visualizadas em verde e células mortas visualizadas em vermelho.

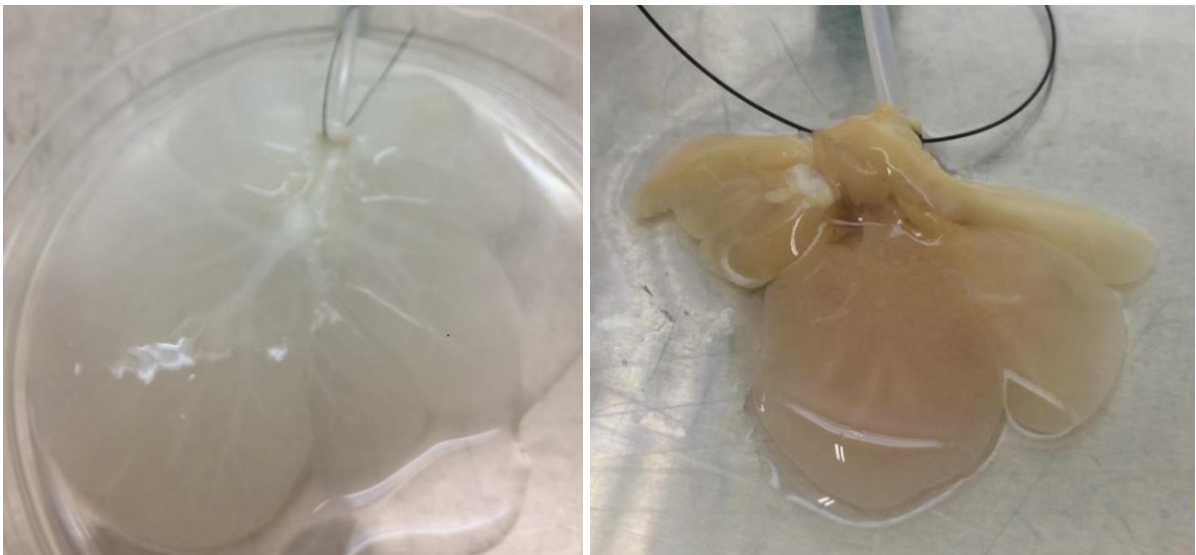


Figura 18: Fígado descellularizado (Esq.). Fígado recellularizado após 7 dias de cultivo (Dir.) (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

As células no fígado recellularizado produziram a mesma quantidade de albumina e ureia do que as células em cultivo na placa de cultura (Figura 19). A

quantidade de LDH liberado pelas células no fígado foi maior do que na placa de cultivo nos dias 1 e 3, mas sem diferença no dia 7. Ambos o fígado recelularizado e o controle na placa possuem quantidades menores de LDH do que o controle de morte celular em todos os dias analisados (Figura 19).

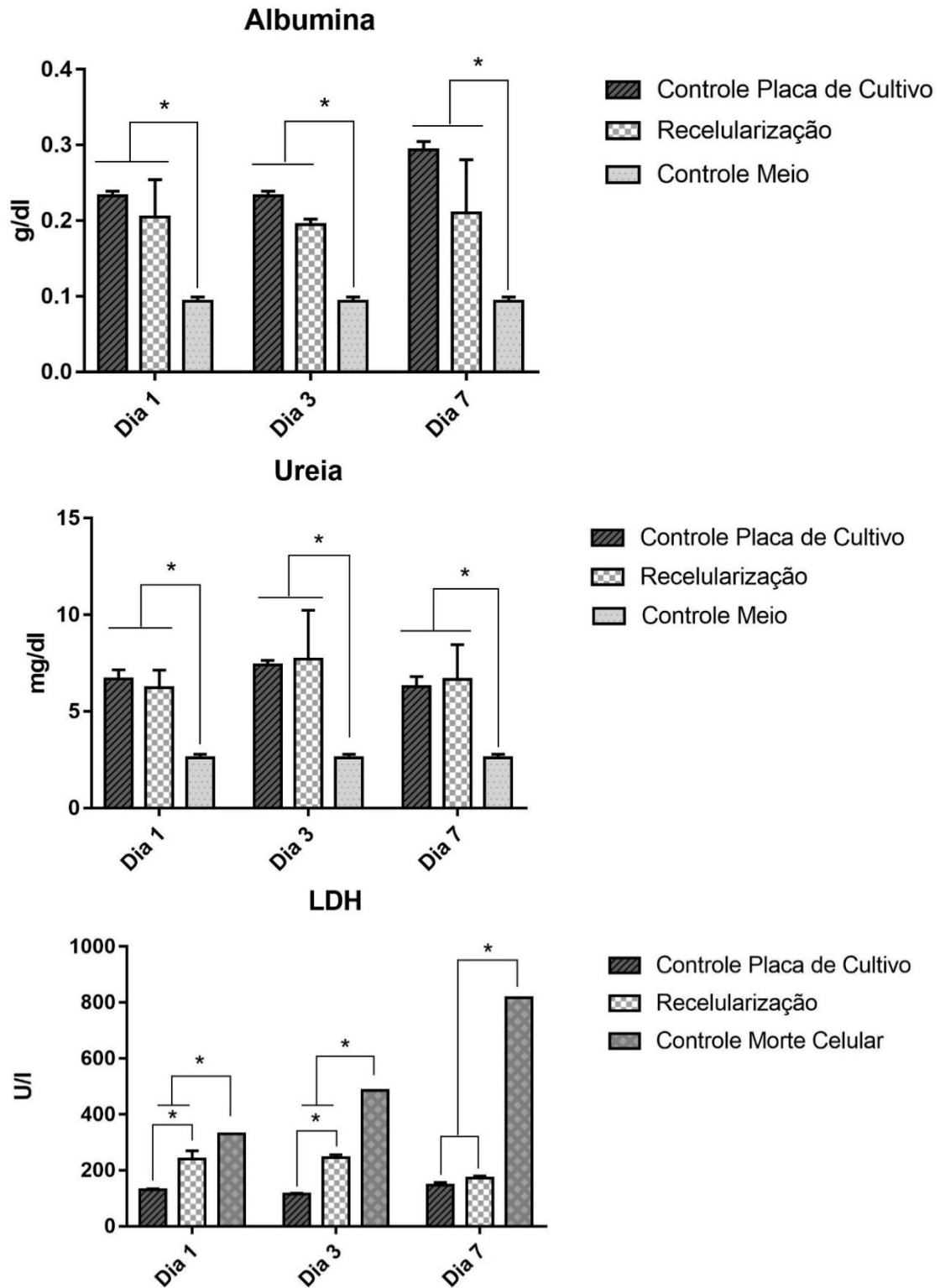


Figura 19: Resultado das análises funcionais (albumina, ureia e lactato desidrogenase). Dados apresentados em média e desvio padrão. Resultados foram considerados estatisticamente significativos para um $p < 0,05$.

6.5 Histologia

A coloração de hematoxilina e eosina mostrou a ausência de marcação com o corante nuclear na matriz descelularizada, mostrando apenas as estruturas da matriz extracelular coradas pela eosina (Figura 20). Já no corte da matriz recelularizada, foi possível visualizar algumas células distribuídas pela matriz. A coloração de tricômio de Masson e *sirius red* marcaram o tecido conjuntivo em azul e roxo e as fibras de colágeno em laranja.

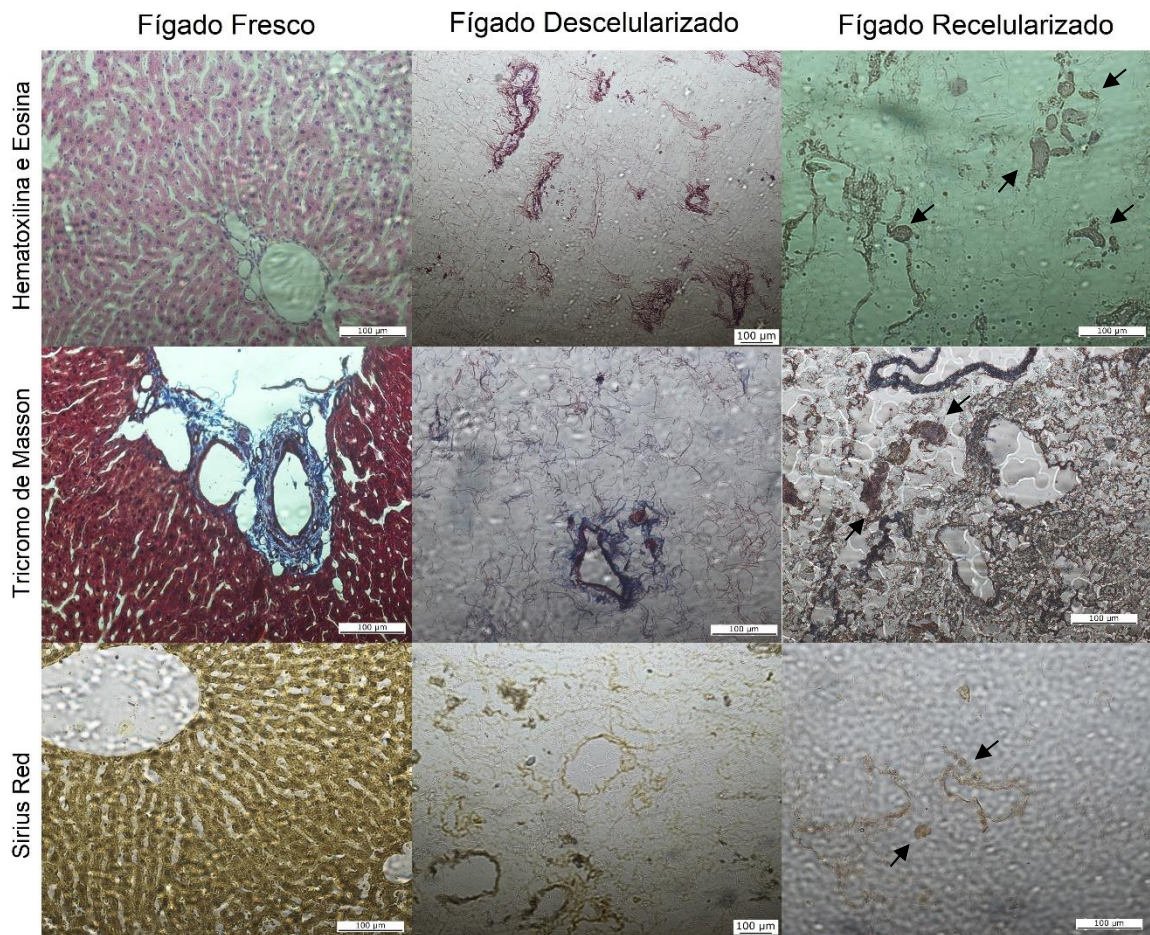


Figura 20: Cortes histológicos dos fígados fresco, descelularizado e recelularizado (indicados na figura). A ausência de núcleos e manutenção da matriz extracelular pode ser percebida nas imagens do fígado descelularizado. Presença de células (indicada pelas setas) nas imagens do fígado recelularizado. As células foram capazes de migrar dos vasos para o tecido, apesar de se manterem próximas a eles.

As análises ultraestruturais das amostras descelularizadas evidenciam a manutenção da matriz extracelular no parênquima e a microarquitetura hepática, sendo possível visualizar os espaços vazios onde estariam os hepatócitos (Figura 21).

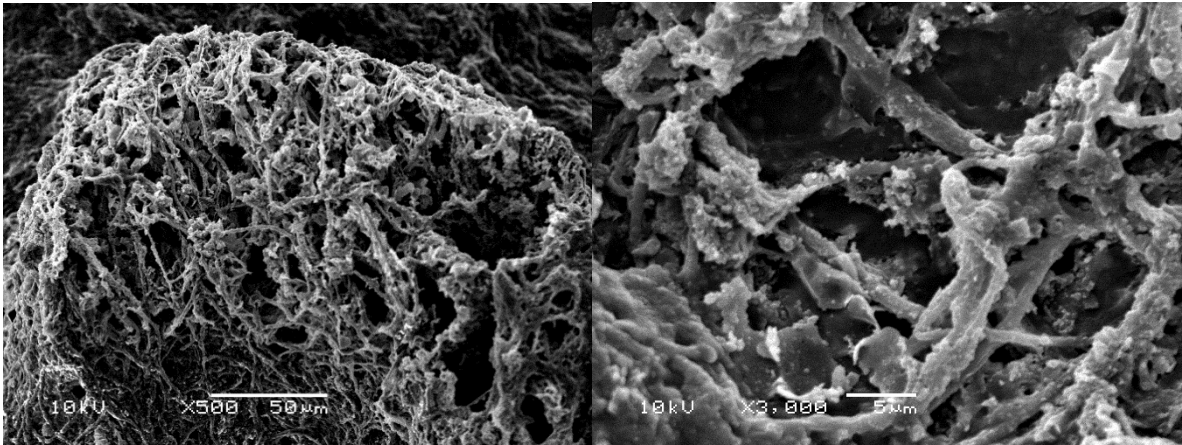


Figura 21: Microscopia eletrônica de varredura das matrizes descellularizadas. Manutenção dos espaços ocupados pelos hepatócitos no emaranhado de tecido conjuntivo (Esq.). Manutenção das fibras e matriz extracelular no parênquima (Dir.).

7. DISCUSSÃO

A engenharia de tecidos é inovadora e pode fornecer respostas completas para perguntas complexas, entretanto precisa ser também aplicável e acessível, de forma a atender o maior número de pessoas, sendo inclusive viável a sua aplicação em políticas de saúde pública.

O presente trabalho demonstra a possibilidade de utilizar materiais de baixo custo para a montagem de um biorreator de perfusão. Esse biorreator foi capaz de produzir constructos funcionais para a substituição de órgãos que, por sua vez, possuem uma alta demanda para a realização de transplantes.

O biorreator construído possui os requisitos mínimos necessários para o processo biológico ao qual é aplicado (MARTIN; VERMETTE, 2005; SCARRIT; PASHOS; BUNNELL, 2015; ZHAO et al., 2016). O aparelho foi capaz de se manter estéril, apresentando facilidade de manuseio e limpeza. O aparato desenvolvido realizou a troca de massas e a retirada dos dejetos metabólicos de forma suficiente. O mesmo também apresentou eficiente controle dos parâmetros de perfusão, permitindo assim a reprodutibilidade do processo.

O biorreator mostrou ter potencial para sua reprodução em larga escala, para a aplicação tanto em pesquisa, quanto na indústria. Porém, ainda se faz necessário formar mais conhecimento acerca dos processos celulares envolvidos na construção de um enxerto funcional similar ao órgão *in vivo*.

O primeiro procedimento realizado no biorreator foi o da descellularização hepática. Em um primeiro momento houve a necessidade de se determinar qual seria a porta de entrada das soluções utilizadas no processo. Dentre elas, estavam a árvore arterial a partir da artéria hepática, ou a veia cava, perfundindo, dessa forma, o líquido no sentido contrário ao que normalmente acontece no fígado *in situ*. Outro canal a ser utilizado poderia ser os ductos biliares. Porém, escolheu-se a veia porta como o local de perfusão, com o objetivo de manter a proximidade fisiológica do sentido do fluxo e por ser um vaso de maior calibre do que a artéria hepática, portanto o fluxo por unidade de tempo é maior.

A ligação entre as mangueiras de silicone do biorreator e a veia foi executada com uma sonda uretral de material polimérico com tamanho de 6fr. Foram realizados testes com agulhas de seringa, porém a rigidez do material metálico e a necessidade de se remover o bisel da agulha levaram à desconsideração do seu uso no biorreator.

A rigidez do material dificultava a fixação da agulha ao fígado com o fio de sutura utilizado, causando o desprendimento do órgão do aparato logo ao início da perfusão. A remoção do bisel foi realizada com alicate de corte, o que danificava a saída da agulha e criava uma nova variável que alterava o fluxo e a pressão. Portanto, a sonda uretral, por possuir material mais maleável, foi empregada. Seu diâmetro foi escolhido com base no diâmetro do vaso, sendo o mais próximo possível o escolhido.

A perfusão inicial com água por 24h mostrou-se eficiente para a remoção do sangue retido no órgão e de detritos mais grosseiros, mas sua aplicação além do tempo estabelecido não causou alterações significativas, sendo necessária a aplicação de outros agentes em conjunto para obter o resultado desejado.

A utilização de SDS na descclularização já é bem estabelecida na literatura (HE; CALLANAN, 2013) e portanto foi o agente escolhido para realizar a próxima etapa de remoção do material celular. A aplicação de uma solução de SDS 1% mostrou-se extremamente eficiente na remoção das células. Levando em consideração que o SDS é tóxico para as células e que o objetivo do procedimento foi preparar um *scaffold* para cultivo celular, considerou-se a diminuição da concentração de SDS para 0,5%. A escolha mostrou-se frutífera e o resultado de descclularização foi observado em menos de 24h. Foi padronizado manter a perfusão de SDS por 24h, para garantir a remoção completa de qualquer resíduo celular.

Como mencionado, o SDS é citotóxico e precisa ser removido da matriz, antes do seu uso com células. Para tal, o uso de PBS foi empregado por mais 24h. Tendo em vista a futura necessidade de esterilização da matriz, mesmo todo o procedimento sendo realizado em capela de fluxo laminar e com material estéril, o PBS, nesse momento, foi suplementado com antimicrobianos.

O fígado, por ser um órgão de grande volume, apresenta uma dificuldade em ser esterilizado por toda a sua extensão. A perfusão da solução de esterilização com ácido peracético 0,1% em etanol 4% com aplicação de luz UV durante o procedimento (FIDALGO et al., 2018), mostrou-se suficiente para superar tal dificuldade. O procedimento de descclularização adotado foi suficiente para promover a remoção do material celular, deixando apenas vestígios de material nuclear no *scaffold*. Foi possível perceber que durante o procedimento ocorreu uma alteração da densidade do tecido, o qual passou a não afundar quando imerso nos líquidos empregados. Como a arquitetura, ou seja, a forma do órgão foi preservada, bem como o seu volume, sugere-se, portanto, uma alteração no peso do órgão.

Uma quantidade de DNA menor que 100ng/mg de tecido é compatível com a ausência de células (MAZZA et al., 2015; UYGUN et al., 2010). A média de DNA encontrada nos órgãos descelularizados foi de 84,8ng/mg de tecido, abaixo do limiar estabelecido na literatura. A análise histológica com hematoxilina e eosina corroborou o fato, comprovada pela ausência dos núcleos corados de roxo, pela hematoxilina no tecido descelularizado, em contrapartida com o tecido fresco.

Ao analisar a quantidade colágeno, notou-se um aumento dessa quantidade nos tecidos descelularizados. Isso deve-se ao fato de que em uma mesma quantidade de tecido de fígado fresco existe, além do colágeno, o material celular, enquanto que nos fígados descelularizados, apenas o colágeno se faz presente. Esse resultado portanto é um indício de que a quantidade de colágeno foi mantida no tecido (MAGHSOUDLOU et al., 2016). Uma estimativa mais precisa pode ser realizada com a liofilização do tecido e a normalização pela porcentagem em relação ao peso total do tecido.

As colorações histológicas do tricromo de Masson e *sirus red*, as quais coram o colágeno de tons de azul e roxo ou de vermelho, respectivamente, confirmaram a manutenção da trama fibrosa de colágeno presente na matriz extracelular.

Quando analisados por microscopia eletrônica de varredura, notou-se um dano mínimo ao parênquima celular dos *scaffolds*, enquanto os espaços que seriam ocupados pelos hepatócitos encontram-se vazios. Sendo assim, o processo de descelularização foi capaz de remover as células sem causar grandes danos à organização do parênquima, enquanto criou um ambiente propício para o cultivo celular, extremamente similar ao ambiente fisiológico do fígado.

A quantidade de glicosaminoglicanos mantida no *scaffold* foi de aproximadamente 50%. Essa diminuição é resultante do fato de que os GAGs também fazem parte da parede celular das células, as quais foram removidas durante o processo de descelularização. A manutenção dessas substâncias no *scaffold* já foi comprovada auxiliar na diferenciação celular e no armazenamento de diversas proteínas de comunicação celular, que favorecem a proliferação (TIMARU et al., 2017; TROWBRIDGE; GALLO, 2002).

Tendo em mãos um *scaffold* acelular com a micro e macro arquitetura próximas a do órgão original, o próximo passo foi repovoá-lo com células. As células-tronco mesenquimais foram escolhidas para tal procedimento devido a suas propriedades de alta replicação e capacidade de se diferenciar nos tipos celulares desejados.

Os resultados obtidos na caracterização das células demonstram sua capacidade de diferenciação em condrócitos, adipócitos e osteócitos. A imunofenotipagem positiva para os marcadores de CTMs e negativa para marcadores hematopoéticos, corroborou com os critérios estabelecido pela ISCT para afirmar que CTMs estavam sendo utilizadas.

Uma questão a ser avaliada, conforme anteriormente discutido é qual a via adequada a ser utilizada para inserir as células no tecido. As mesmas vias possíveis para a descelularização são praticáveis para a recelularização, e, de fato, já foi comprovado que as diferentes vias favorecem a deposição das células em diferentes áreas do parênquima. Por exemplo, células inseridas pela veia cava tem uma deposição maior na região próxima à veia central no lóbulo hepático (WANG et al., 2017). Por conveniência e para manter os parâmetros dos experimentos, a via escolhida foi continuar com a veia porta, que já trazia a canulação do procedimento de descelularização. Importante ressaltar que os procedimentos foram realizados sequencialmente, sem intervalo de tempo entre a descelularização, a esterilização e a recelularização.

A quantidade escolhida de células, 10^8 , representa 10% do total de células de um rato (SOHLENIUS-STERNEBECK, 2006), o mínimo necessário para restaurar a função hepática em um enxerto (OGOKE; OLUWOLE; PARASHURAMA, 2017).

O método de semeadura das células foi escolhido por sua eficiência de retenção das células no *scaffold* (UYGUN et al., 2010). O método multi-etapa permitiu que uma quantidade menor de células espalhe-se pelo *scaffold* antes da perfusão de novas células. Com isso garantiu-se uma eficiência de 97% das células retidas no *scaffold* após a perfusão.

Após o tempo determinado de cultura, a maior parte das células foi capaz de se manter viva, como demonstra a análise de LIVE/DEAD.

A análise de LDH, enzima intracelular, objetiva avaliar a sua presença no meio, sugerindo que houve ruptura celular e, por consequência, que ocorreu morte celular. Os resultados obtidos indicaram que as células mostraram tendência a morrer nos três primeiros dias de cultivo no biorreator. No sétimo dia, a quantidade de LDH não foi diferente da quantidade encontrada nas células em cultivo na placa e nem no meio de cultura não utilizado em cultivo. Tais dados sugerem que no sétimo dia não houve mais morte celular.

Assim sendo, a morte de parte das células nos primeiros dias pode ter ocorrido devido ao estresse de cisalhamento causado pela perfusão. Uma hipótese é que as células se ambientaram ao parênquima e, então, não tenham sofrido diretamente os efeitos do estresse de cisalhamento aos 7 dias de cultivo. Uma quantidade residual de SDS também pode ter permanecido, causando citotoxicidade. As análises da dosagem de albumina e ureia liberadas pelas células do controle na placa de cultivo e das células após a recelularização do fígado apresentam diferença quando comparados com apenas o meio de cultivo sem células. Tais dados indicam que as células tanto ambientaram-se ao *scaffold* e às condições de cultivo como mantiveram-se viáveis, pelo período de cultivo.

Com isso, a análise da quantidade de ureia e albumina mostrou que não existe diferença na produção dessas duas substâncias pelas células no *scaffold* em comparação com as células na placa. Em células-tronco mesenquimais, que foram diferenciadas em hepatócitos, já foi encontrado que seus níveis de produção de ureia e albumina aumentam expressivamente (HU et al., 2016). Dessa forma, levanta-se a hipótese de que, em apenas sete dias, as CTMs no *scaffold* não mudaram seu perfil metabólico e sua expressão gênica para um fenótipo mais próximo de um hepatócito. Uma outra hipótese é que as células teriam iniciado tal mudança, mas devido ao pequeno tempo de cultivo, tais mudanças ainda não são detectáveis. Mesmo que a matriz seja comprovadamente uma facilitadora da diferenciação celular (SHAKOURI-MOTLAGH et al., 2017), sem a aplicação dos fatores necessários para induzir uma diferenciação, as células não são capazes de fazê-la sozinhas, não em tão pouco tempo de cultivo.

Fornecer os fatores de diferenciação adequados, junto com o meio de perfusão durante a cultura, é um próximo passo a ser considerando, para garantir o desenvolvimento de uma função hepática nos órgãos produzidos. A diferenciação anterior à inserção das células no *scaffold*, também deve ser considerada como um método viável.

Os cortes histológicos da recelularização mostraram poucas células espalhadas pelo parênquima, em pequenos grupos ou isoladas e, normalmente, próximas aos vasos. A permanência próxima aos vasos é esperada, pois essa é sua via de entrada e as células tendem a migrar devagar pela trama do tecido. A ausência de um número maior de células para ocupar todo o espaço do tecido favorece essa distribuição. A

morfologia das células encontra-se arredondada, o que sugere que a célula está metabolicamente ativa, corroborando com os dados obtidos das análises funcionais.

Desta forma, o objetivo delineado de montar um biorreator de perfusão capaz de descelularizar e recelularizar um órgão foi atingido. Ainda que exista muito a ser pesquisado até ser possível alcançar um construto que tenha potencial de substituir um órgão para transplante e que seja reprodutível em escala industrial, este trabalho estabelece no Laboratório de Hematologia e Células-tronco da UFRGS uma nova técnica que pode ser utilizada em futuras pesquisas para o desenvolvimento da medicina regenerativa e da engenharia de tecidos.

8. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a possibilidade de produzir e estabelecer, no Laboratório de Hematologia e Células-tronco da UFRGS, um enxerto hepático e com a possibilidade de estender o procedimento para outros órgãos, visando sua utilização em pesquisa na medicina regenerativa.

Foi desenvolvido um biorreator de perfusão, desde a concepção e montagem, com o objetivo do mesmo ser capaz de descelularizar e recelularizar diferentes órgãos. O biorreator foi eficientemente utilizado para a descelularização dos fígados de ratos gerando *scaffolds* naturais e acelulares que mantiveram a arquitetura original do órgão. No biorreator também foi realizada a preparação e esterilização dos *scaffold* para a recelularização.

A recelularização foi conduzida com eficiência no biorreator e o cultivo subsequente foi levado a efeito durante o período estabelecido de 7 dias. As análises posteriores comprovaram que as células se mantiveram viáveis durante esse período.

9. PERSPECTIVAS

O protocolo de descelularização e recelularização de tecidos foi inicialmente estabelecido, possibilitando o desenvolvimento de futuras pesquisas na área da engenharia de tecidos.

As perspectivas futuras incluem:

- Verificar se a quantidade de células é compatível com a quantidade semeada, e se elas estão se replicando no *scaffold*.
- Testar como se comportariam as células com meio de diferenciação hepática.
- Fazer os mesmos experimentos semeando-se células já diferenciadas.
- Averiguar o efeito de um maior período de cultivo sobre as células utilizadas.
- Investigar se diferenciar as células em mais de um tipo celular, como hepatócitos e células epiteliais criaria um enxerto mais fidedigno ao original.
- Transplantar o enxerto *in vivo* e verificar qual seria o seu comportamento.

Existem muito mais perguntas a serem respondidas do que aquelas que já foram. Sendo assim é necessário dar segmento aos experimentos e encontrar sempre mais perguntas do que respostas, pois é de perguntas que se faz a ciência.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, C. Avaliação in vitro do comportamento de células-tronco mesenquimais em scaffolds contendo diferentes concentrações de alginato e cloreto de cálcio como estratégia em medicina regenerativa. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Biomedicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.
- ALTMAN, GREG et al. Cell differentiation by mechanical stress. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 270–272, 2002. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.01-0656fje>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- ANDRADE, Juliana Maria de Mello et al. Identification of compounds from non-polar fractions of *Blechnum* spp and a multitarget approach involving enzymatic modulation and oxidative stress. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 89–98, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jphp.12653>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- BADYLAK, Stephen F.; FREYTES, Donald O.; GILBERT, Thomas W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–13, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706108002821>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- BANCROFT, Gregory N. et al. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 99, n. 20, p. 12600, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC130506/>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- BERNARDI, Lisiane et al. The Isolation of Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp Is Related to the Physiological Process of Resorption. **Journal of Endodontics**, [s. l.], v. 37, n. 7, p. 973–979, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099239911004894>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- BHUMIRATANA, Sarindr et al. Principles of Bioreactor Design for Tissue Engineering. **Principles of Tissue Engineering**, [s. l.], p. 261–278, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123983589000148?via%3Di>>

hub>. Acesso em: 4 out. 2018.

BIANCO, Paolo; ROBEY, Pamela Gehron; SIMMONS, Paul J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 313–319, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18397751>>.

Acesso em: 6 out. 2018.

BRADY, Mariea A.; WALDMAN, Stephen D.; ETHIER, C. Ross. The Application of Multiple Biophysical Cues to Engineer Functional Neocartilage for Treatment of Osteoarthritis. Part I: Cellular Response. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1–19, 2015. Disponível em:

<<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2013.0757>>. Acesso em: 4 out. 2018.

BRAGHIROLI, D. I. Desenvolvimento De Um Substituto Nanoestruturado A Ser Utilizado Em Associação Com Células-tronco Para A Terapia Vascular Em Doença Arterial Periférica. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

BRAGHIROLI, D. I. et al. Bio-electrospraying of human mesenchymal stem cells: An alternative for tissue engineering. **Biomicrofluidics**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2013.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772937/>>. Acesso em: 4 out. 2018.

BUTLER, David L.; GOLDSTEIN, Steven A.; GUILAK, Farshid. Functional Tissue Engineering: The Role of Biomechanics. **Journal of Biomechanical Engineering**, [s. l.], v. 122, n. 6, p. 570, 2000. Disponível em:

<<http://biomechanical.asmedigitalcollection.asme.org/article.aspx?articleid=1404300>>. Acesso em: 4 out. 2018.

CARRIER, Rebecca L. et al. Perfusion Improves Tissue Architecture of Engineered Cardiac Muscle. **Tissue Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 175–188, 2002. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/107632702753724950>>. Acesso em: 4 out. 2018.

CHAMBERLAIN, Giselle et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stem Cells**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 2739–2749, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656645>>. Acesso em: 6 out. 2018.

CHANI, Baldeep et al. Decellularized scaffold of cryopreserved rat kidney retains its recellularization potential. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2017. Disponível em:

- <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5340383/>>. Acesso em: 4 out. 2018.
 CHAPEL, Alain et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. **The Journal of Gene Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. 1028–1038, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661178>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- CHEN, Huang-Chi; HU, Yu-Chen. Bioreactors for tissue engineering. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 28, n. 18, p. 1415–1423, 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9111-x>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- CHUNG, Bong Geun et al. Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 401, 2005. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b417651k>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- CHUNG, C. A. et al. A compact computational model for cell construct development in perfusion culture. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 1535–1541, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.21701>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- CRAWFORD, James M.; BIOULAC-SAGE, Paulette; HYTIROGLOU, Prodromos. Structure, Function, and Responses to Injury. In: **Macswen's Pathology of the Liver**. [s.l.] : Elsevier, 2018. p. 1–87.
- CUKIERMAN, E. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. **Science**, [s. l.], v. 294, n. 5547, p. 1708–1712, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1064829>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- DAVISSON, Twana; SAH, Robert L.; RATCLIFFE, Anthony. Perfusion Increases Cell Content and Matrix Synthesis in Chondrocyte Three-Dimensional Cultures. **Tissue Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 807–816, 2002. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/10763270260424169>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- EKATAKSIN, Wichai; KANEDA, Kenji. Liver Microvascular Architecture: An Insight into the Pathophysiology of Portal Hypertension. **Seminars in Liver Disease**, [s. l.], v. 19, n. 04, p. 359–382, 1999. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2007-1007126>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- FARNDAL, R. W.; SAYERS, C. A.; BARRETT, A. J. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. **Connective tissue**

research, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 247–8, 1982. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6215207>>. Acesso em: 3 out. 2018.

FIDALGO, Cátia et al. A sterilization method for decellularized xenogeneic cardiovascular scaffolds. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 67, p. 282–294, 2018.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706117307195?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 out. 2018.

FIOROTTO, Romina et al. Liver diseases in the dish: iPSC and organoids as a new approach to modeling liver diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -**

Molecular Basis of Disease, [s. l.], 2018. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443918303314>>. Acesso em: 4 out. 2018.

FRESHNEY, R. I. et al. Principles of Tissue Culture and Bioreactor Design.

Principles of Tissue Engineering, [s. l.], p. 155–183, 2007. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123706157500160>>.

Acesso em: 4 out. 2018.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 331–40, 1974. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4150881>>. Acesso em: 6 out. 2018.

FU, Ru-Huei et al. Decellularization and Recellularization Technologies in Tissue Engineering. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 23, n. 4–5, p. 621–630, 2014.

Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/full/10.3727/096368914X678382>>.

Acesso em: 4 out. 2018.

GILPIN, Anna; YANG, Yong. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine:

From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2017, 2017.

[s. l.], v. 2017, 2017.

GOH, Saik-Kia et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. **Biomaterials**, [s. l.], v. 34, n. 28, p. 6760, 2013. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3748589/>>.

Acesso em: 4 out. 2018.

GUMUCIO, Jorge J. Hepatocyte heterogeneity: The coming of age from the description of a biological curiosity to a partial understanding of its physiological meaning and regulation. **Hepatology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 154–160, 1989. Disponível

em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.1840090124>>. Acesso em: 4 out. 2018.

GURUSWAMY DAMODARAN, Rajesh; VERMETTE, Patrick. Decellularized pancreas as a native extracellular matrix scaffold for pancreatic islet seeding and culture. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 1230–1237, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29499099>>. Acesso em: 6 out. 2018.

HALL, John Edward; GUYTON, Arthur C. **Guyton & Hall tratado de fisiologia médica**. 13. ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. Disponível em: <<https://www.evolution.com.br/product/guyton-e-hall-tratado-de-fisiologia-mdica>>

HE, Ming; CALLANAN, Anthony. Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. **Tissue Engineering. Part B, Reviews**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 194–208, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23083305>>. Acesso em: 9 out. 2018.

HORWITZ, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 393–395, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236628>>. Acesso em: 6 out. 2018.

HOSSEINKHANI, Mohsen et al. Tissue Engineered Scaffolds in Regenerative Medicine. **World Journal of Plastic Surgery**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 3, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4236978/>>. Acesso em: 4 out. 2018.

HRONIK-TUPAJ, Marie; KAPLAN, David L. A Review of the Responses of Two- and Three-Dimensional Engineered Tissues to Electric Fields. **Tissue Engineering. Part B, Reviews**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 167, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3357076/>>. Acesso em: 4 out. 2018.

HU, Xiaojun et al. Direct induction of hepatocyte-like cells from immortalized human bone marrow mesenchymal stem cells by overexpression of HNF4 α . **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 478, n. 2, p. 791–797, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X16312815>>. Acesso em: 13 out. 2018.

HUBBELL, J. A. Biomaterials in tissue engineering. **Bio/technology (Nature Publishing Company)**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 565–76, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634795>>. Acesso em: 4 out. 2018.

ISHIBASHI, Hiromi et al. Liver architecture, cell function, and disease. **Seminars in**

- Immunopathology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 399–409, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00281-009-0155-6>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- Jl, Ru et al. The differentiation of MSCs into functional hepatocyte-like cells in a liver biomatrix scaffold and their transplantation into liver-fibrotic mice. **Biomaterials**, [s. l.], v. 33, n. 35, p. 8995–9008, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961212009611?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- KAASI, Andreas et al. A new approach to heart valve tissue engineering: mimicking the heart ventricle with a ventricular assist device in a novel bioreactor. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 292–300, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/term.315>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- KEANE, Timothy J.; SWINEHART, Ilea T.; BADYLAK, Stephen F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods**, [s. l.], v. 84, p. 25–34, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.005>>
- KIM, Stephen S. et al. Dynamic Seeding and *in Vitro* Culture of Hepatocytes in a Flow Perfusion System. **Tissue Engineering**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 39–44, 2000. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/107632700320874>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- KOJIMA, H. et al. Establishment of practical recellularized liver graft for blood perfusion using primary rat hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells. **American Journal of Transplantation**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 1351–1359, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.14666>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- MAGHSOUDLOU, Panagiotis et al. Optimization of Liver Decellularization Maintains Extracellular Matrix Micro-Architecture and Composition Predisposing to Effective Cell Seeding. **PloS one**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. e0155324, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27159223>>. Acesso em: 9 out. 2018.
- MALARKEY, David E. et al. New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 27–34, 2005. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/01926230590881826>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- MARTIN, Ivan; WENDT, David; HEBERER, Michael. The role of bioreactors in tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 80–86, 2004.

- MARTIN, Yves; VERMETTE, Patrick. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. **Biomaterials**, [s. l.], v. 26, n. 35, p. 7481–7503, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961205004734?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- MATOS, Marvi A.; CICERONE, Marcus T. Alternating current electric field effects on neural stem cell viability and differentiation. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 664–670, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.389>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- MAURMANN, Natasha et al. Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. **Biomedical Physics & Engineering Express**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 045005, 2017. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/2057-1976/3/i=4/a=045005?key=crossref.f9a0979735d43d86bb78eb4fcd306bb9>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- MAZZA, Giuseppe et al. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 13079, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep13079>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- MCCUSKEY, R. S. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. **Liver**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 3–7, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10726955>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- MICHALOPOULOS, George K. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. **Hepatology**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 1384–1392, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.28988>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- MIZUKAMI, Amanda; SWIECH, Kamilla. Mesenchymal Stromal Cells: From Discovery to Manufacturing and Commercialization. **Stem cells international**, [s. l.], v. 2018, p. 4083921, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30057622>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- NAVARRO-TABLEROS, Victor et al. Recellularization of Rat Liver Scaffolds by Human Liver Stem Cells. **Tissue Engineering. Part A**, [s. l.], v. 21, n. 11–12, p. 1929, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4449720/>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- NAVARRO, FERNANDO A. et al. Perfusion of medium improves growth of human

- oral neomucosal tissue constructs. **Wound Repair and Regeneration**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 507–512, 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1524-475x.2001.00507.x>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- NETTER, Frank Henry; RIBEIRO, Eduardo Cotecchia; SALLES, Adilson Dias. **Atlas de anatomia humana**. 6. ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. Disponível em: <<https://www.evolution.com.br/product/netter-atlas-de-anatomia-humana-6ed>>
- O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136970211170058X>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- O'NEILL, John D. et al. Decellularization of Human and Porcine Lung Tissues for Pulmonary Tissue Engineering. **The Annals of Thoracic Surgery**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 1046–1056, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23870827>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- OGOKE, Ogechi; OLUWOLE, Janet; PARASHURAMA, Natesh. Bioengineering considerations in liver regenerative medicine. **Journal of Biological Engineering**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 46, 2017. Disponível em: <<https://jbioleng.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13036-017-0081-4>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- ORLANDO, Giuseppe et al. Production and Implantation of Renal Extracellular Matrix Scaffolds From Porcine Kidneys as a Platform for Renal Bioengineering Investigations. **Annals of Surgery**, [s. l.], v. 256, n. 2, p. 363–370, 2012. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000658-201208000-00026>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- OTT, Harald C. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 213–221, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm1684>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- OTT, Harald C. et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 927–933, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm.2193>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- PAIM, A. et al. Human dental pulp stem cell adhesion and detachment in polycaprolactone electrospun scaffolds under direct perfusion. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 51, n. 5, 2018. a. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2018000500615&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 4 out. 2018.

PAIM, Ágata et al. Relevant biological processes for tissue development with stem cells and their mechanistic modeling: A review. **Mathematical Biosciences**, [s. l.], v. 301, p. 147–158, 2018. b. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025556417303243>>. Acesso em: 4 out. 2018.

PAIM, Ágata et al. Mesenchymal stem cell cultivation in electrospun scaffolds: mechanistic modeling for tissue engineering. **Journal of Biological Physics**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 245–271, 2018. c. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s10867-018-9482-y>>. Acesso em: 4 out. 2018.

PALAKKAN, Anwar A. et al. Liver tissue engineering and cell sources: issues and challenges. **Liver International**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 666–676, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/liv.12134>>. Acesso em: 6 out. 2018.

PAN, Jun et al. In-vivo organ engineering: Perfusion of hepatocytes in a single liver lobe scaffold of living rats. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 80, p. 124–131, 2016. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272516303028?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 out. 2018.

PARK, Joong Yull et al. Differentiation of Neural Progenitor Cells in a Microfluidic Chip-Generated Cytokine Gradient. **Stem Cells**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 2646–2654, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/stem.202>>. Acesso em: 4 out. 2018.

PELLEGATA, Alessandro F.; TEDESCHI, Alfonso M.; DE COPPI, Paolo. Whole Organ Tissue Vascularization: Engineering the Tree to Develop the Fruits. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 6, n. May, p. 1–13, 2018.

Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2018.00056/full>>

PETERSEN, Thomas H. et al. Tissue-Engineered Lungs for in Vivo Implantation.

Science (New York, N.Y.), [s. l.], v. 329, n. 5991, p. 538, 2010. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3640463/>>. Acesso em: 4 out. 2018.

PITTINGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 284, n. 5411, p. 143–7, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814>>. Acesso em: 6 out. 2018.

RADISIC, Milica et al. **Functional assembly of engineered myocardium by**

electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. [s.l: s.n.].

Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0407817101>. Acesso em: 4 out. 2018.

RAPPAPORT, A. M. et al. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology. **The Anatomical Record**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 11–33, 1954. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1002/ar.1091190103>>. Acesso em: 4 out. 2018.

REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clinical biochemistry**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 225–9, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8740508>>. Acesso em: 3 out. 2018.

RÖDLING, Lisa et al. 3D models of the hematopoietic stem cell niche under steady-state and active conditions. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 4625, 2017.

Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-04808-0>>. Acesso em: 4 out. 2018.

SABETKISH, Shabnam et al. Whole-organ tissue engineering: Decellularization and recellularization of three-dimensional matrix liver scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 1498–1508, 2015. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.35291>>. Acesso em: 6 out. 2018.

SALEM, Husein K.; THIEMERMANN, Chris. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 585–96, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967788>>.

Acesso em: 6 out. 2018.

SANTORO, Rosaria et al. Bioreactor based engineering of large-scale human cartilage grafts for joint resurfacing. **Biomaterials**, [s. l.], v. 31, n. 34, p. 8946–8952, 2010. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296121001015X>>. Acesso em: 4 out. 2018.

SCARRIT, Michelle E.; PASHOS, Nicholas C.; BUNNELL, Bruce A. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 3, p. 43, 2015. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00043/abstract>>. Acesso em: 2 out. 2018.

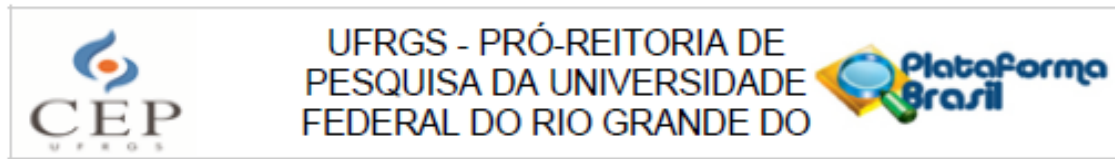
SHAHIN, Kifah; DORAN, Pauline M. Strategies for Enhancing the Accumulation and

- Retention of Extracellular Matrix in Tissue-Engineered Cartilage Cultured in Bioreactors. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. e23119, 2011. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0023119>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- SHAKOURI-MOTLAGH, Aida et al. Native and solubilized decellularized extracellular matrix: A critical assessment of their potential for improving the expansion of mesenchymal stem cells. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 55, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.04.014>>
- SILVERTHORN, Dee Unglaub et al. **Fisiologia humana : uma abordagem integrada**. 5. ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- SOHLENIUS-STERNEBECK, Anna-Karin. Determination of the hepatocellularity number for human, dog, rabbit, rat and mouse livers from protein concentration measurements. **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 1582–1586, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088723330600124X?via%3Dihub>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- SONG, Lei et al. Successful Development of Small Diameter Tissue-Engineering Vascular Vessels by Our Novel Integrally Designed Pulsatile Perfusion-Based Bioreactor. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. e42569, 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0042569>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- STEFFENS, D. et al. A new biomaterial of nanofibers with the microalga *Spirulina* as scaffolds to cultivate with stem cells for use in tissue engineering. **Journal of biomedical nanotechnology**, United States, v. 9, n. 4, p. 710–718, 2013.
- STEFFENS, Daniela et al. **Update on the main use of biomaterials and techniques associated with tissue engineering** *Drug Discovery Today* Elsevier Current Trends, , 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644617305792?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- SULLIVAN, David C. et al. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. **Biomaterials**, [s. l.], v. 33, n. 31, p. 7756–64, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22841923>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- TAKAHASHI, Kazutoshi; YAMANAKA, Shinya. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, [s. l.], v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006. Disponível em:

- <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904174>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- TAYLOR, Doris A. et al. Decellularized matrices in regenerative medicine. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 74, p. 74–89, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.044>>
- TIKHOMIROVA, T. S.; TARASKEVICH, M. S.; PONOMARENKO, O. V. The role of laboratory-scale bioreactors at the semi-continuous and continuous microbiological and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 102, n. 17, p. 7293–7308, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-9194-z>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- TIMARU, Cristina-Mihaela et al. Matrix regenerative therapy. **Romanian journal of ophthalmology**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 2–10, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29450364>>. Acesso em: 9 out. 2018.
- TONIUTTO, Pierluigi et al. Current challenges and future directions for liver transplantation. **Liver International**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 317–327, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/liv.13255>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- TROWBRIDGE, J. M.; GALLO, R. L. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. **Glycobiology**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 117R–125R, 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwf066>>. Acesso em: 9 out. 2018.
- UYGUN, Basak E. et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. **Nature medicine**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 814, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2930603/>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- VILARINHO, Silvia; LIFTON, Richard P. Liver Transplantation: From Inception to Clinical Practice. **Cell**, [s. l.], v. 150, n. 6, p. 1096–1099, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286741201063X?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- WALLDORF, J. et al. Expanding hepatocytes in vitro before cell transplantation: donor age-dependent proliferative capacity of cultured human hepatocytes. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 584–593, 2004. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00365520410005586>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- WANG, Xiaojun et al. Decellularized liver scaffolds effectively support the proliferation and differentiation of mouse fetal hepatic progenitors. **Journal of**

- Biomedical Materials Research Part A**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 1017–1025, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23625886>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- WANG, Yujia et al. Recent Advances in Decellularization and Recellularization for Tissue-Engineered Liver Grafts. **Cells Tissues Organs**, [s. l.], v. 204, n. 3–4, p. 125–136, 2017. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/479597>>. Acesso em: 9 out. 2018.
- WEI, Xin et al. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. **Acta pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 747–54, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23736003>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- WYNNE, Hilary A. et al. The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. **Hepatology**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 297–301, 1989. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.1840090222>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- YAGI, Hiroshi et al. Human-Scale Whole-Organ Bioengineering for Liver Transplantation: A Regenerative Medicine Approach. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 231–242, 2013. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/full/10.3727/096368912X654939>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- YU, J.; THOMSON, J. A. Pluripotent stem cell lines. **Genes & Development**, [s. l.], v. 22, n. 15, p. 1987–1997, 2008. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.1689808>>. Acesso em: 6 out. 2018.
- ZHANG, JianSe et al. In vivo regeneration of renal vessels post whole decellularized kidneys transplantation. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 38, p. 40433–42, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26575172>>. Acesso em: 14 out. 2018.
- ZHAO, Junjie et al. Bioreactors for tissue engineering: An update. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 109, p. 268–281, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.018>>
- ZHONG, Jian-Jiang. Recent advances in bioreactor engineering. **Korean Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 1035–1041, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11814-010-0277-5>>. Acesso em: 4 out. 2018.

ANEXO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fígado e traqueia: descclularização e recelularização com células-tronco de dente e cultivos em biorreatores

Pesquisador: Patricia Helena Lucas Pranke

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68383417.0.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS - FINEP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.522.064

Apresentação do Projeto:

Dentes decíduos serão obtidos de pacientes submetidos a exodontia na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e dos Termos de Assentimento e de Doação pelo paciente e pelo responsável, o dente será recolhido e transportado até o laboratório da Faculdade de Farmácia da UFRGS para isolamento das células-tronco (CT). Posteriormente será avaliado o comportamento in vitro das CT em um biomaterial e em tecidos descclularizados.

Objetivo da Pesquisa:

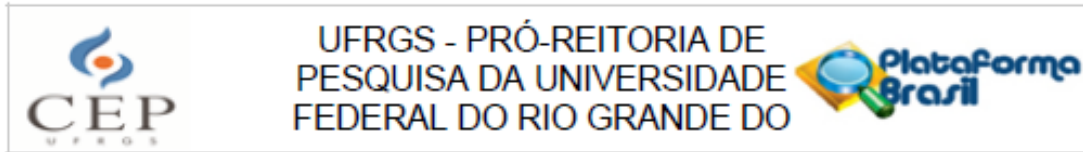
O presente estudo visa descclularizar dois diferentes órgãos: o fígados de ratos e traqueias de porcos e recelularizar essas matrizes com células-tronco e células-tronco diferenciadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de projeto bastante similar a outro projeto avaliado e aprovado pelo CEP UFRGS. Existe menção de submissão ao CEUA UFRGS, o que se faz necessário devido ao envolvimento de coleta de órgãos de animais de experimentação (a saber, ratos e porcos). Neste mesmo ponto, salienta-se que os animais doadores serão os mesmos envolvidos em projeto similar, e que portanto, haverá uma única manipulação destes indivíduos.

Os riscos e benefícios para seres humanos consistem exclusivamente das questões pertinentes à doação dos dentes decíduos, situação esta adequadamente abordada no projeto.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 2.522.064

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto com mérito científico e adequado no que tange às questões de ética em pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Está presente a folha de rosto devidamente assinada.

Há parecer consubstanciado da COMPESQ.

A Clínica Infanto-Juvenil da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FO-UFRGS), forneceu documento de concordância referente à abordagem de potenciais doadores de dentes decíduos.

Os Termos de assentimento, TCLE para o responsável pelos menores de idade e Termo de doação de dentes estão adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto com mérito científico e adequado no que tange às questões de ética em pesquisa.

Recomenda-se aprovação.

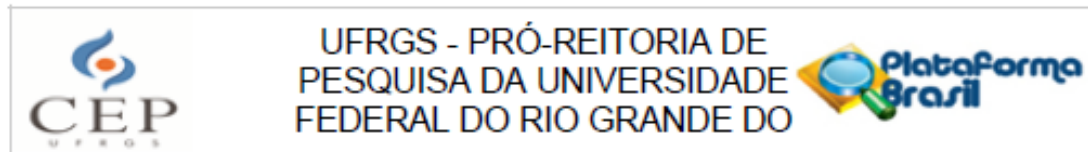
Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_756533.pdf	15/05/2017 16:09:36		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjTraqueiaFigadoSHED.docx	15/05/2017 16:09:07	MAURICIO FELISBERTO BORGES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Novo_Declaracao_infra_Faculdade_odontologia.pdf	07/04/2017 10:46:28	MAURICIO FELISBERTO BORGES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	PARECER_COMPESQ_182017.pdf	07/04/2017 10:43:34	MAURICIO FELISBERTO BORGES	Aceito
Folha de Rosto	Assinatura_folha_de_rosto_Plataforma_Brasil.pdf	27/03/2017 14:54:15	MAURICIO FELISBERTO BORGES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Novo_TermoAssentimento.docx	07/03/2017 12:41:34	MAURICIO FELISBERTO BORGES	Aceito

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-050
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 2.522.064

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Novo_TermoDoacao.docx	07/03/2017 12:41:23	MAURICIO FELISBERTO BORGES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Novo_TermosConsentimento.docx	07/03/2017 12:41:14	MAURICIO FELISBERTO BORGES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 01 de Março de 2018

Assinado por:
José Artur Bogo Chies
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br