



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

**TADEU ÉRITON CALIMAN ZANARDO**

**DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇO DESCELULARIZADO PARA**  
**USO EM BIOENGENHARIA TECIDUAL ESPLÊNICA**

**VITÓRIA**

**2020**

**TADEU ÉRITON CALIMAN ZANARDO**

**DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇO DESCELULARIZADO PARA  
USO EM BIOENGENHARIA TECIDUAL ESPLÊNICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

VITÓRIA  
2020

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

---

Z27d Zanardo, Tadeu Ériton Caliman Zanardo, 1991-  
DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇO  
DESCELULARIZADO PARA USO EM BIOENGENHARIA  
TECIDUAL ESPLÊNICA / Tadeu Ériton Caliman Zanardo  
Zanardo. - 2020.  
95 f. : il.

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

1. Baço. 2. Bioengenharia. 3. Descelularização. 4. Recelularização. I. Nogueira, Breno Valentim. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

# **DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇO DESCELULARIZADO PARA USO EM BIOENGENHARIA TECIDUAL ESPLÊNICA**

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

Apresentada em: 27 de março de 2020.

---

**Prof. Dr. BRENO VALENTIM NOGUEIRA**  
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador

---

**Prof. Dr. DANIEL CLAÚDIO DE OLIVEIRA GOMES**  
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro Externo

---

**Prof. Dr. CARLOS MAGNO DA COSTA MARANDUBA**  
Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora  
Membro Externo

---

**Prof. Dr. ALEX BALDUINO DE SOUZA**  
Instituição: Universidade Veiga de Almeida  
Membro Externo

---

**Prof. Dr. MARCO CESAR CUNEGUNDES GUIMARÃES**  
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro Interno

VITÓRIA  
2020

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por sempre conduzir e guiar os meus passos.

A minha família.

À Keila, por ser minha companheira, amiga, namorada e esposa, sempre me ajudando e apoiando durante essa caminhada.

Aos professores Breno Valentim Nogueira e Marco César Cunegundes Guimarães, exemplos de pessoas e profissionais. Obrigado pela confiança e orientação no desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os membros da família LUCCAR.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – código de financiamento 001) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).

Ao apoio institucional da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM-UFES), Laboratório de Imunobiologia (UFES) e Instituto Butantan pelas análises.

## RESUMO

ZANARDO, T.E.C. **Desenvolvimento de arcabouço descelularizado para uso em bioengenharia tecidual esplênica. 2020. 95f.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O baço já foi considerado um órgão não essencial para a vida. No entanto, sua importância é cada vez mais clara, dados os graves distúrbios causados por sua ausência ou disfunção, como maior susceptibilidade a infecções, tromboembolismo e câncer. Além disso, sabe-se que sua não funcionalidade pode levar pacientes com doenças graves, como HIV, mieloma e leucemia, a apresentar um maior risco de infecção e morte. Desse modo, utilizamos a técnica de descelularização para obtenção de um arcabouço esplênico viável para recelularização e posterior transplante para o hospedeiro. Em nosso estudo, demonstramos que o arcabouço criado após o processo de descelularização apresenta grande remoção do conteúdo de DNA e SDS residual, os quais são essenciais e necessários para evitar respostas imunogênicas e falhas após o transplante. Além disso, houve preservação dos principais componentes do matrissoma esplênico como colágenos, glicoproteínas e proteoglicanos. Da mesma forma, observamos a manutenção de importantes componentes estruturais como polpa branca, zona marginal e polpa vermelha, além de vasos sanguíneos de pequeno, médio e grande calibre. O arcabouço por nós desenvolvido foi posteriormente recelularizado com células estromais do baço de ratos neonatos, onde verificamos a capacidade de adesão, proliferação, viabilidade e sobrevivência das células em contato com o arcabouço. Portanto, o arcabouço esplênico se mostra muito promissor para estudos que pretendam utilizá-lo para a recuperação da função esplênica ou mesmo como suporte para estudos que planejem estudar alterações na matriz extracelular esplênica causadas por doenças.

Palavras-chave: Arcabouço esplênico, Descelularização, Matriz extracelular, Análise proteômica, Recelularização.

## **ABSTRACT**

ZANARDO, T.E.C. **Development of decellularized scaffold for use in splenic tissue bioengineering. 2020. 95f.** Thesis (Doctoral in Biotechnology) - Northeast Biotechnology Network - RENORBIO, UFES, Espírito Santo. Brazil.

The spleen has already been considered a non-essential organ for life. However, its importance is increasingly clear, given the serious disorders caused by its absence or dysfunction, such as increased susceptibility to infections, thromboembolism and cancer. In addition, it is known that its non-functionality may lead to patients already afflicted with serious diseases such as HIV, myeloma and leukemia to have a higher risk of infection and death. Therefore, we used the technique of decellularization to obtain a viable splenic scaffold for recellularization and subsequent transplantation to the host. In our study, we demonstrated that the scaffold created after the decellularization process shows great removal of the DNA content and residual SDS, which are essential and necessary to avoid immunogenic responses and failures after transplantation to the host. In addition, there were preservation of the major components of matrisome, such as collagens, glycoproteins and proteoglycans. In the same way, we observed maintenance of important structural components such as white pulp, marginal zone and red pulp, in addition to small, medium and large caliber blood vessels. The scaffold developed by us was subsequently recellularized with stromal cells from the spleen of neonate rats, where we verified the ability of adhesion, proliferation, viability and survival of cells in contact with the scaffold. Therefore, the splenic scaffold proves to be very useful for studies that intend to use it for the recovery of splenic function or even as a support for studies that intend to study changes in the splenic extracellular matrix caused by diseases.

**Key words:** Spleen scaffold, Decellularization, Extracellular matrix, Proteomic analysis, Recellularization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Estrutura e composição do baço .....	16
<b>Figura 2-</b> Estrutura e composição da polpa branca do baço de ratos e humanos ....	17
<b>Figura 3-</b> Estrutura e composição celular da zona marginal do baço .....	18
<b>Figura 4-</b> Estrutura e circulação sanguínea nos sinusóides esplênicos da polpa vermelha .....	19
<b>Figura 5-</b> Localização das células estromais e de alguns leucócitos no baço .....	21
<b>Figura 6-</b> Visão geral esquemática simplificada da MEC, com seus principais componentes.....	25
<b>Figura 7-</b> Estrutura e organização do colágeno .....	26
<b>Figura 8-</b> Estrutura da molécula de fibronectina .....	28
<b>Figura 9-</b> Estrutura da molécula de laminina .....	29
<b>Figura 10-</b> Estrutura dos proteoglicanos e GAGs .....	31
<b>Figura 11-</b> Estrutura das integrinas.....	33
<b>Figura 12-</b> Principais diferenças entre a constituição da MEC nos distintos compartimentos esplênicos .....	36
<b>Figura 13-</b> Exemplos de biomateriais comumente usados na bioengenharia tecidual .....	38
<b>Figura 14-</b> Marcos das técnicas usadas para descelularização e recelularização de órgãos .....	39
<b>Figura 15-</b> Principais estratégias de descelularização.....	42
<b>Figura 16-</b> Principais estratégias de recelularização .....	45
<b>Figura 17-</b> Esquema demonstrando o processo de descelularização utilizado para o baço .....	50
<b>Figura 18 -</b> Esquema simplificado demonstrando o processo de quantificação de DNA no Nanodrop 2000.....	52
<b>Figura 19 -</b> Adição de clorofórmio nas amostras diluídas para determinação do conteúdo de SDS residual.....	53
<b>Figura 20 -</b> Placa de 96 poços com amostras de tecido e dos padrões, para leitura e quantificação espectrofotométrica de GAGs .....	54
<b>Figura 21-</b> Placa de 96 poços com amostras de tecido e dos padrões, para leitura e quantificação espectrofotométrica da 4-hidroxiprolina.....	55

<b>Figura 22-</b> Microscopia eletrônica de transmissão. a) Ultramicrótomo. b) Vista parcial do microscópio eletrônico de transmissão. Fonte: Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins – LUCCAR-UFES .....	56
<b>Figura 23</b> - Microscopia eletrônica de varredura.....	57
<b>Figura 24</b> - Esquema simplificado do processo de extração e análise dos peptídeos .....	59
<b>Figura 25</b> - Esquema simplificado demonstrando o processo usado para o isolamento das células estromais do baço de ratos neonatos.....	60
<b>Figura 26</b> - Esquema simplificado demonstrando o processo de semeadura das células estromais no arcabouço pelo método de perfusão celular .....	62
<b>Figura 27</b> - Esquema simplificado demonstrando o processo de semeadura das células estromais no arcabouço pelo método de cultivo direto.....	62
<b>Figura 28</b> - Conversão da resazurina para resorufina após metabolização celular ..	64
<b>Figura 29-</b> Processo de descclularização do baço .....	66
<b>Figura 30-</b> Avaliação do processo de descclularização.....	68
<b>Figura 31-</b> Análise ultraestrutural do arcabouço esplênico .....	69
<b>Figura 32-</b> Análise por infravermelho do arcabouço descclularizado.....	72
<b>Figura 33-</b> Conteúdo celular e matrissomal antes e após o processo de descclularização do baço .....	74
<b>Figura 34</b> - Recelularização do arcabouço esplênico .....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais células estromais esplênicas e suas funções .....	23
<b>Tabela 2</b> - Moléculas expressas no baço de camundongos, ratos e humanos .....	34
<b>Tabela 3</b> - Relação de proteínas matrissomais presentes e ausentes em tecidos esplênicos nativos e descclularizados com sua intensidade média. ....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**mm** – milímetro

**ZM** – zona marginal

**MEC** – matriz extracelular

**GAGs** – glicosaminoglicanos

**TGF- $\beta$**  – *transforming growth factor beta*

**SDS** – dodecil sulfato de sódio

**CHAPS** – 3 - [(3-colamidopropil) dimetilamônio] -1-propanossulfonato

**PALSs** – bainhas linfáticas periarteriais

**ZM** – zona marginal

**AC** – artéria central

**CG** – centro germinativo

**PV** – polpa vermelha

**z. manto** – zona do manto

**mmHg** – milímetros de mercúrio

**HE** - hematoxilina e eosina

**PAS** - ácido periódico de *Schiff*

**MB** – *methylene blue*

**HCL** – ácido clorídrico

**EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético

**NaCl** – cloreto de sódio

**$\mu\text{g/ml}$**  – micrograma/mililitro

**mg** – miligrama

**$\mu\text{L}$**  – microlitro

**NaOH** – hidróxido de sódio

**kPa** – kiloPascal

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – ácido sulfúrico

**MEV** – microscopia eletrônica de varredura

**MET** – microscopia eletrônica de transmissão

**nm** – nanômetros

**mM** – milimolar

**g** – gramas

**mg/kg** – miligramas/kilogramas

**H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>** – água destilada

**ml/min** – mililitros/minuto

**PBS** – Tampão fosfato de sódio

**µm** – micrometros

**PA** – padrão analítico

**min** – minutos

**°C** – graus Celsius

**M** – concentração molar

**pH** – potencial hidrogeniônico

**NaCl** – cloreto de sódio

**(v/v)** – volume/volume

**HCl** – ácido clorídrico

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**kV** – quilovolts

**cm<sup>-1</sup>** – centímetros<sup>-1</sup>

**p:v** – peso/volume

**DTT** – Ditioneitol

**m/z** – Relação massa/carga

**Da** – Daltons

**FTIR** – espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

**SFB** – soro fetal bovino

**PPM** – partes por milhão

**RPM** – rotações por minuto

**FRCs** – células reticulares fibroblásticas

**FDCs** – células dendríticas foliculares

**MRCs** – células reticulares marginais

# SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1	O BAÇO.....	15
2.1.1	Polpa Branca e Zona Marginal.....	16
2.1.2	Polpa Vermelha.....	19
2.1.3	Células Estromais.....	20
2.2	A MATRIZ EXTRACELULAR.....	24
2.2.1	Colágenos .....	25
2.2.2	Glicoproteínas.....	27
2.2.3	Proteoglicanos e Glicosaminoglicanos .....	30
2.2.4	Reguladores da MEC e Fatores Secretados.....	31
2.2.5	Proteínas Afiliadas a MEC.....	32
2.2.6	A Matriz Extracelular do Baço .....	33
2.3	A BIOENGENHARIA TECIDUAL.....	37
2.3.1	Descelularização.....	38
2.3.2	Recelularização.....	42
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>46</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	48
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
<b>5.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>49</b>
5.1	ANIMAIS.....	49
5.2	DESCELULARIZAÇÃO .....	49
5.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DOS COMPONENTES DA MEC.....	50
5.4	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA RESIDUAL.....	51
5.5	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE SDS RESIDUAL.....	52
5.6	QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS (GAGs).....	53
5.7	QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO .....	54
5.8	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL .....	55
5.9	ANÁLISE POR INFRAVERMELHO .....	57
5.10	ANÁLISE PROTEÔMICA .....	58
5.11	RECELULARIZAÇÃO.....	60
5.11.1	Isolamento Celular.....	60
5.11.2	Semeadura Celular .....	61

5.11.2.1	Semeadura do Arcabouço com Perfusão Celular .....	61
5.11.2.2	Cultivo Direto das Células Sobre o Arcabouço .....	62
<b>5.11.3</b>	<b>Avaliação do Processo de Recelularização .....</b>	<b>63</b>
5.11.3.1	Análise Histológica do Arcabouço Recelularizado .....	63
5.11.3.2	Avaliação da Viabilidade e Proliferação .....	63
5.11.3.3	Adesão Celular .....	64
5.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	65
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
6.1	DESCELULARIZAÇÃO DO BAÇO .....	66
6.2	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA .....	67
6.2	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL .....	69
6.3	ANÁLISE POR INFRAVERMELHO .....	70
6.4	ANÁLISE PROTEÔMICA .....	72
6.5	RECELULARIZAÇÃO .....	76
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>94</b>
<b>11.</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....</b>	<b>95</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O baço é um órgão de grande importância para os seres humanos, estando presente em todos os vertebrados (STEINIGER, 2015). Durante o desenvolvimento embrionário é um dos primeiros locais de hematopoese, o qual se mantém até o quinto mês de gestação (KODAMA; DAVIS; FAUSTMAN, 2005). Após seu amadurecimento, apesar de abrigar a hematopoese em casos de estresse e doença, concentra-se em uma ampla variedade de funções imunológicas e hematológicas (BORGES DA SILVA et al., 2015; CESTA, 2006; KODAMA; DAVIS; FAUSTMAN, 2005; MEBIUS; KRAAL, 2005; WELEDJI, 2014).

O parênquima esplênico é altamente compartimentado, abrigando duas áreas morfológicamente distintas (polpa branca e polpa vermelha), que são separadas por uma interface chamada zona marginal (BRONTE; PITTET, 2013). O sangue arterial entra no baço através da artéria esplênica e é transportado para os sinusóides da zona marginal, ramificando-se depois em arteríolas centrais. Em torno deles há uma massa de acúmulos de células do tecido linfoide, abrigando principalmente linfócitos B e T (polpa branca) (DEN HAAN; KRAAL, 2012). Esses linfócitos circulam continuamente e são capazes de agir prontamente através da produção de anticorpos e ativação de linfócitos específicos contra antígenos transportados pelo sangue (STEINIGER, 2006). Na zona marginal, o sangue flui através dos cordões da polpa vermelha para os seios venosos. Esta passagem permite a seleção de patógenos, células e seus detritos, além de hemácias envelhecidas e/ou anormais para fagocitose por macrófagos residentes nos cordões da polpa vermelha (DEN HAAN; KRAAL, 2012). Esse processo é de grande importância para a reciclagem do ferro presente nas hemácias (GANZ, 2016). Também apresenta grande importância na resposta contra bactérias encapsuladas, como *Streptococcus pneumoniae*, que são destruídas principalmente no baço (IIJIMA, 2017; TANIGUCHI; CORREIA; ZAMPIERI, 2014).

Várias doenças podem levar a uma redução na função do baço chamada hiposplenia. Esta condição está associada a doenças congênitas, imunológicas, hematológicas, infecciosas e gastrointestinais, como anemia falciforme, doença celíaca, infecção pelo HIV e artrite reumatoide (DI SABATINO; CARSETTI; CORAZZA, 2011). Por outro lado, a perda completa da função esplênica é chamada de asplenia (TANIGUCHI;

CORREIA; ZAMPIERI, 2014). Asplenia é caracterizada por ser um distúrbio raramente congênito, mais frequente como consequência de intervenção cirúrgica (esplenectomia), sendo o trauma e o câncer abdominal suas principais causas (DI SABATINO; CARSETTI; CORAZZA, 2011; RAM; LEWIS; RICE, 2010; TANIGUCHI; CORREIA; ZAMPIERI, 2014). Embora a hiposplenia e a asplenia possam aumentar as chances de desenvolvimento de complicações tromboembólicas e câncer (KRISTINSSON et al., 2014), as principais complicações estão relacionadas a eventos imunológicos e infecciosos (DI SABATINO; CARSETTI; CORAZZA, 2011). Diversos estudos relataram a associação entre essas condições com o aumento da suscetibilidade a infecções por bactérias encapsuladas, com uma alta taxa de letalidade (50-70%) (DE PORTO et al., 2010; DEN HAAN; KRAAL, 2012; DI SABATINO; CARSETTI; CORAZZA, 2011; RAM; LEWIS; RICE, 2010).

Para manter a função esplênica diversas técnicas e métodos foram sugeridos. Entre eles, o uso de esplenose, quando viável e o máximo adiamento da cirurgia em crianças, quando possível (DI SABATINO; CARSETTI; CORAZZA, 2011). Além disso, é necessário o uso de vacinas e antibióticos de forma preventiva, devido ao risco e à incidência de infecções nesses pacientes (WELEDJI, 2014). Entretanto, as recomendações nem sempre são seguidas e/ou eficazes, levando a consequências graves, como sepse e morte (BOAM et al., 2017; IJIMA, 2017; RUBIN; SCHAFFNER, 2014; TANIGUCHI; CORREIA; ZAMPIERI, 2014).

O baço contém uma matriz extracelular (MEC) única com diferenças substanciais em relação à matriz da polpa branca, polpa vermelha e zona marginal (LOKMIC et al., 2008). Essas diferenças refletem-se nas funções celulares de cada nicho e são essenciais para o correto funcionamento do órgão (SONG et al., 2013). Neste trabalho foi realizado um extenso estudo da MEC, onde foi possível observar a manutenção de seus principais componentes após a descélularização, os quais são essenciais para o sucesso da recelularização e transplante do arcabouço (LONDONO; BADYLAK, 2015). Além disso, verificamos que o processo de descélularização utilizado remove grande parte do DNA e material celular da matriz, processo extremamente necessário para evitar rejeição após o transplante do arcabouço (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; LONDONO; BADYLAK, 2015). Posteriormente o arcabouço esplênico foi recelularizado com células estromais advindas do baço de ratos neonatos, onde verificamos a capacidade de adesão, proliferação e viabilidade das células em contato

com o arcabouço. Esperamos assim, que esse trabalho sirva de base para estudos que pretendam restaurar a função do baço ou mesmo para estudos que planejem avaliar o impacto de doenças sobre a MEC esplênica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

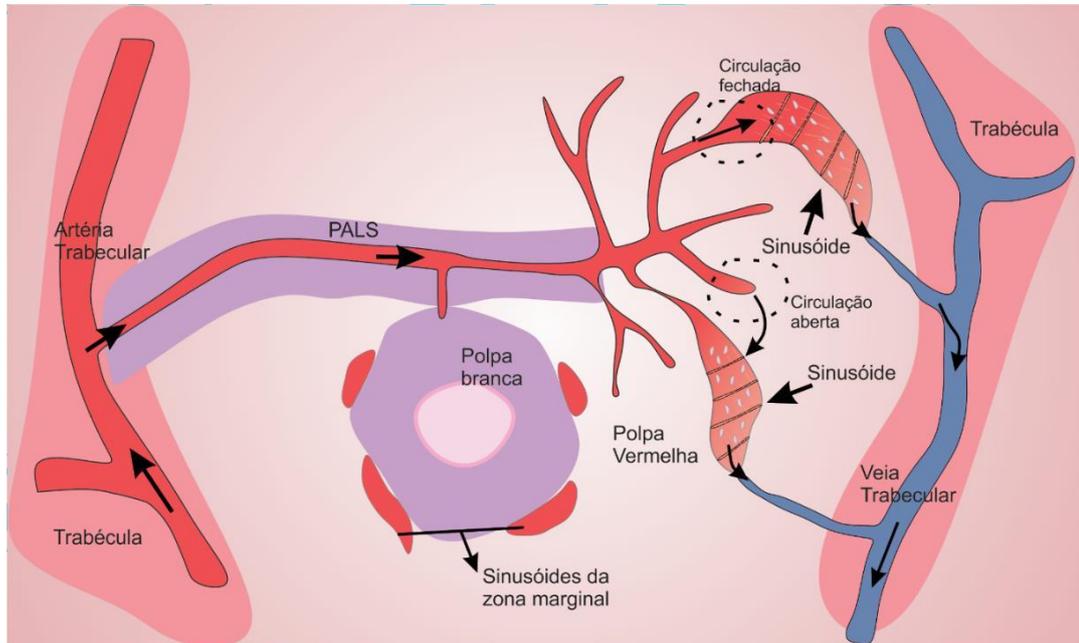
### 2.1 O BAÇO

O baço é um órgão presente em todas as espécies de vertebrados, sendo principalmente estudado em camundongos, ratos e humanos (STEINIGER, 2015). Durante o desenvolvimento embriológico, mais especificamente a partir da quinta semana de gestação, um grupo de células mesenquimais se agrupa e forma a base do órgão. Durante o segundo mês de gestação, se desenvolvem vasos primitivos no interior do órgão e inicia-se a formação de suas polpas. Do quarto ao oitavo mês de gestação, o baço é considerado como um órgão hematopoiético, sendo que esta função pode ser retida e ou recuperada se a medula óssea for incapaz de fornecer a hematopoese adequada (O'NEILL et al., 2011).

O baço possui uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo, formada por uma mistura de colágeno, fibras elásticas e células musculares lisas (POLÁK; GÁLFIOVÁ; VARGA, 2009). Em humanos, a cápsula mede entre 1,1–1,5 mm de espessura e é coberta por uma camada serosa, exceto no hilo, onde vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos entram no órgão. A cápsula possui duas camadas, as quais são determinadas pela orientação das duas fibras de colágeno, sendo espessas e uniformes, mas se tornando mais finas nas regiões mais profundas onde ocorre a transição para as polpas. A cápsula é contínua em sua superfície interna, com um sistema ricamente ramificado de trabéculas, que penetram e suportam as polpas e vasos de grande calibre (MEBIUS; KRAAL, 2005; TABLIN; CHAMBERLAIN; WEISS, 2002).

Além da cápsula, o baço é composto ainda por um parênquima, o qual comporta uma rede vascular e uma grande população de células (**Figura 1**). Baseado em sua estrutura e função, o baço pode ser visto como dois órgãos diferentes. Por um lado, a polpa branca do baço é uma parte importante do sistema imunológico envolvido no processo de proliferação de linfócitos e plasmócitos, bem como na produção de anticorpos. Por outro lado, a polpa vermelha está diretamente conectada a corrente sanguínea, estando envolvida na fagocitose de elementos sanguíneos. O baço apresenta ainda uma zona marginal, a qual possui esse nome porque encontra-se na

periferia da polpa branca e por outro lado, na sua superfície externa, mistura-se com a estrutura da polpa vermelha (TABLIN; CHAMBERLAIN; WEISS, 2002).



**Figura 1-** Estrutura e composição do baço. Fonte: Próprio autor.

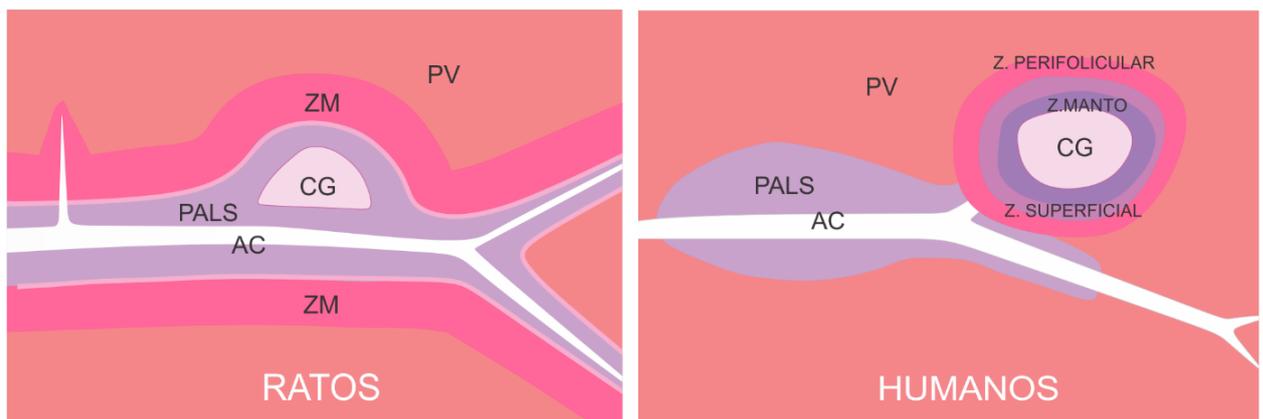
### 2.1.1 Polpa Branca e Zona Marginal

Em camundongos, ratos e humanos, o sangue é transportado para o baço por vários ramos da artéria esplênica que entra no hilo do órgão. Esses ramos se dividem ainda mais dentro do baço e alimentam as artérias trabeculares, que estão localizadas em filamentos de tecido conjuntivo denso contendo miofibroblastos originários da cápsula esplênica. As artérias então deixam as trabéculas e se tornam artérias centrais, as quais não possuem veias acompanhantes e são circundadas pela polpa branca. Linfócitos circulam continuamente através do baço e são atraídos para o lado externo dos vasos, de modo que formam a polpa branca em torno de artérias e arteríolas centrais (STEINIGER, 2015).

A polpa branca do baço de ratos e camundongos apresenta pequenas diferenças em relação a de humanos. Entre a polpa branca e a vermelha, existe um acúmulo de linfócitos B, chamado de zona marginal, a qual está ausente em humanos (STEINIGER, 2015). Em ratos, a polpa branca é composta por zonas de linfócitos T, as bainhas linfáticas periarteriais (*periarterial lymphatic sheaths* - PALSs); e zonas de linfócitos B, os folículos e a zona marginal (MZ) (GOLUB et al., 2018; TABLIN; CHAMBERLAIN; WEISS, 2002). Os PALS são acúmulos de linfócitos T ao redor das arteríolas. A maioria dos linfócitos T no PALS são CD4<sup>+</sup>, enquanto os linfócitos T CD8<sup>+</sup> formam uma população menor. Além de linfócitos T, o PALS abriga células dendríticas com MHC de classe II derivadas da medula óssea (STEINIGER, 2006).

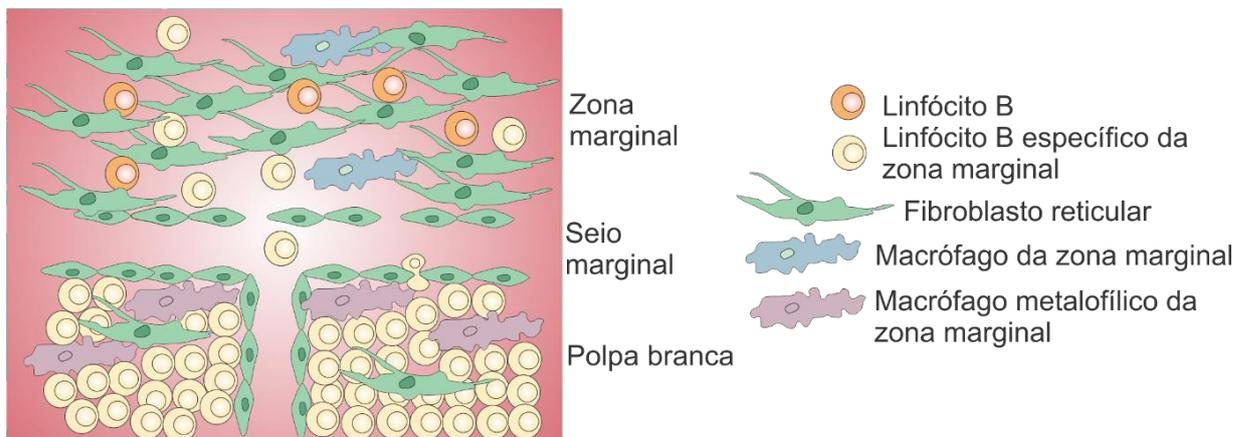
Os folículos consistem em um centro germinativo (GC) de linfócitos B. Em ratos, o PALS e o folículo são incorporados em uma zona marginal ampla e composta essencialmente por linfócitos B com núcleos relativamente claros e citoplasma abundante, que são morfologicamente diferentes dos linfócitos B do centro germinativo (STEINIGER, 2015).

De outro modo, os folículos secundários esplênicos humanos compreendem três zonas ao redor do centro germinativo de linfócitos B: uma zona do manto, uma zona superficial e uma zona perifolicular (**Figura 2**) (STEINIGER, 2015).



**Figura 2-** Estrutura e composição da polpa branca do baço de ratos e humanos. PALSs-bainhas linfáticas periarteriais; AC – artéria central; ZM – zona marginal; CG – centro germinativo; PV – polpa vermelha; z. manto – zona do manto; z.perifolicular – zona perifolicular. Fonte: Próprio autor.

A zona marginal do baço é uma área importante de trânsito para as células que estão deixando a corrente sanguínea e entrando na polpa branca (MEBIUS; KRAAL, 2005). Essa área contém muitas células residentes com propriedades únicas, mas que dependem também das outras para a sua localização, estabelecendo e mantendo a integridade da zona marginal. Dois subconjuntos de macrófagos específicos podem ser encontrados nessa área: macrófagos da zona marginal e macrófagos metalofílicos da zona marginal (**Figura 3**) (DEN HAAN; KRAAL, 2012).

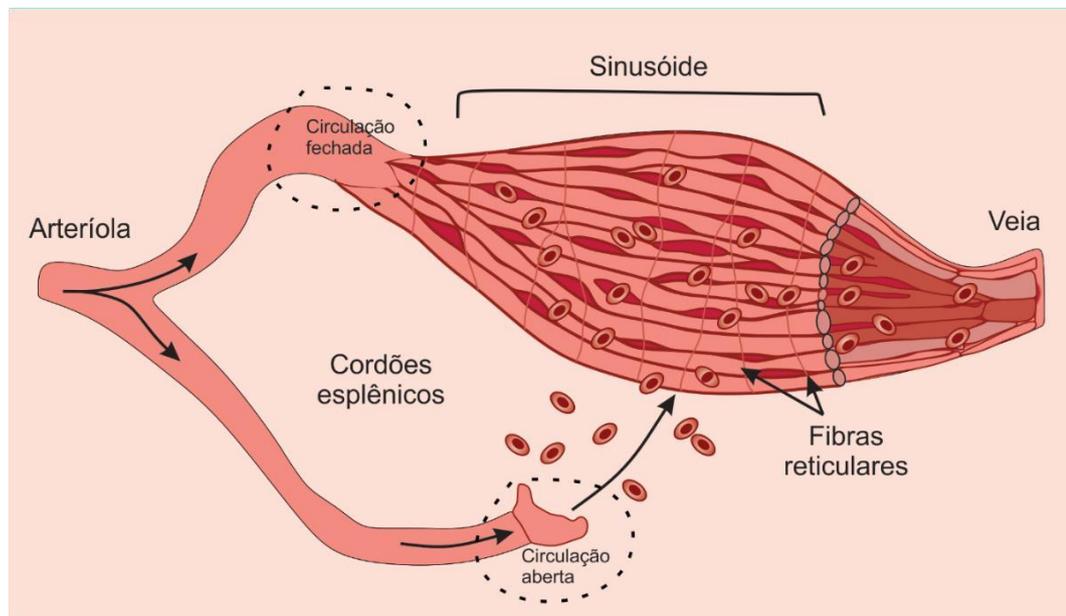


**Figura 3-** Estrutura e composição celular da zona marginal do baço. Fonte: adaptado de (MEBIUS; KRAAL, 2005).

O modo como o baço é estruturado, de forma que a maioria do fluxo sanguíneo passa pela zona marginal e diretamente ao longo da polpa branca, leva a eficiente monitorização do sangue pelo sistema imunitário (MEBIUS; KRAAL, 2005). Tanto repostas do sistema imune inato quanto do adaptativo podem ser eficientemente montadas, tornando-se um órgão importante para a homeostase imune. Além disso, as respostas imunes que são prejudiciais ao hospedeiro podem ser reguladas (BRONTE; PITTET, 2013). Enquanto que a polpa branca é restritamente envolvida com a imunidade adaptativa, a zona marginal está envolvida tanto na imunidade inata como na adaptativa, através de populações específicas de macrófagos e células B das zonas marginais (MEBIUS; KRAAL, 2005).

### 2.1.2 Polpa Vermelha

A polpa vermelha é constituída por artérias, arteríolas e veias, além de cordões e seios esplênicos (também chamados de sinusóides). Os cordões representam a parte "aberta" da circulação esplênica, que é formada por filamentos de tecido conjuntivo frouxo ocupado por linfócitos, plasmócitos, macrófagos, granulócitos, glóbulos vermelhos e plaquetas. Arteríolas terminais da polpa vermelha que surgem das arteríolas centrais, se abrem diretamente para os cordões esplênicos. Nos cordões o sangue se move para finalmente entrar nos seios esplênicos pelo lado de fora (MEBIUS; KRAAL, 2005). Uma proporção do sangue também pode entrar diretamente no começo das veias da polpa vermelha. Os seios esplênicos são vasos especializados, sendo considerados como parte "fechada" da vasculatura esplênica. No entanto, as paredes dos seios esplênicos são revestidas por endotélio com fendas intercelulares, as quais permitem a entrada de células vermelhas e brancas dos cordões. Estes endotélios especializados exibem um fenótipo diferente de todos os outros endotélios do corpo (**Figura 4**) (MEBIUS; KRAAL, 2005).



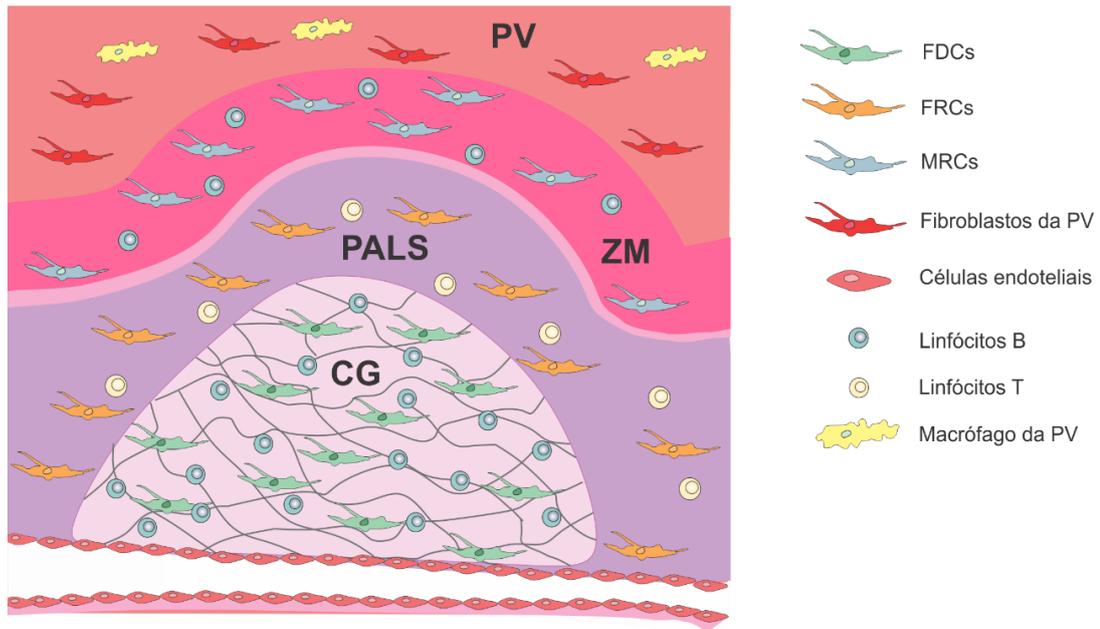
**Figura 4-** Estrutura e circulação sanguínea nos sinusóides esplênicos da polpa vermelha. Fonte: adaptado de (MESCHER, 2014).

Essas pequenas aberturas não apresentam nenhum obstáculo às plaquetas, aos leucócitos ou para hemácias flexíveis. Entretanto, hemácias rígidas ou enfraquecidas são bloqueadas de passarem e tem remoção seletiva por macrófagos. A remoção de hemácias defeituosas com consequente reciclagem de seu ferro são uma das principais funções da polpa vermelha. O ferro liberado da hemoglobina durante a degradação dos eritrócitos é armazenado por macrófagos dentro de complexos de proteínas, tais como a ferritina ou transferrina, voltando à circulação para posterior reutilização (MESCHER, 2014).

### 2.1.3 Células Estromais

Os órgãos linfoides secundários apresentam como característica uma compartimentação imunológica, a qual se mostra extremamente importante para o correto desempenho de suas funções. Esta é mantida graças a uma complexa relação entre moléculas de adesão célula-célula, citocinas e fatores quimiotáticos, produzidos e expressos principalmente por seus constituintes não hematopoiéticos, tais como as células estromais (LOKMIC et al., 2008; MALHOTRA; FLETCHER; TURLEY, 2013).

O *pool* estromal não endotelial do baço é composto por células reticulares fibroblásticas gp38<sup>+</sup> CD31<sup>-</sup> (*fibroblastic reticular cells* - FRCs) da zona de linfócitos T e células estromais gp38<sup>-</sup> CD31<sup>-</sup> das zonas de linfócitos B, que incluem células dendríticas foliculares (*follicular dendritic cells* - FDCs) e células reticulares marginais (*marginal reticular cells* - MRCs) localizadas na região externa do folículo. Além disso, fibroblastos da polpa vermelha e células endoteliais também estão presentes e distribuídos nos diferentes compartimentos esplênicos (**FIGURA 5**) (GOLUB et al., 2018).



**Figura 5-** Localização das células estromais e de alguns leucócitos no baço. PV - Polpa vermelha; ZM - Zona Marginal; PALS - Bainhas Linfáticas Periarteriais; CG - Centro Germinativo. Fonte: Próprio autor.

Na polpa branca do baço, as FRCs e FDCs orientam e direcionam as populações de células hematopoiéticas, formando áreas distintas de linfócitos T e B (TAN; WATANABE, 2017). As FRCs encontram-se conectadas entre si, servindo como um substrato adesivo para as células T e células dendríticas. Através da produção de diferentes quimiocinas, as FRCs guiam os linfócitos do seu local de entrada na zona marginal para o PALS, dentro do qual eles continuam a se mover (BAJÉNOFF; GLAICHENHAUS; GERMAIN, 2008). As FRCs também secretam colágeno e glicosaminoglicanos (GAGs), formando uma rede tridimensional chamada de condutos. Os condutos servem como uma peneira molecular, permitindo que pequenas moléculas (<70 kDa) possam ser transportadas e capturadas pelas células dendríticas, permitindo um rápido e eficiente encontro entre linfócitos T e antígenos apresentados pelas células dendríticas ativadas (DEN HAAN; MEBIUS; KRAAL, 2012).

Os compartimentos de linfócitos B, como o folículo e o centro germinativo são organizados e suportados pelas FDCs. Durante o desenvolvimento embrionário, em algumas regiões, a estrutura reticular dos FRCs é substituída por uma rede menos densa de FDCs. A substituição não é completa, existindo ainda um sistema de

condutos nos folículos de células B, permitindo a liberação de pequenas moléculas. Antígenos e complexos maiores são transportados para os folículos pelos macrófagos (DEN HAAN; MEBIUS; KRAAL, 2012).

As FDCs promovem o recrutamento de linfócitos B nos folículos através da secreção de CXCL13 que se liga ao receptor CXCR5 expresso nas células B. Esse tipo de célula estromal apresenta antígenos na forma de complexos imunes que são ligados via receptores Fc e complemento, estimulando as células B e promovendo a formação do centro germinativo (GENOVESE; BRENDOLAN, 2016).

A zona marginal, por sua vez, é suportada pelas MRCs, as quais são caracterizadas pela expressão de MAdCAM-1 e pela produção de CXCL13 (TAN; WATANABE, 2017). As MRCs contribuem para o acúmulo de FDCs durante a formação do centro germinativo (GENOVESE; BRENDOLAN, 2016). Além disso, expressam quimiocinas que podem levar à formação de nichos locais para células na zona marginal, como as células B da zona marginal, os macrófagos metalofílicos marginais e células dendríticas (DEN HAAN; MEBIUS; KRAAL, 2012; GENOVESE; BRENDOLAN, 2016).

Em outra parte do baço - na polpa vermelha - células estromais suportam e recrutam células efectoras, tais como os plasmócitos. Durante sua diferenciação, os plasmócitos apresentam sensibilidade aumentada a quimiocina CXCL12 - amplamente produzida na polpa vermelha do baço pelas células estromais - com diminuição da sensibilidade a CXCL13, CCL19 e CCL21 - expressas principalmente na polpa branca. Além disso, as células estromais da polpa vermelha, produzem interleucina-6 que é um fator importante para a produção de anticorpos e expressam a molécula de adesão CD54, que é um ligante para CD11a, encontrado em células plasmáticas (DEN HAAN; MEBIUS; KRAAL, 2012).

Além disso, as células estromais da polpa vermelha tem um papel central no suporte de células progenitoras hematopoiéticas. O nicho de células-tronco perivasculares esplênicas da polpa vermelha é composto por células estromais endoteliais e células estromais PDGFR $\beta^+$ , ambas produzindo o fator de nicho de células-tronco (*stem cell factor* - SCF). Além disso, a população estromal posicionada em torno dos sinusóides da polpa vermelha, expressa CXCL12, que é importante para a manutenção das células-tronco hematopoiéticas. Desse modo, a expressão de CXCL12 e SCF por

células estromais esplênicas é crítica para o recrutamento e manutenção de células-tronco hematopoiéticas durante a hematopoiese esplênica (GOLUB et al., 2018).

**Tabela 1-** Principais células estromais esplênicas e suas funções. Fonte: adaptado de (GOLUB et al., 2018).

<b>Tipo Celular</b>	<b>Localização</b>	<b>Principais funções</b>
<b>FRCs</b>	PALS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Produção de Quimiocinas</li> <li>- Suporte Estrutural</li> <li>- Formação de Condutos</li> <li>- Produção de MEC</li> <li>- Migração e Adesão de Linfócitos e Células Dentríticas</li> </ul>
<b>FDCs</b>	Folículos de Células B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Produção de Quimiocinas</li> <li>- Homeostase de Células B</li> <li>- Formação do Centro Germinativo</li> <li>- Formação de Condutos</li> <li>- Apresentação de complexos Imunes</li> </ul>
<b>MRCs</b>	Zona Marginal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suporte Estrutural</li> <li>- Produção de Quimiocinas</li> <li>- Migração de Linfócitos</li> </ul>
<b>Estromais da Polpa Vermelha</b>	Polpa Vermelha	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formação de Nichos de Células-tronco</li> <li>- Hematopoese extra medular</li> </ul>
<b>Endoteliais</b>	Vasos Sanguíneos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transporte de sangue</li> <li>- Entrada de Leucócitos e Antígenos</li> </ul>

## 2.2 A MATRIZ EXTRACELULAR

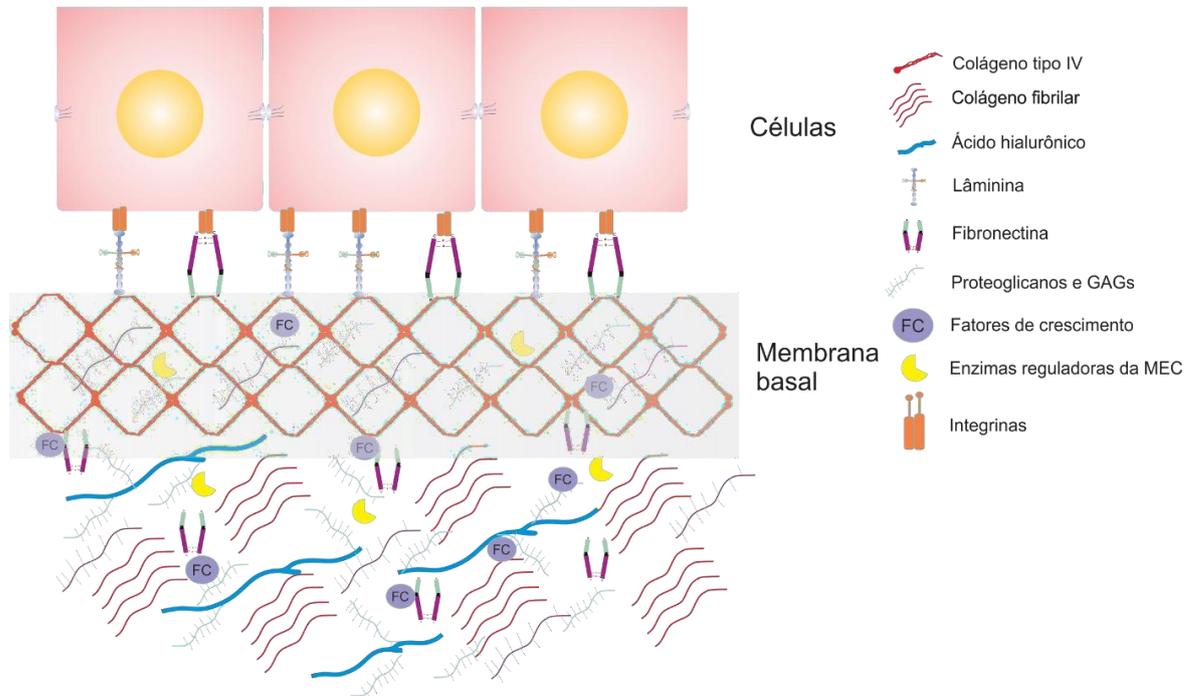
Todos os tecidos e órgãos contêm uma mistura de diferentes estruturas celulares e não celulares, as quais formam um conjunto de redes com alto nível de organização, as quais são chamadas de matriz extracelular (MEC) (THEOCHARIS et al., 2016). A MEC varia em sua constituição e composição específica, variando de tecido para tecido. Além disso, possui grande capacidade de remodelação, estando sujeita a várias modificações pós-traducionais em resposta a estímulos ambientais, como força ou lesão aplicada, permitindo que o tecido mantenha a homeostase e responda a desafios fisiológicos e estresse, incluindo doenças (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; MOUW; OU; WEAVER, 2014).

Uma das principais funções da MEC é servir como um suporte para as células. Além disso, atua influenciando as propriedades bioquímicas e mecânicas de cada órgão, regulando muitos processos celulares, incluindo crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência, homeostase e morfogênese (THEOCHARIS et al., 2016).

A MEC é formada por um conjunto de genes codificadores de proteínas e fatores associados, os quais são definidos como “matrissoma” (NABA et al., 2012, 2016). O matrissoma é composto por mais de 1000 genes, sendo que o “núcleo do matrissoma” compreende cerca de 300 proteínas, incluindo glicoproteínas, colágenos e proteoglicanos. Todo o restante é composto por proteínas associadas à MEC, as quais incluem proteínas afiliadas à MEC, reguladores da MEC e fatores secretados (NABA et al., 2012, 2016).

A MEC pode ser classificada em dois tipos principais que variam em composição e estrutura: as matrizes intersticiais e pericelulares. As matrizes intersticiais cercam as células, enquanto as matrizes pericelulares estão em contato próximo com as células (THEOCHARIS et al., 2016). As matrizes intersticiais possuem em sua composição principalmente fibrilas de colágeno, elastina, proteoglicanos e ácido hialurônico. Todos esses componentes interagem entre si criando uma rede tridimensional dinâmica e complexa (THEOCHARIS et al., 2016). As matrizes pericelulares, como no caso das membranas basais, são encontradas entre o parênquima e o tecido conjuntivo,

atuando como um ponto de ancoragem para as células parenquimatosas, impedindo desse modo que se rasguem. As membranas basais são compostas principalmente de colágeno tipo IV, lamininas, nidogênio, perlecan e agrina (**Figura 6**) (JAYADEV; SHERWOOD, 2017).



**Figura 6-** Visão geral esquemática simplificada da MEC, com seus principais componentes. Fonte: Próprio autor.

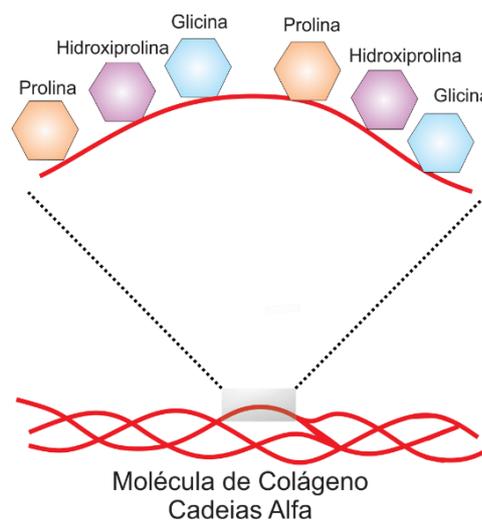
### 2.2.1 Colágenos

Os colágenos são as proteínas mais abundantes nos mamíferos, compreendendo cerca de 30% da massa total de proteínas. É o principal constituinte da MEC, sendo sintetizado e secretado não somente por fibroblastos, mas também por células epiteliais e endoteliais (KULAR; BASU; SHARMA, 2014; RICARD-BLUM, 2011). A superfamília do colágeno abriga 28 membros, numerados em algarismos romanos (I – XXVIII), os quais são formados por pelo menos quarenta e seis cadeias

polipeptídicas distintas (cadeias alfa) (KULAR; BASU; SHARMA, 2014; RICARD-BLUM, 2011).

Além das cadeias alfa, os colágenos são compostos por três cadeias polipeptídicas em formato de hélice, as quais podem constituir a maior parte de sua estrutura, com 96% para o colágeno tipo I até menos de 10% para o colágeno tipo XII (RICARD-BLUM, 2011).

Dentro das cadeias polipeptídicas existe um empacotamento apertado das hélices de poliprolina, exigindo que o terceiro aminoácido seja sempre glicina, resultando em uma sequência repetitiva XYGly, onde X e Y podem ser qualquer aminoácido. Os aminoácidos nas posições X e Y do colágeno são frequentemente 4-hidroxiprolina (38%) e prolina (28%) (**Figura 7**) (SHOULDERS; RAINES, 2009).



**Figura 7-** Estrutura e organização do colágeno. Fonte: Próprio autor.

A função dos colágenos não se restringe apenas a fibrilas e feixes com papel estrutural. Eles interagem com células através de uma ampla gama de receptores, tendo uma função importante na regulação, crescimento, diferenciação, adesão e migração celular (RICARD-BLUM, 2011). Além disso, é bem documentado seu

papel no reparo tecidual, filtração molecular e supressão tumoral (MUIZNIEKS; KEELEY, 2013).

### **2.2.2 Glicoproteínas**

Existem cerca de 200 glicoproteínas complexas no matrissoma de mamíferos, as quais contribuem significativamente para a adesão celular, apesar de desempenharem também outras funções, tais como servir como reservatório para fatores de crescimento (HYNES; NABA, 2012).

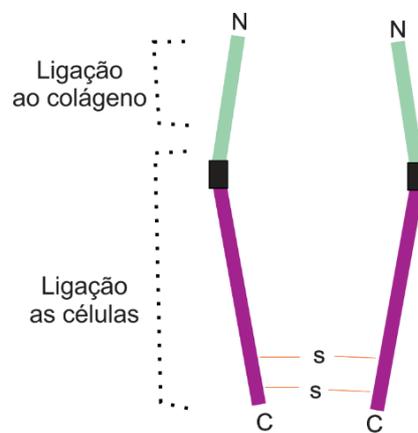
As glicoproteínas são intermediários que ligam moléculas estruturais entre si e ligam moléculas estruturais e células. Em cada molécula de glicoproteína, existem vários domínios que se ligam a moléculas diferentes, as quais juntas formam redes moleculares interligadas (HYNES; NABA, 2012).

As células se aderem à MEC através da interação adesiva com glicoproteínas, tais como fibronectina, lamininas, vitronectina, trombospondinas, tenascinas, nidogênio, fibrinogênio, entre outras. A maioria das glicoproteínas adesivas se ligam as células principalmente através das integrinas da superfície celular. As interações entre as células e a MEC podem mediar muitas respostas celulares, tais como migração celular, crescimento, diferenciação e sobrevivência. As células recebem e respondem aos sinais da MEC, enquanto que as células também modulam a MEC circundante (MECHAM, 2012).

Dentre a ampla gama de glicoproteínas, as fibronectinas e lamininas merecem destaque devido a sua grande importância na MEC. Muitas de suas proteínas interagem com as fibronectinas, regulando a adesão, migração e diferenciação celular. Cada subunidade de fibronectina consiste em três módulos com unidades repetidas, cada qual com estruturas distintas: estruturas tipo I, tipo II e tipo III. Esses módulos contêm sítios de ligação que são importantes para facilitar a interação da fibronectina com os receptores da superfície celular, como integrinas e colágenos, além de unidades intramoleculares que permitem a automontagem da molécula. A estrutura terciária da molécula de fibronectina é estabilizada através de ligações

intramoleculares de dissulfeto e os módulos do tipo I e II (MOUW; OU; WEAVER, 2014).

A molécula de fibronectina consiste em duas subunidades, cada uma com um tamanho aproximado de 250 kDa, formando um dímero através de ligações dissulfureto no seu terminal C. A molécula de fibronectina dobrada se forma via interações iônicas entre os domínios do tipo III de moléculas vizinhas e é deformada por força mecânica para revelar locais de ligação críticos para outras moléculas de fibronectina e receptores de superfície celular ao interagir com células (**Figura 8**). (MOUW; OU; WEAVER, 2014; THEOCHARIS et al., 2016)



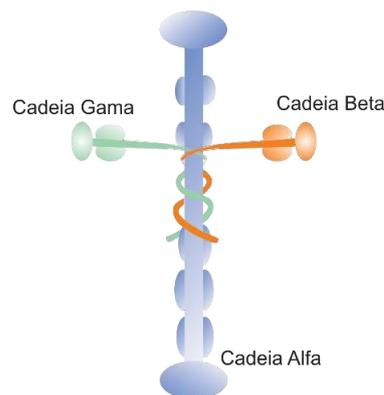
**Figura 8-** Estrutura da molécula de fibronectina. Fonte: adaptado de (MOUW; OU; WEAVER, 2014).

Enquanto o colágeno, os proteoglicanos e o ácido hialurônico compreendem os principais componentes estruturais da MEC, as lamininas são moléculas que preenchem a lacuna de interação entre as células e a MEC (MOUW; OU; WEAVER, 2014).

As lamininas são glicoproteínas triméricas consistindo em cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , sendo freqüentemente encontradas na lâmina basal e em alguns compartimentos mesenquimais. As cadeias  $\alpha$  variam em tamanho de 200 e 400 kDa enquanto as cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  têm tamanhos de 120 a 200 kDa. Um trímero pode então ter um

tamanho que varia de 400 a 800 kDa (PLANTMAN, 2013; WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018).

As cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  se combinam para formar estruturas de forma cruciforme, em forma de Y (três braços) ou em forma de bastonete (braço único) (**Figura 9**). Essas lamininas são descritas por seus números de cadeia combinados, como por exemplo  $\alpha1\beta1\gamma1$  é conhecida como laminina 111. Essa nomenclatura foi precedida por atribuições de número único quando havia menos isoformas conhecidas. As designações originais permanecem preferidas em algumas configurações, como exemplo, é possível encontrar referências a laminina 5 em vez de  $\alpha3\beta3\gamma2$ . Até o momento, são conhecidas cinco cadeias  $\alpha$  ( $\alpha1$ - $\alpha5$ ), quatro cadeias  $\beta$  ( $\beta1$ - $\beta4$ ) e três cadeias  $\gamma$  ( $\gamma1$ - $\gamma3$ ), que se combinam para formar 16 heterotrímeros diferentes (MOUW; OU; WEAVER, 2014)



**Figura 9-** Estrutura da molécula de laminina. Fonte: adaptado de (MOUW; OU; WEAVER, 2014).

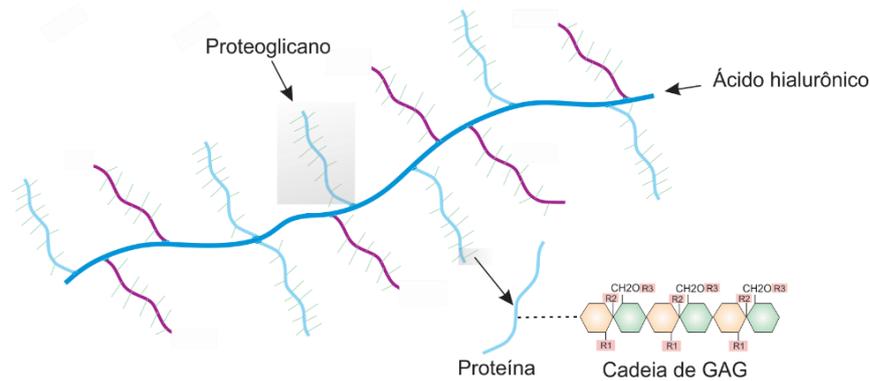
As lamininas desempenham papéis cruciais tanto na montagem da membrana basal quanto nas interações células-MEC. Além disso, apresentam funções específicas para cada tipo celular, tais como adesão, diferenciação, migração, manutenção do fenótipo e resistência apoptótica. Através da ligação com integrinas, as lamininas são capazes de criar uma ligação dinâmica entre a célula e a MEC (DOMOGATSKAYA; RODIN; TRYGGVASON, 2012; KULAR; BASU; SHARMA, 2014).

### 2.2.3 Proteoglicanos e Glicosaminoglicanos

Os proteoglicanos representam um grupo heterogêneo de moléculas que possuem a característica comum de possuir um núcleo de proteína ligada covalentemente a uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) (SCHAEFER, 2014). Os GAGs são polissacarídeos não ramificados, muitas vezes longos, com uma estrutura repetitiva de dissacarídeos com carga negativa (COUCHMAN; PATAKI, 2012). Os proteoglicanos são classificados em subtipos com base na estrutura das cadeias de carboidratos das GAG, bem como na distribuição e na densidade dessas cadeias ao longo do núcleo da proteína. As principais GAGs incluem o sulfato de heparan, sulfato de condroitina, sulfato de dermatan, sulfato de queratina e ácido hialurônico (MOUW; WEAVER, 2014).

Todos os GAGs, exceto o ácido hialurônico, são sulfatados. As cadeias de GAG são altamente carregadas negativamente, permitindo que os proteoglicanos sequestram água e cátions divalentes, conferindo funções de preenchimento de espaço e lubrificação. Proteoglicanos secretados na MEC incluem proteoglicanos grandes, tais como agregan e versican, pequenos proteoglicanos ricos em leucina, tais como decorin e lumican, e proteoglicanos da membrana basal, como o perlecan. Os sindecanos são associados à superfície celular, enquanto a serglicina é um proteoglicano intracelular (YUE, 2014).

A diversidade molecular dos proteoglicanos fornece base estrutural para uma infinidade de funções biológicas. Por exemplo, o agregano na cartilagem gera elasticidade e alta resistência biomecânica à pressão. Decorin e lumican têm um papel regulador na montagem de fibrilas de colágeno. Os proteoglicanos também interagem com fatores de crescimento e receptores de fator de crescimento e estão implicados na sinalização celular e processos biológicos, incluindo angiogênese (**Figura 10**) (YUE, 2014).



**Figura 10-** Estrutura dos proteoglicanos e GAGs. Fonte: adaptado de (VECINO; KWOK, 2016).

#### 2.2.4 Reguladores da MEC e Fatores Secretados

A MEC está constantemente em processo de remodelação pelo qual seus componentes são depositados, degradados ou modificados (YUE, 2014).

Todos os componentes proteicos no exterior ou no interior de uma célula estão sujeitos a degradação e modificação. As enzimas mais importantes no remodelamento da MEC são as metaloproteinases. Serinaproteinases, que incluem plasmina e catepsina G, são ativas em pH neutro e degradam os componentes proteicos da MEC extracelularmente. Em contraste, as proteinases de cisteína, aspartato e treonina são predominantemente ativas em pH ácido e digerem principalmente proteínas intracelulares. No entanto, as cisteínas proteases catepsinas B e L podem ser secretadas fora da célula e digerir a MEC (HYNES; NABA, 2012; LU et al., 2011; YUE, 2014).

Além de atuar principalmente como enzimas que degradam componentes estruturais da MEC, as enzimas reguladoras da MEC podem criar espaço para a migração celular, podem produzir fragmentos específicos com atividade biológica, podem regular a arquitetura dos tecidos através de seus efeitos intracelularmente e também na MEC e podem ativar, desativar ou modificar a atividade de moléculas de sinalização de forma direta e indireta (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007).

Além da modificação por enzimas, a MEC também é modulada por estímulos exógenos, como citocinas, glicocorticoides, estresse oxidativo, pressão e estiramento mecânico. A citocina mais estudada é o TGF- $\beta$  (“*transforming growth factor beta*”), que é conhecido por aumentar a produção da MEC e suprarregular os genes relacionados à MEC (YUE, 2014).

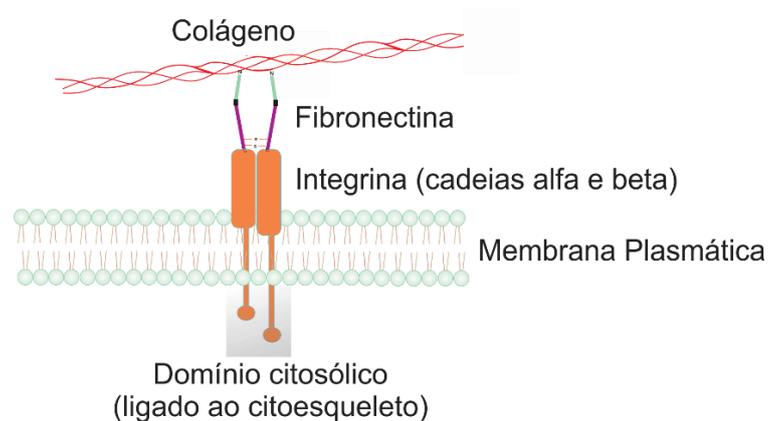
Além do TGF- $\beta$ , muitos outros fatores de crescimento se ligam a proteínas da MEC e devem ser considerados também como constituintes da MEC. Os fatores de crescimento e outros fatores secretados se ligam principalmente aos GAGs, especialmente sulfatos de heparan, embora existam exemplos claros de fatores de crescimento que se ligam a domínios específicos de proteínas da MEC, tal como a fibronectina, a qual liga-se especificamente a uma variedade de fatores de crescimento (VEGF, HGF, PDGF, etc) (HYNES; NABA, 2012).

### **2.2.5 Proteínas Afiliadas a MEC**

Para a MEC interagir com as funções celulares existem vários receptores para proteínas da MEC. As principais classes de proteínas afiliadas a MEC são as integrinas. As integrinas medeiam a adesão celular ligando o citoesqueleto de actina às MECs. Além de atuar para ancorar as células, as integrinas fornecem informações sensoriais via mecanotransdução e sinergismo com as vias de sinalização e fornecem às células as condições necessárias para a diferenciação de uma maneira permissiva (HYNES; NABA, 2012; THEOCHARIS et al., 2016). Além disso, estão envolvidas em várias vias de sinalização celular para processos celulares, como propagação e motilidade (KULAR; BASU; SHARMA, 2014).

As integrinas representam uma família diversificada de proteínas transmembrana, as quais estão presentes em todas as células animais. Cada integrina é constituída por duas partes principais: uma subunidade alfa e uma subunidade beta. A variação nessas subunidades leva a uma grande diversidade de integrinas, sendo que somente em humanos existem mais de 20 tipos diferentes conhecidos.

As integrinas ligam o citoesqueleto de actina de uma célula a várias estruturas externas. A porção citoplasmática de cada molécula de integrina se liga a proteínas adaptadoras que se conectam aos filamentos de actina dentro da célula. A porção extracelular da integrina então se liga a moléculas na matriz extracelular ou na superfície de outras células. Os anexos de integração às células vizinhas podem quebrar e se reformar à medida que a célula se move (**Figura 11**) (CALDERWOOD; CAMPBELL; CRITCHLEY, 2013).



**Figura 11-** Estrutura das integrinas. Fonte: Próprio autor.

### 2.2.6 A Matriz Extracelular do Baço

É conhecido que a MEC é a “espinha-dorsal” dos órgãos linfóides secundários, tendo participação importante na compartimentação imunológica. No entanto, sua constituição e funções no baço ainda são pouco conhecidas. Apenas recentemente, a relação entre a constituição das distintas MECs esplênicas e sua associação a diferentes compartimentos imunes tornou-se aparente (DA SILVA et al., 2018).

Além de sua identificação pelas células imunológicas residentes nesses nichos, cada um dos três compartimentos esplênicos - polpa branca, polpa vermelha e zona marginal - também pode ser distinguida pela organização e composição das fibras reticulares que a compõem (DA SILVA et al., 2018).

Diferentes estudos isolados no baço demonstraram a presença de moléculas da matriz intersticial como colágenos (I, II e III), fibronectina, tenascina e componentes de membrana basal como lamininas, colágeno tipo IV, proteoglicano sulfato de heparan e nidogênio (**Tabela 2**). No entanto, esses estudos foram realizados em diferentes espécies animais, dificultando dessa forma a possibilidade de se tirar conclusões a respeito da presença ou ausência de certas moléculas (LOKMIC et al., 2008).

**Tabela 2** - Moléculas expressas no baço de camundongos, ratos e humanos. Fonte: adaptado de (LOKMIC et al., 2008).

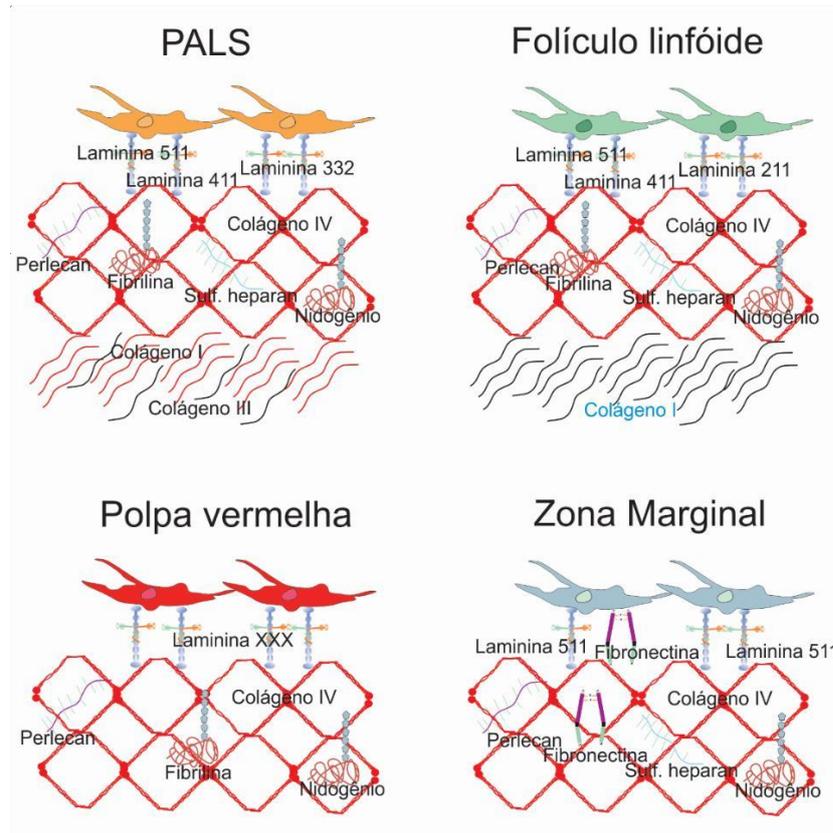
<b>Tipo de ECM</b>	<b>Molécula de ECM</b>	<b>Camundongos</b>	<b>Ratos</b>	<b>Humanos</b>
<b>Matriz Intersticial</b>	Colágeno Tipo I	+		+
	Colágeno Tipo II			+
	Colágeno Tipo III			+
	Fibronectina	+		+
	Tenascina	+		+
	Vitronectina			+
	<b>Membrana Basal</b>	Lamininas	+	+
	Colágeno Tipo IV			+
	Perlecan			+
	Sulfato de heparan	+	+	
	Hialuronan			+

No geral, as fibras reticulares da zona de células T (PALS) da polpa branca esplênica é caracterizada pela presença das isoformas 511 ( $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ ), 411 ( $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ ) e 332 ( $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ) da laminina, o proteoglicano sulfato de heparan, perlecan, colágeno tipo IV e nidogênio 1 em sua membrana basal, enquanto a matriz intersticial contém colágeno tipo I e III. Essas duas camadas distintas da MEC são interconectadas por uma camada microfibrilar caracterizada por fibrilina 1 e ou 2 e colágeno tipo VI (LOKMIC et al., 2008).

De outro modo, as fibras reticulares do folículo linfóide da polpa branca têm várias características únicas que as distinguem das fibras reticulares do PALS. Elas não possuem colágeno tipo III e laminina 332 ( $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ). Em vez disso, expressam, as lamininas 511 ( $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ ), 411 ( $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ ) e 211 ( $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ ) em sua membrana basal (LOKMIC et al., 2008).

A rede reticular de fibras da polpa vermelha apresenta várias características distintas da rede reticular da polpa branca. Primeiramente, as fibras da polpa vermelha têm um diâmetro consideravelmente menor (30–50 nm) que os da polpa branca (1–2  $\mu\text{m}$ ) e não possuem um núcleo de colágeno fibrilar característico. Em vez disso, consistem em uma membrana basal típica contendo colágeno tipo IV, perlecan, nidogênio e uma isoforma de laminina ainda não definida, além de uma camada microfibrilar contendo colágeno tipo VI e fibrilina 2 (LOKMIC et al., 2008).

A zona marginal é caracterizada pela presença de glicoproteínas da membrana basal, como laminina  $\alpha 5$  (laminina 511-  $\alpha 5\beta 1\gamma 1$  e laminina 521-  $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ ) e o sulfato de heparan. Embora outras moléculas da MEC ocorram neste local, incluindo colágeno tipo IV, nidogênio 1, fibronectina e perlecan, elas também são expressas no estroma da polpa vermelha e apenas a distribuição da laminina  $\alpha 5$  é característica da zona marginal (**Figura 12**) (SONG et al., 2013).



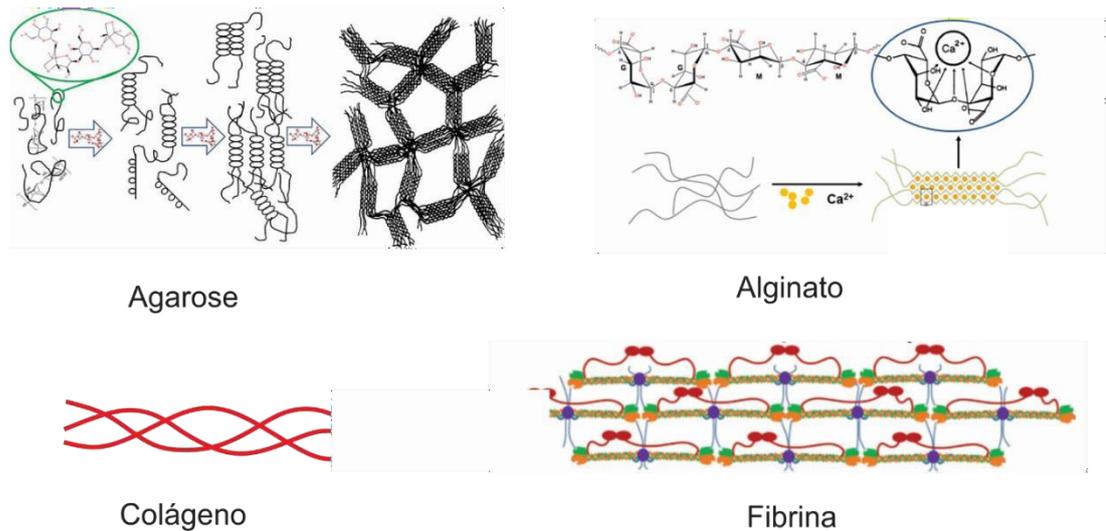
**Figura 12-** Principais diferenças entre a constituição da MEC nos distintos compartimentos esplênicos.  
Fonte: Próprio autor.

### 2.3 A BIOENGENHARIA TECIDUAL

A falência de tecidos e órgãos devido a lesões ou doenças é considerada com um grande desafio para a saúde. Até a segunda metade do século XX, não havia remédios adequados para pacientes com órgãos disfuncionais. Em 1954, Joseph Murray (ganhador do Prêmio Nobel de Medicina em 1990) realizou o primeiro implante de órgãos bem-sucedido, transplantando um rim saudável entre irmãos gêmeos idênticos. Cinco anos depois, Murray realizou o primeiro transplante bem-sucedido de órgãos entre indivíduos geneticamente diferentes. Ao longo dos anos, vários indivíduos foram salvos através dos transplantes de órgãos. No entanto, devido ao aumento do número de pessoas à espera de um transplante, a falta de doadores de órgãos e o envelhecimento da população exigem o desenvolvimento de novos métodos para restaurar a função de órgãos e tecidos danificados (SHAFIEE; ATALA, 2016).

Dentre as diversas opções e metodologias disponíveis, a bioengenharia tecidual surge como uma opção extremamente promissora, fornecendo condições para reparo de tecidos e órgãos danificados (DESTEFANI; SIRTOLI; NOGUEIRA, 2017). A bioengenharia tecidual é uma área integrada que envolve engenharia e ciências naturais no desenvolvimento de materiais biológicos para substituir, reparar e melhorar a função de tecidos doentes ou ausentes (ZHAO et al., 2018). Seu objetivo é diminuir a escassez de órgãos para transplante, por meio da fabricação de estruturas biológicas funcionais (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; SHAFIEE; ATALA, 2016).

Na bioengenharia de tecidos e na medicina regenerativa, um biomaterial fornece suporte mecânico e sinais bioquímicos para estimular a fixação e modular o comportamento celular (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018). Materiais naturais comumente presentes na natureza, tais como agarose, colágeno, alginato, quitosana, ácido hialurônico ou fibrina, além de possuírem baixa citotoxicidade, interagem com os tecidos do receptor promovendo a formação de um novo tecido (**Figura 13**) (SEKUŁA; ZUBA-SURMA, 2018).



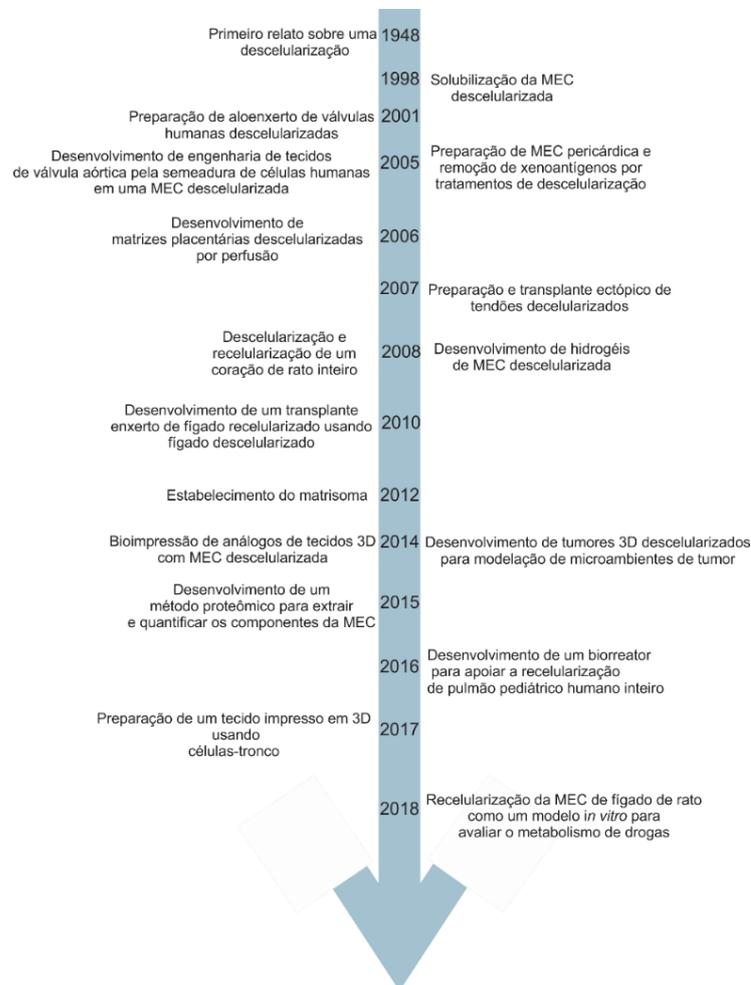
**Figura 13-** Exemplos de biomateriais comumente usados na bioengenharia tecidual. Fonte: adaptado de (RUVINOV; COHEN, 2016; SPROUL; NANDI; BROWN, 2017; ZARRINTAJ et al., 2018).

Outro exemplo de modelo natural de biomaterial é a MEC, a qual contém sinais bioquímicos e mecânicos intrínsecos que regulam o fenótipo celular, além de sua função no desenvolvimento, na homeostase e na resposta à lesão. O uso de materiais na pesquisa biomédica baseados na MEC avançou consideravelmente, partindo de revestimentos de placas de cultura celular com componentes purificados da MEC para projetos de biomateriais que imitam a MEC até finalmente o uso de tecidos descelularizados visando restaurar a dinâmica, composição e estrutura da MEC (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018).

### 2.3.1 Descelularização

Dada a complexidade e a incompleta compreensão da composição e estrutura da MEC, a fabricação de um arcabouço que imite totalmente sua bioquímica e a sua arquitetura ainda não é atualmente possível (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018). Desse modo, tem havido um interesse crescente na utilização da própria MEC natural, o qual pode ser obtida através do processo de descclularização de um tecido específico. A capacidade de geração de tecidos e órgãos funcionais como

substituintes para seus homólogos danificados ou doentes é considerado como um avanço rápido no campo da medicina regenerativa e bioengenharia tecidual. Apesar de pesquisadores isolarem e cultivarem células em tecidos descelularizados desde o início do século XX, seus experimentos eram com monocamadas de células (ou seja, estruturas 2D). No entanto, órgãos e tecidos são multicelulares e requerem várias camadas de células consistindo em estruturas 3D. Desse modo, nas últimas décadas houve um grande avanço no campo da medicina regenerativa, com uso de biomateriais em 3D, os quais atuam modulando o comportamento celular através de interações mecânicas e bioquímicas (**Figura 14**) (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018).



**Figura 14-** Marcos das técnicas usadas para descelularização e recelularização de órgãos. Fonte: adaptado de (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018).

O objetivo final do processo de descelularização é retirar da MEC as células nativas e materiais genéticos, tal como o DNA, mantendo suas características estruturais, bioquímicas e biomecânicas. A MEC descelularizada pode então ser recelularizada com as próprias células do paciente para produzir um tecido personalizado, diminuindo, desse modo, a possibilidade de rejeição (GILPIN; YANG, 2017; HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018).

Os arcabouços derivados da MEC, proporcionam uma combinação complexa de pistas bioquímicas e mecânicas específicas, as quais podem orientar a adesão, proliferação e diferenciação celular durante e após o processo de recelularização (GARRETA et al., 2017). Segundo Garreta et al., 2017, outras vantagens do uso de arcabouços descelularizados para a regeneração de um novo tecido/órgão são:

- Preservação da ultraestrutura e composição da MEC, induzindo uma organização e remodelação tecidual favorável;
- modulação do comportamento celular: ligação, migração e diferenciação;
- inexistência de rejeição, uma vez que os componentes da MEC são amplamente e altamente conservados entre as espécies;
- existência de um desempenho mecânico adequado, semelhante ao que ocorre nos tecidos nativos;
- promoção de uma resposta de remodelação construtiva, como mostrado em uma variedade de tecidos após estudos pré-clínicos e clínicos;
- manutenção de funções celulares e fenótipos do tecido nativo após a recelularização.

A descelularização é um processo que pode envolver uma mistura de tratamentos físicos, químicos e enzimáticos (**Figura 15**). Os tratamentos físicos mais usados envolvem congelamento-descongelamento e a pressão hidrostática (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Os tratamentos enzimáticos envolvem proteases (por exemplo, tripsina, dispase e termolisina) e nucleases (RNase e DNase) (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018). No entanto, os processos de perfusão de produtos químicos são os mais usados por serem mais eficazes. Os reagentes químicos, particularmente detergentes ou ácidos, removem as células nativas ao romperem as

membranas celulares e isolarem os componentes celulares da MEC (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). Como exemplo, ácido acético, ácido peracético, ácido clorídrico, ácido sulfúrico e hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH), podem romper eficazmente as membranas celulares e organelas intracelulares. No entanto, esses produtos químicos também dissociam moléculas importantes, como os GAGs dos tecidos (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

Os detergentes não-iônicos, como por exemplo Triton X-100, interrompem as interações DNA-proteína, lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína. Detergentes iônicos, como por exemplo dodecil sulfato de sódio (SDS) e deoxicolato de sódio, solubilizam completamente as membranas celulares e nucleicas, além de desnaturarem completamente as proteínas. Detergentes zwitteriônicos, como por exemplo 3 - [(3-colamidopropil) dimetilamônio] -1-propanossulfonato (CHAPS) têm uma carga elétrica líquida igual a zero, os quais protegem o estado nativo de proteínas durante a descclularização e exibem propriedades de ambos os detergentes iônicos e não-iônicos (WHITE et al., 2017). No entanto, não existe um detergente ideal, pois todos os detergentes afetam de alguma forma a estrutura da MEC durante o processo de descclularização.

A seleção dos agentes químicos usados na descclularização, tal como a sua aplicação dependem das características do tecido de interesse. Do mesmo modo, como os arcabouços descclularizados podem ser derivados a partir de uma grande variedade de tecidos, também requerem metodologias específicas de descclularização. Por exemplo, esôfago, tendão, válvulas cardíacas, músculo esquelético e traqueia, são descclularizados através da imersão dos tecidos nos reagentes de descclularização, com posterior agitação. De outro modo, veias, coração, rim, fígado, além de outros órgãos, são descclularizados principalmente através da infusão dos reagentes através de sua rede vascular (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018). O importante no fim é que a metodologia utilizada no processo de descclularização seja a mais eficiente na remoção celular com o menor impacto possível na MEC.



**Figura 15-** Principais estratégias de descelularização. Fonte: Próprio autor.

### 2.3.2 Recelularização

A recelularização é uma técnica que tem como propósito o repovoamento de estruturas da MEC acelulares de tecidos ou órgãos com um ou mais tipos de células, visando reconstituir sua microanatomia e funções específicas (SCARRITT; PASHOS; BUNNELL, 2015).

Após o processo de descelularização de um órgão ou tecido, resta em sua maior parte a MEC, a qual servirá como um suporte para as células, orientando seu rearranjo e maturação. A obtenção de arcabouços com estrutura tridimensional e composição preservadas foi um primeiro passo, mas apesar dos avanços, a tarefa de uma recelularização eficaz permanece, principalmente devido à complexidade e falta de tecnologias eficazes para repovoamento de um órgão inteiro (SCARRITT; PASHOS; BUNNELL, 2015).

A recelularização requer fontes celulares apropriadas, um método ideal de semeadura e um método de cultura que promova principalmente a proliferação e sobrevivência das células. Dentre as várias fontes celulares disponíveis, temos as células fetais, neonatais e adultas primárias (ambas derivadas do órgão de interesse), células-tronco embrionárias, células tronco-mesenquimais e células-tronco pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells* - iPSCs). A escolha do tipo celular a ser usado no processo de rescelularização depende de vários fatores tais como a fonte, disponibilidade, custo e facilidade de isolamento, além do número de células necessário para a rescelularização.

Em relação ao uso de células fetais e neonatais, é demonstrado que quando essas células são semeadas em arcabouços descelularizados, elas mantêm seus marcadores fenotípicos, geralmente exibindo funcionalidade e orientação espacial ou compartimental relevante. Apesar de demonstrarem alta capacidade para geração de arcabouços funcionais, não são tipos de células viáveis para uso na bioengenharia de órgãos e tecidos na prática clínica (SCARRITT; PASHOS; BUNNELL, 2015).

Outro tipo celular, as células adultas primárias, também foram avaliadas para recelularização, com resultados principalmente positivos. No entanto, apesar da possibilidade de obtenção a partir de uma biópsia do órgão ou a partir do órgão de um doador, possuem capacidades proliferativas restritas, podendo ser difícil de expandi-las até o número necessário para o repovoamento de um arcabouço de órgão de tamanho humano (GARRETA et al., 2017).

As células-tronco embrionárias por sua vez, também foram testadas, principalmente devido a sua capacidade de diferenciação em várias linhagens com fácil expansão em cultura e proliferação indefinida. Apesar disso, existem vários desafios que limitam o uso de células embrionárias na bioengenharia de tecidos, tais como as questões éticas, a necessidade de melhor compreensão da biologia das células-tronco, além de questões comerciais relacionadas à viabilidade e preço (LEVENBERG; KHADEMHOSEINI; LANGER, 2014).

Outro tipo celular com grande potencial na bioengenharia são as células-tronco mesenquimais devido à sua aplicabilidade clínica. Essas células podem ser facilmente isoladas de um paciente a partir de fontes como medula óssea ou tecido adiposo e expandidas em grande número em cultura. Além de sua capacidade de se diferenciar em vários tipos de células, as células-tronco mesenquimais estão envolvidas no reparo tecidual e podem fornecer suporte estromal através da secreção de citocinas e quimiocinas, facilitando uma melhor integração dos órgãos semeados após o transplante para o hospedeiro (GARRETA et al., 2017; YORUKOGLU et al., 2017).

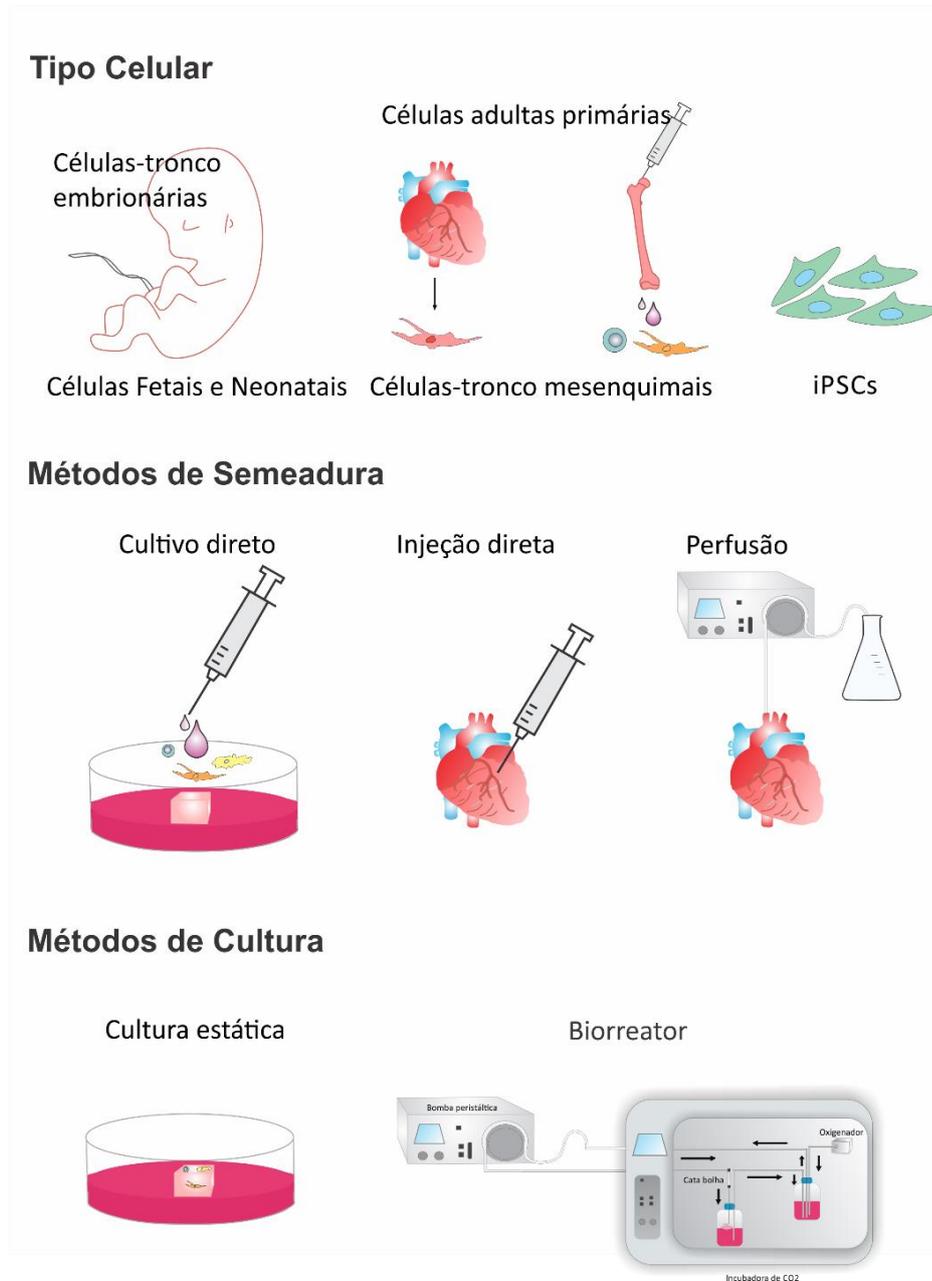
As iPSCs também possuem um futuro promissor para uso na recelularização de órgãos e tecidos. Elas são geradas pela reprogramação de células somáticas usando genes pluripotentes específicos que produzem um estado "embrionário". Assim, podem ser isoladas a partir de um tecido do próprio paciente e diferenciadas em praticamente qualquer tipo celular. Além disso, não apresentam os mesmos

problemas éticos das células-tronco embrionárias. Entretanto, apesar dos benefícios, apresentam vários problemas a serem contornados, tais como a possibilidade de mutações e tumores, além da preocupação de se introduzir sistemas virais no genoma do hospedeiro (SINGH et al., 2015).

Após definição do tipo celular a ser utilizado, é necessário a escolha do método de rescelularização, sendo que este depende em grande parte das características do tecido ou órgão de interesse (GILPIN; YANG, 2017). Desse modo, tecidos finos como a pele, podem ser recelularizados através do cultivo direto das células sobre o arcabouço (GUPTA et al., 2013). Entretanto, tecidos espessos e com grande rede vascular, como coração, fígado, rim e pâncreas exigem outras metodologias como a injeção direta de células no parenquima do órgão usando uma pequena seringa com agulha ou infusão de células pela vasculatura e ou outra estrutura oca, como por exemplo, ducto biliar, ureter, lúmen intestinal ou vias aéreas (HILLEBRANDT et al., 2019). Além disso, vários parâmetros devem ser levados em conta durante o processo de recelularização, tais como o número de células e infusões, o tempo de infusão e o número de perfusões.

Após uma rescelularização eficaz, os órgãos e tecidos devem permanecer um tempo em cultura para promover a aderência celular na matriz. Como a difusão de gases através de um tecido é limitada a uma espessura aproximada de 200 micrômetros, tecidos mais espessos exigem vasculatura funcional para fornecer oxigênio e nutrientes às células, além de facilitar a remoção de resíduos metabólicos. Isso geralmente é conseguido através do uso de um biorreator, o qual usa uma bomba peristáltica para infundir gases e meio no interior do órgão e assim suprir as necessidades celulares (**Figura 16**) (REMUZZI et al., 2017).

Entretanto, apesar dos avanços recentes, são necessárias análises mais aprofundadas do processo de recelularização, visto que até o momento, com as tecnologias adotadas, ainda não houve êxito na obtenção de um arcabouço completamente recelularizado e funcional.



**Figura 16-** Principais estratégias de recelularização. Fonte: Próprio autor.

### 3. JUSTIFICATIVA

Várias doenças podem levar a uma redução na função do baço, a qual é chamada de hipoesplenia. Essa condição é associada com uma variedade de doenças frequentemente encontradas na população, tais como anemia falciforme, câncer, doença celíaca, artrite reumatoide, infecção por HIV, entre outras. Por outro lado, a perda completa da função do baço é chamada de asplenia, a qual se caracteriza por ser uma desordem raramente congênita sendo mais frequente como consequência de intervenção cirúrgica (esplenectomia). Segundo THOMSEN et al., 2009 e KYAW et al., 2006 as principais causas de esplenectomia são trauma e câncer abdominal. Embora pós-esplenectomia e estado hipoesplênico possam predispor indivíduos a complicações tromboembólicas, os principais eventos adversos são de ordem imunológica e infecciosa. Estudos têm demonstrado que essas condições estão associadas a um aumento da susceptibilidade a infecções causadas por bactérias encapsuladas que são refratárias ao tratamento usual, com uma alta taxa de letalidade (40%-54%) (TANIGUCHI et al., 2014).

Com o objetivo de manutenção da função esplênica, técnicas cirúrgicas de preservação do baço têm se tornado cada vez mais comuns, no entanto, a morbidade e mortalidade associada com sua ausência e disfunção ainda são elevadas. Em situações de esplenectomia causada por trauma é aconselhável que os cirurgiões tentem salvar o máximo de tecido possível, sempre recorrendo ao processo de esplenose quando viável. No caso de crianças, quando possível, é aconselhável o adiamento da operação até a idade de 6 a 12 anos (SABATINO, DI et al., 2011).

Devido à alta taxa de mortalidade de pacientes esplenectomizados acometidos por infecções bacterianas e virais é aconselhável o uso de antibióticos e vacinas de forma preventiva (KYAW et al., 2006; KAPLINSKY; SPIRER, 2006; TANIGUCHI et al., 2014). Porém essas bactérias possuem alta capacidade de mutação e frequentemente adquirem resistência.

A bioengenharia tecidual surge como uma alternativa promissora para restaurar a função de tecidos doentes e ou ausentes através do uso de biomateriais. Um dos biomateriais mais usados é o arcabouço de matriz extracelular produzido durante o

processo de descelularização de um órgão ou tecido. Para esse processo, são utilizados agentes físicos, químicos e enzimáticos para remoção celular, com preservação dos principais componentes da matriz. No fim, esse arcabouço é um molde perfeito do tecido, podendo ser recelularizado e transplantado sem rejeição para o paciente.

Desse modo, tendo-se em vista a importância do baço e as consequências de sua disfunção, utilizamos a técnica de descelularização para criar um arcabouço esplênico viável, que pode ser usado para restaurar a função esplênica com as células do próprio paciente, evitando assim problemas de rejeição. Além disso, estudos tem demonstrado que a MEC descelularizada apresenta vários benefícios, tais como capacidade de criação de um microambiente regenerativo favorável, promoção de remodelação específica do tecido e atuação como um modelo indutivo para o reparo e reconstrução funcional. Essa técnica já se mostrou eficiente na produção de uma matriz adequada para recelularização e transplante de diversos órgãos como o coração (ROBERTSON et al., 2014), rim (BONANDRINI et al., 2014), pulmão (GUYETTE et al., 2014), fígado (MAZZA et al., 2015), entre outros, visando manter suas principais funções. Apesar dos avanços recentes, o uso de estrutura derivada da MEC descelularizada esplênica para estudos em bioengenharia tecidual foi pouco discutido, sendo este o primeiro trabalho a atentar-se aos problemas causados pela asplenia, propondo como possível solução as técnicas de descelularização e recelularização.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar o arcabouço esplênico descelularizado para uso em bioengenharia tecidual.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir um arcabouço tridimensional descelularizado viável para recelularização;
- Avaliar e caracterizar o arcabouço descelularizado;
- Recelularizar o arcabouço com células estromais isoladas do baço de neonatos;
- Avaliar a capacidade de adesão, proliferação e viabilidade das células cultivadas no arcabouço descelularizado;

## 5. METODOLOGIA

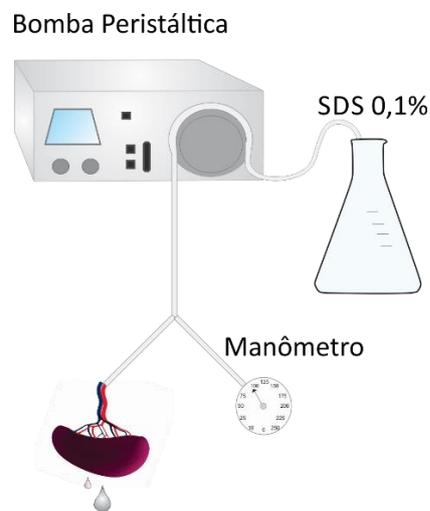
### 5.1 ANIMAIS

Todos os experimentos com animais foram realizados em conformidade com as diretrizes para pesquisa biomédica de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Biologia Experimental e com aprovação do Comitê de Ética Institucional da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES nº 42/2016). Para desenvolvimento do estudo, ratos *Wistar* machos saudáveis, com idades entre 8-10 semanas, pesando entre 250-350 g, foram utilizados para a retirada do baço e descelularização (n = 34). Para isolamento de células estromais esplênicas, ratos *Wistar* neonatos (com 3 dias de vida) foram sacrificados por decapitação (n=6). Os animais adultos foram colocados em gaiolas apropriadas com no máximo 4 animais, receberam água e ração *ad libitum* e tiveram controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade (70%) do ambiente.

### 5.2 DESCELULARIZAÇÃO

O processo de descelularização utilizado neste trabalho baseou-se no protocolo proposto por GAO et al., 2015. Para o processo de descelularização, os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de anestésico ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), seguido por 1000 unidades intraperitoneais de heparina para prevenir a formação de coágulos. Posteriormente, sob condições assépticas, foi realizada uma laparotomia seguida de canulação da artéria esplênica com uma cânula (PE 10). Após a remoção, o baço foi perfundido com uma solução de PBS (*Phosphate buffered saline*) com heparina (100 Unidades/mL) durante 30 minutos com o auxílio de uma bomba peristáltica a uma taxa de 1,2 mL/minuto. Posteriormente, o órgão foi perfundido com detergente SDS 0,1% (dodecil sulfato de sódio) por 9 horas e triton X-100 1% por 30 minutos, sempre diluído em água destilada (H<sub>2</sub>Od). H<sub>2</sub>Od foi perfundida por 30 minutos entre as etapas de perfusão dos detergentes. Para esterilização do

arcabouço, perfundi-se uma solução de ácido peracético 0,2% por 15 minutos, seguido de banho em luz ultravioleta por mais 15 minutos. Para lavagem final do arcabouço, foi perfundido PBS pH 7,4, estéril, por 60 minutos. A pressão de infusão de todos os detergentes e soluções no órgão foi de cerca de 100 mmHg ( $\pm 10$  mmHg), sendo verificada ao longo de todo o processamento. O fluxo foi monitorado a cada hora e mantido em aproximadamente 1,5 mL/minuto, o qual está dentro da faixa do fluxo sanguíneo fisiológico observado *in vivo* para esses animais que é de 1,5 a 2,5 mL/min. (**Figura 17**) (MONCRIEF; KAUFMAN, 2006).



**Figura 17-** Esquema demonstrando o processo de descelularização utilizado para o baço. Fonte: Próprio autor.

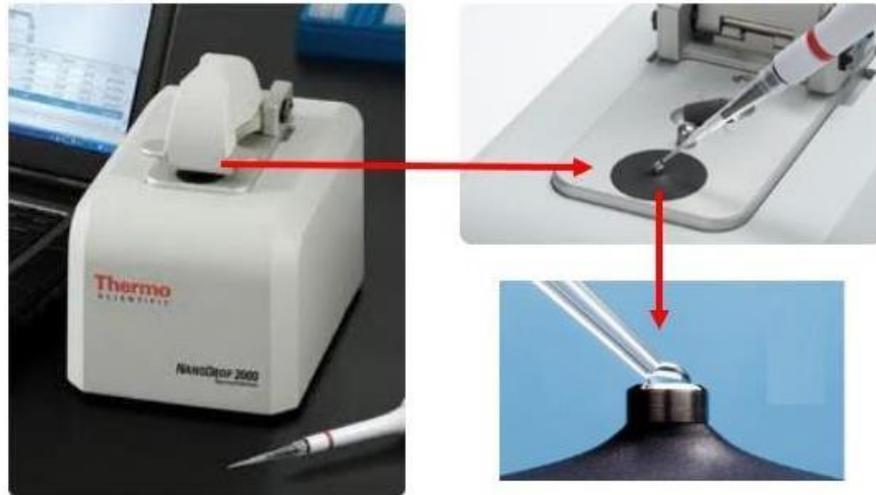
### 5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DOS COMPONENTES DA MEC

Para análise histológica e imuno-histoquímica, amostras de tecido nativo e descelularizado foram fixadas em uma solução de paraformaldeído 4% tamponada com PBS e incorporadas em Histo-resina (Leica Histo-resin Embedding Kit, Alemanha). A polimerização das partes foi realizada dentro de 1-2 horas à temperatura ambiente. Seções de 5  $\mu$ m de espessura foram retiradas de cada um dos tecidos com o auxílio de um micrótomo (Leica RM 2125, Alemanha) e colocadas em lâminas de vidro. As

colorações utilizadas foram: hematoxilina e eosina (HE) (para realçar a presença/ausência de núcleos), picrossírius (para colágeno), ácido periódico de Schiff (PAS) (para glicoproteínas). Para detecção imuno-histoquímica, os tecidos foram cortados a 3  $\mu$ m de espessura e depositados em lâminas silanizadas. Para melhor penetração dos anticorpos, seguiu-se o seguinte protocolo para remoção da resina: tolueno PA (30 min); xileno PA (30 min.); acetona PA (30 min); reidratação em séries decrescentes de etanol (95%, 70%, 50%, 30%) e finalmente colocados em água destilada. Posteriormente, a recuperação antigênica das amostras foi feita com tampão citrato, realizado o bloqueio da peroxidase endógena e proteínas inespecíficas (Spring Bioscience, Canadá) e tratados com anticorpos primários durante a noite a 4°C. Os anticorpos utilizados neste estudo foram anti-fibronectina (1:100) e anti-laminina (1:100) (Abcam, Cambridge, UK). Posteriormente, as amostras foram incubadas a 37°C durante 30 min. com o anticorpo secundário, reveladas com o substrato, contrastadas com hematoxilina e montadas. Todas as imagens foram obtidas em um microscópio óptico (AX70, Olympus Corporation, Japão) acoplado com uma câmera de vídeo (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss, Alemanha).

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA RESIDUAL

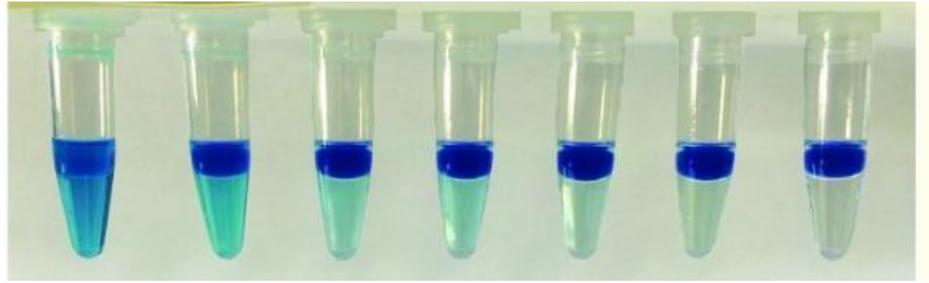
O conteúdo de DNA nos tecidos nativos (n=4) e descclularizados (n=6) foi extraído usando o método padronizado de extração salina (BRUFORD et al., 1992). Resumidamente, os tecidos foram liofilizados, cortados em pequenos fragmentos e isolados com tampão de extração (tris 1M, pH = 8; NaCl 5M; EDTA 0,5M, pH = 8) e tampão de lise (tampão de extração, SDS 10% e proteinase K). Após a digestão do tecido durante a noite, o DNA foi precipitado com NaCl 5M, o conteúdo proteico precipitado foi descartado e o DNA restante diluído em 100  $\mu$ L de água destilada. A quantidade total de DNA foi quantificada usando a função de detecção de ácido nucleico no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) (**Figura 18**).



**Figura 18** - Esquema simplificado demonstrando o processo de quantificação de DNA no Nanodrop 2000. Fonte: Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares – LABIOM-UFES.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE SDS RESIDUAL

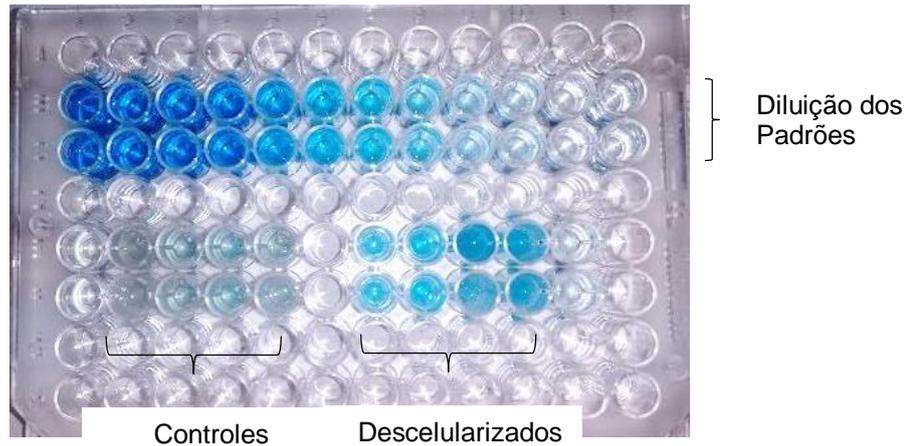
Para determinar a concentração de SDS residual no arcabouço ( $n=3$ ), utilizou-se o método do azul de metileno (*methylene blue* - MB) (ZVAROVA et al., 2016). Foram coletados cerca de 2 mL do efluente do órgão em dois momentos distintos do processo de descelularização: 1- Último 1 mL de SDS 0,1% usado durante o processo de descelularização; 2- Último 1 mL de água destilada utilizada na lavagem final do arcabouço. Para a curva padrão, o SDS foi diluído em água deionizada em série, partindo de uma solução de SDS a 1% até a sua milésima parte ( $\sim 0,001\%$ ). Aliquotas de lavagem (em triplicata) foram então misturadas com uma solução contendo MB 0,0125% (Sigma-Aldrich) em água deionizada (v/v) numa proporção de 1:100 (5,0  $\mu\text{L}$  de efluente + 495  $\mu\text{L}$  de MB). Após agitação, adicionou-se clorofórmio numa proporção de 1:2 (1,0 mL de clorofórmio) e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente (**Figura 19**). Após a incubação, 150  $\mu\text{L}$  da camada inferior (clorofórmio) foram extraídos e este foi colocado em uma placa de 96 poços e lida espectrofotometricamente em um leitor de microplacas (Varioskam Flash, Thermo Fisher) a 650 nm.



**Figura 19** - Adição de clorofórmio nas amostras diluídas para determinação do conteúdo de SDS residual. Fonte: ZVAROVA et al., 2016.

## 5.6 QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS (GAGs)

A quantificação de GAGs foi realizada através da incubação das amostras em *Alcian Blue* com posterior leitura espectrofotométrica. A molécula de *Alcian Blue* é composta por um núcleo hidrofóbico contendo cobre, que lhe confere a coloração azul. Por ser um cátion tetravalente, liga-se fortemente aos GAGs (KARLSSON; BJÖRNSSON, 2001). Para a curva padrão, foram realizadas diluições em série a partir de uma solução de condroitina-6-sulfato na concentração de 0,4mg/mL a 0,0125mg/ml. Cerca de 5 mg de amostras liofilizadas de tecidos nativos e descelularizados (n= 4) (em duplicata) foram precipitadas em tampão de guanidina-HCl 8 M pH 1,5 durante 24 horas sob agitação. Após centrifugação, o precipitado foi incubado com uma solução de *Alcian Blue* e armazenado durante a noite a 4°C. O excesso de coloração foi removido por lavagens em DMSO. Após a dissociação dos complexos GAGs-*Alcian Blue* na solução guanidina HCl/propanol 4M, cerca de 240 µL das amostras de tecido, padrão e branco foram colocados em uma placa de 96 poços e lidos espectrofotometricamente em leitor de microplacas (Varioskam Flash, Thermo Fisher) em 605 nm (**Figura 20**). A quantidade de GAGs presentes nas amostras foi diretamente proporcional à concentração de *Alcian Blue*.

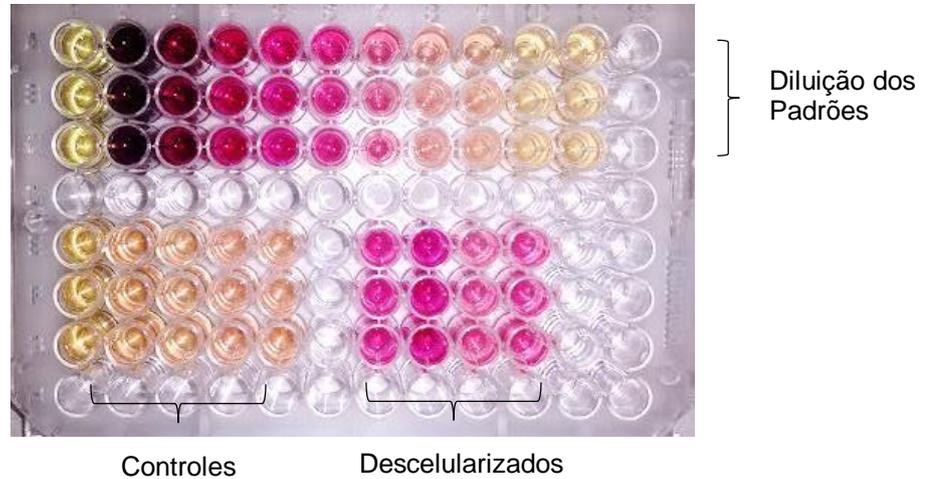


**Figura 20** - Placa de 96 poços com amostras de tecido e dos padrões, para leitura e quantificação espectrofotométrica de GAGs. Fonte: Próprio autor.

## 5.7 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO

A quantidade de colágeno foi verificada indiretamente pela determinação do conteúdo do aminoácido 4-hidroxirolina presente nos tecidos (CARLSON, 2014; SAMUEL, 2009). Quantitativamente, cerca de 13,5% do conteúdo de colágeno é formado pelo aminoácido 4-hidroxirolina, que é seu principal constituinte (KLIMENT et al., 2011). Além disso, sabe-se que a 4-hidroxirolina está presente em poucas proteínas, sendo a principal delas o colágeno (KLIMENT et al., 2011). Na curva padrão, as diluições foram feitas a partir de uma solução contendo 2.600 µg/mL de hidroxiprolina até a concentração de 2,5 µg/mL. Posteriormente, os tecidos nativos e descelularizados (n=4) foram previamente liofilizados e cerca de 10 mg de cada amostra (em triplicata), além do branco e os padrões foram incubados em 50 µL de NaOH 7N e autoclavados a 120°C (p≈98,1kPa) por 40 minutos para hidrólise alcalina. Posteriormente, cerca de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,5 M foram adicionados aos tubos para acidificar o hidrolisado. A hidroxiprolina foi oxidada em pirrol após a adição de 450 µL de cloramina T 0,0025 M em tampão citrato-acetato pH 6,0 durante 25 minutos à temperatura ambiente. 500 µL de reagente de Erlich 0,5M (4-dimetilaminobenzaldeído em ácido perclórico/2-propanol) foram adicionados aos tubos e incubados em banho-maria a 60°C por 15 minutos, formando um composto com coloração vermelho-púrpura. A absorbância das

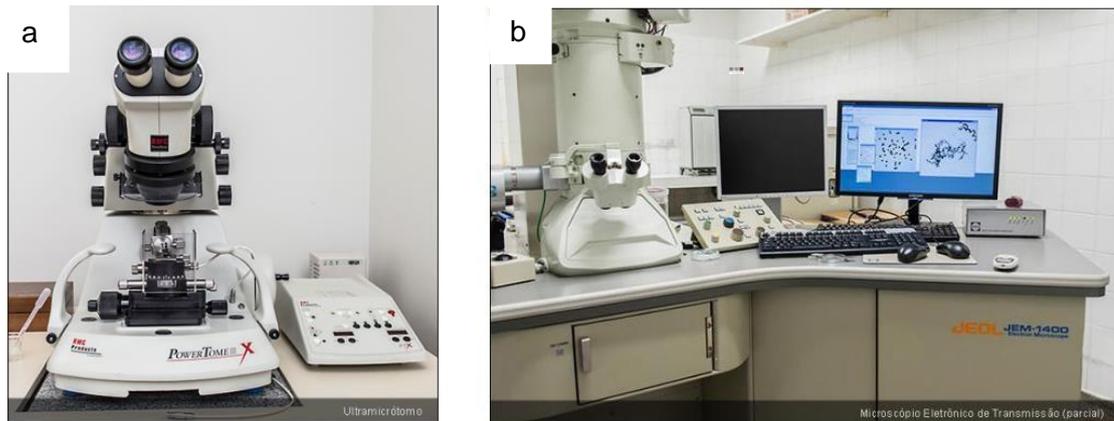
amostras foi lida imediatamente de forma espectrofotométrica em um leitor de microplacas (Varioskam Flash, Thermo Fisher) a 560 nm (**Figura 21**).



**Figura 21-** Placa de 96 poços com amostras de tecido e dos padrões, para leitura e quantificação espectrofotométrica da 4-hidroxi prolina. Fonte: Próprio autor.

## 5.8 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

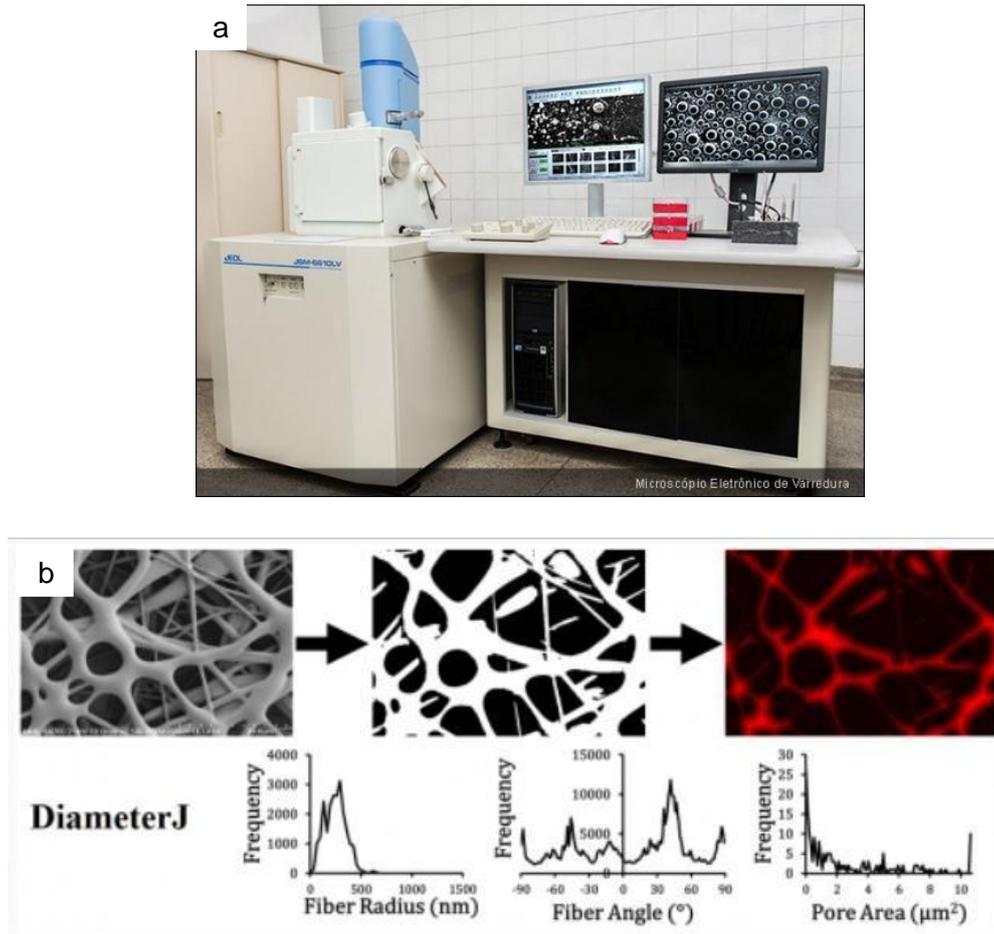
Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), amostras de tecido nativo e descelularizado foram coletadas e fixadas em solução de *Karnovsky* (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% e tampão cacodilato 0,1M). Posteriormente, os tecidos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio, desidratados em etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e embebidos em resina epóxi (EMbed 812, Electron Microscopy Sciences). Seções ultrafinas (60 nm de espessura) foram obtidas em um ultramicrótomo (UCT, Leica Microsystems) antes da contrastação em acetato de uranila e citrato de chumbo. Micrografias eletrônicas representativas dos diferentes grupos foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-1400, Japão) a 80 kV (**Figura 22**).



**Figura 22-** Microscopia eletrônica de transmissão. a) Ultramicrotomo. b) Vista parcial do microscópio eletrônico de transmissão. Fonte: Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins – LUCCAR-UFES.

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), após os passos de fixação, o crioprotetor (glicerol 30% e tampão cacodilato 0,1M) foi adicionado e as amostras levadas ao freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para congelamento total do tecido. Para fratura da amostra, utilizou-se o nitrogênio líquido, que foi vertido diretamente sobre o tecido. Seguiu-se com a desidratação em etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), secagem no ponto crítico de  $\text{CO}_2$  (Autosandri-815, Tousimis), revestimento com 10 nm de ouro puro em um aspersor a vácuo (Desk V, Denton Vacuum) e análise em modo direto usando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM-6610 LV).

Para determinação do diâmetro das fibras da matriz do tecido descelularizado ( $n=3$ ), utilizou-se o plugin *Diameter J* do software *Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) (HOTALING et al., 2015). Para análise, foram utilizadas 45 imagens obtidas aleatoriamente das amostras em um aumento de 10000x (**Figura 23**).



**Figura 23** - Microscopia eletrônica de varredura. a) Microscópio eletrônico de varredura. b) *Software Diameter J*. Fonte: Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins – LUCCAR-UFES e *Diameter J*®.

## 5.9 ANÁLISE POR INFRAVERMELHO

Amostras de baços nativos e descelularizados ( $n=3$ ), previamente liofilizadas, foram analisadas usando um espectroscópio (FT-MIR FTLA 2000 Bomem). Todos os espectros foram observados na faixa de  $500$  a  $4500\text{ cm}^{-1}$  para aquisição de dados, a uma taxa de  $4\text{ cm}^{-1}$ , com 50 varreduras para cada amostra, seguida de análise espectral para comparação. A análise da faixa do espectro em  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  foi utilizada para determinar a estrutura secundária das proteínas em tecidos nativos e descelularizados (YANG et al., 2015). Para deconvolução e quantificação percentual

da área relativa de cada conformação, o espectro de infravermelho foi primeiramente normalizado e então a área relativa de cada pico foi calculado utilizando o espectro de segunda derivada seguido por suavização pelo método de *Savitsky-Golay* com as diferentes conformações determinadas pela integração dos perfis gaussianos. Todas as análises foram feitas no Origin Pro 8.5 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EUA).

## 5.10 ANÁLISE PROTEÔMICA

Para análise proteômica, amostras liofilizadas de tecidos nativos e descelularizados ( $n = 4$ ) foram processadas de acordo com o protocolo modificado de BARALLOBRE-BARREIRO et al., 2017. Primeiramente, a remoção dos contaminantes celulares nos tecidos nativos foi realizada. Resumidamente, cerca de 50 mg de cada tecido nativo foram lavados com NaCl 0,5 M em Tris 10 mM pH 7,5 (1:10 p:v) e incubados no agitador durante 4 horas. Cerca de 1 mL de SDS 0,1% com 100 ml de EDTA 25 mM foram adicionados às amostras e incubadas no agitador a 500 rpm por 16 horas (durante a noite). Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o tecido nativo foi então lavado com 1 mL de H<sub>2</sub>O deionizada para remoção do SDS.

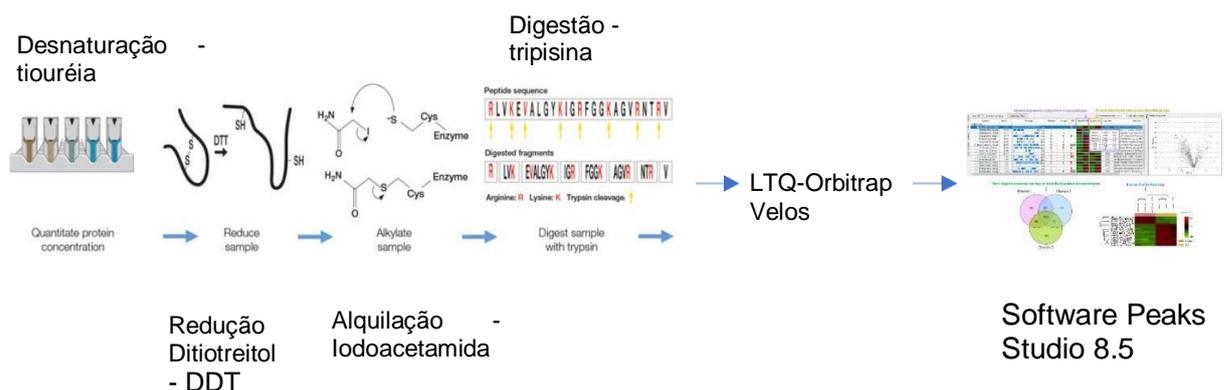
Posteriormente, cerca de 500 µL de cloridrato de guanidina 4 M (GnHCl) com acetato de sódio 50 mM pH 5,8 e 50 µL de EDTA 25 mM foram adicionadas as amostras de tecido nativo e descelularizado para a extração do conteúdo proteico da matriz, após incubação por 48 horas a temperatura ambiente no vórtex. Após esse período, a quantificação das proteínas das amostras foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, US) a 280 nm com coeficiente de extinção 1,1. Seguiram-se os passos de precipitação com etanol, desnaturação com ureia e tioureia, redução com DTT (Ditiotreitol), alquilação com iodoacetamida e digestão com tripsina. A etapa de dessalinização foi realizada com ZipTips C18 (Millipore, Billerica, MA).

A proteômica *shotgun* foi realizada no espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) acoplado à cromatografia líquida EASY-nLC II (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os dados foram coletados em

um modo dependente de aquisição de dados no qual os cinco íons precursores mais intensos de cada ciclo foram selecionados para fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) por 90 segundos e a tensão de nanospray foi selecionada para 2.3kV com temperatura da fonte de ionização de 250°C. O tempo de injeção no íon trap e no FT-MS foi de 100 ms cada, com resolução de 30.000 através do intervalo de m/z de 300-1800.

A análise dos dados brutos foi realizada no *software* Peaks Studio 8.5 utilizando os seguintes bancos de dados: 1) "*rattus norvegicus*" no Uniprot (36879 resultados em agosto de 2018; 2) "matriz extracelular + *rattus norvegicus*" no NCBI (836 resultados em agosto de 2018 3) "proteoglicanos + *rattus norvegicus*" no NCBI (76 resultados em agosto de 2018). As clivagens máximas foram selecionadas em 3 para a tripsina, o erro da massa precursora e o fragmento foram 10 ppm e 0,5 Da, respectivamente. Uma taxa de descoberta falsa de 1% (FDR) com peptídeos únicos  $\geq 1$  foi utilizada para filtrar proteínas de baixa qualidade na análise do modo PEAKS.

As proteínas foram posteriormente classificadas em classes de acordo com o trabalho de Hynes; Naba, 2012, em colágenos, glicoproteínas, proteoglicanos, reguladores da MEC, fatores secretados e proteínas associadas a MEC. Para quantificação, foi utilizada a intensidade média de cada proteína em relação a cada grupo.

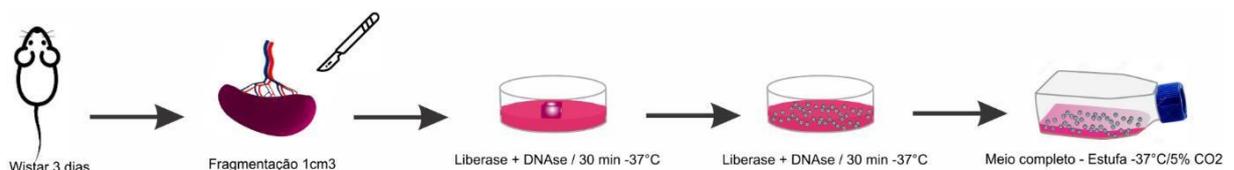


**Figura 24** - Esquema simplificado do processo de extração e análise dos peptídeos. Fonte: Próprio autor.

## 5.11 RECELULARIZAÇÃO

### 5.11.1 Isolamento Celular

Para isolamento celular, ratos neonatos, com 3 dias de vida foram sacrificados por decapitação e mergulhados em álcool 70%. Posteriormente, foram levados para uma cabine de fluxo laminar onde o peritônio foi exposto com o auxílio de um bisturi. Posteriormente, o baço foi picotado em uma placa de pétri e os fragmentos mergulhados em um tampão contendo 0,45 mg/mL de Liberase TL (Roche) e 0,5 mg/mL de DnaseI (Roche) em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, USA). A digestão foi realizada sob agitação constante (140 rpm) por 30 min a 37°C e a desagregação completa obtida por pipetagem para obtenção de uma suspensão celular única. As células foram cultivadas em meio de cultura contendo DMEM acrescido de 20% FBS (*Fetal bovine serum*) e 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina 10000 unidades, estreptomicina 10 mg e 25 µg anfotericina B por mL), com remoção das células não aderidas e troca de meio após 3-4 dias. Em todos os experimentos foram usadas células aderentes nas passagens P1-P5 (**Figura 25**).



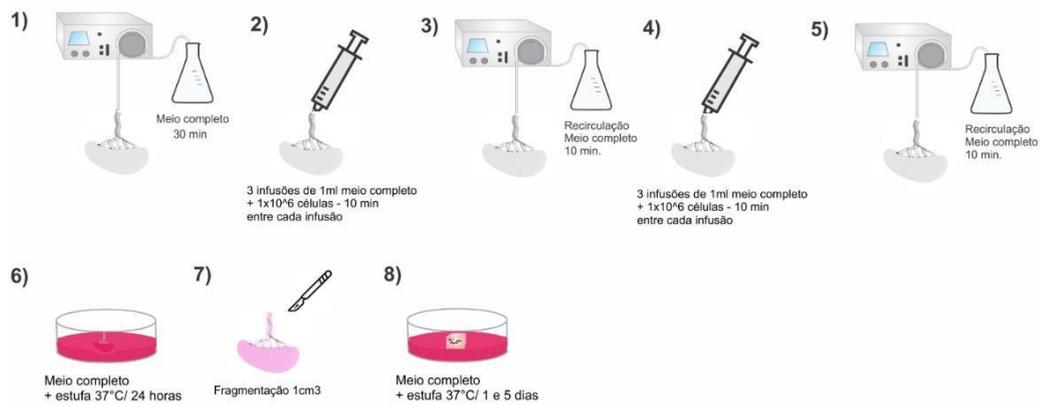
**Figura 25** - Esquema simplificado demonstrando o processo usado para o isolamento das células estromais do baço de ratos neonatos. Fonte: Próprio autor.

## 5.11.2 Semeadura Celular

### 5.11.2.1 Semeadura do Arcabouço com Perfusão Celular

O primeiro método de semeadura celular testado foi o de perfusão (n=3). Primeiramente, o arcabouço foi perfundido com meio de cultura DMEM completo (DMEM acrescido de 20% de FBS e 1% de antibiótico/antimicótico) por 30 minutos e armazenado nesse mesmo meio por 24 horas a 2-8°C. Antes de iniciar a semeadura, todas as cânulas do sistema de perfusão foram esterilizadas em ácido peracético e banho de luz ultravioleta por 15 minutos, seguido de PBS por 30 minutos.

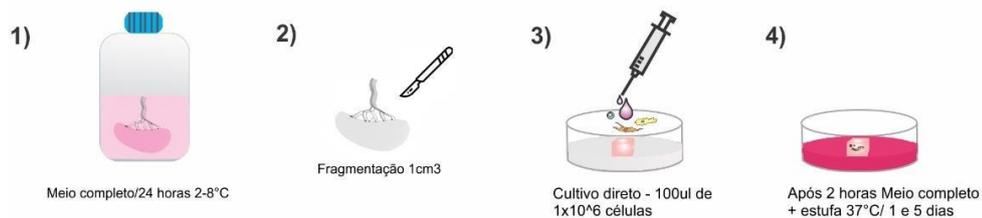
O processo de perfusão celular foi realizado na artéria esplênica canulada anteriormente para o processo de descellularização, procedendo-se em etapas da seguinte forma: 1) 3 infusões de 1ml de meio DMEM completo contendo  $1 \times 10^6$  células estromais/mL, com uma seringa estéril, com intervalos de 10 minutos entre cada infusão; 2) Recirculação de meio DMEM completo por 10 minutos com fluxo de 3 ml/minuto; 3) 3 infusões de 1ml de meio DMEM completo contendo  $1 \times 10^6$  células estromais/mL, com uma seringa estéril, com intervalos de 10 minutos entre cada infusão; 4) Recirculação de meio DMEM completo por 10 minutos com fluxo de 3 mL/minuto. Após as infusões, o órgão foi mergulhado em meio DMEM completo sobre uma placa de pétri estéril e levado a estufa a 37°C e 5% de CO<sup>2</sup> por 24 horas. Após esse período, o arcabouço foi fragmentado em pedaços com aproximadamente 1cm<sup>3</sup> e cultivado na estufa por 1 e 5 dias (**Figura 26**).



**Figura 26** - Esquema simplificado demonstrando o processo de sementeira das células estromais no arcabouço pelo método de perfusão celular. Fonte: Próprio autor.

#### 5.11.2.2 Cultivo Direto das Células Sobre o Arcabouço

O segundo método de sementeira celular testado foi o cultivo direto das células estromais sobre o arcabouço (n=3). Para isso, o arcabouço previamente esterilizado foi armazenado em meio DMEM completo por 24 horas na geladeira a 2-8°C. Posteriormente o arcabouço foi fragmentado em pedaços com aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>, os quais foram semeados com 100 µL de uma suspensão celular contendo  $1 \times 10^6$  células/mL. Para a completa aderência celular, o arcabouço foi deixado por 2 horas na estufa a 37°C, sendo adicionado meio DMEM completo e cultivados por 1 e 5 dias (**Figura 27**).



**Figura 27** - Esquema simplificado demonstrando o processo de sementeira das células estromais no arcabouço pelo método de cultivo direto. Fonte: Próprio autor.

### 5.11.3 Avaliação do Processo de Recelularização

#### 5.11.3.1 Análise Histológica do Arcabouço Recelularizado

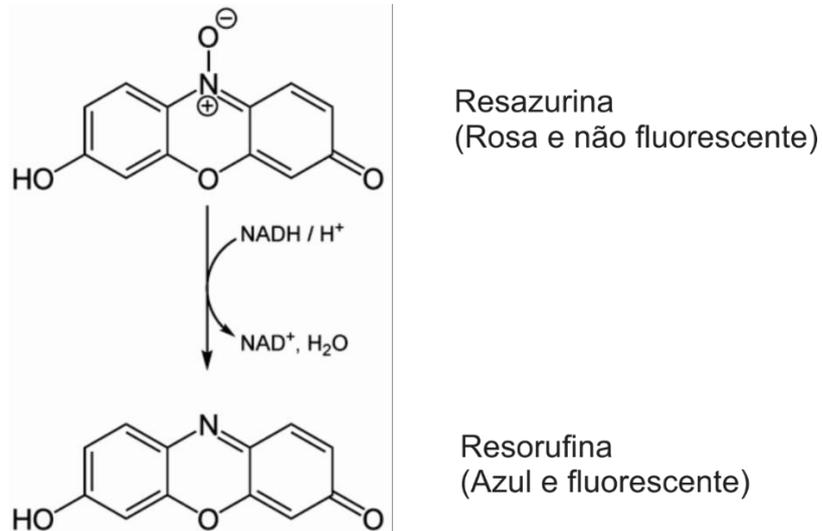
Amostras de tecido recelularizado foram fixadas em uma solução de paraformaldeído 4% tamponada com PBS e incorporadas em Histo-resina (Leica Histo-resin Embedding Kit, Alemanha). Após polimerização, seções de 5 µm de espessura foram obtidas com o auxílio de um micrótomo (Leica RM 2125, Alemanha) e colocadas em lâminas de vidro para posterior coloração com hematoxilina e eosina. As imagens foram obtidas em um microscópio óptico (AX70, Olympus Corporation, Japão) acoplado com uma câmera de vídeo (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss, Alemanha).

#### 5.11.3.2 Avaliação da Viabilidade e Proliferação

O ensaio *AlamarBlue* (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi usado para monitorar a viabilidade e proliferação das células estromais cultivadas juntamente com o arcabouço (n=3). O reagente *AlamarBlue* é uma solução pronta para usar à base de resazurina que funciona como um indicador de saúde celular, usando o poder redutor das células vivas para medir quantitativamente sua viabilidade e proliferação. A resazurina, o ingrediente ativo do reagente *AlamarBlue*, é um composto permeável às células, não tóxico, de cor azul e praticamente não fluorescente. Ao entrar nas células vivas, a resazurina é reduzida a resorufina, um composto de cor vermelha e altamente fluorescente (**Figura 28**).

Cerca de  $5 \times 10^4$  células estromais foram semeadas sobre fragmentos de arcabouços medindo aproximadamente  $1 \text{ cm}^3$ , em uma placa de 48 poços (Kasvi) e armazenados em uma estufa com meio DMEM completo a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 1 e 5 dias em cultura, o meio foi removido e adicionado meio novo juntamente com o reagente *Alamar Blue* (180 µL de meio DMEM completo e 20 µL de *Alamar Blue*). Após 4 horas de incubação na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, 200 µL da solução de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços (Corning, Costar®). A intensidade de

fluorescência foi mensurada usando um leitor de microplacas (Leitor Multidetecção Híbrido Synergy H1 – BioTek) com excitação em 560 e emissão em 590 nanômetros.



**Figura 28** - Conversão da resazurina para resorufina após metabolização celular. Fonte: Próprio autor.

### 5.11.3.3 Adesão Celular

A capacidade do arcabouço descelularizado em suportar a adesão de células estromais do baço foi verificada através da MEV (n=3). Resumidamente, após os passos de fixação em solução de *Karnovsky*, seguiu-se com a desidratação em etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), secagem pelo ponto crítico de CO<sub>2</sub> (Autosandri-815, Tousimis) e revestimento com 10 nanômetros de ouro puro em um aspersor a vácuo (Desk V, Denton Vacuum). A análise foi realizada em modo direto usando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM-6610 LV) em uma magnificação de 2000x.

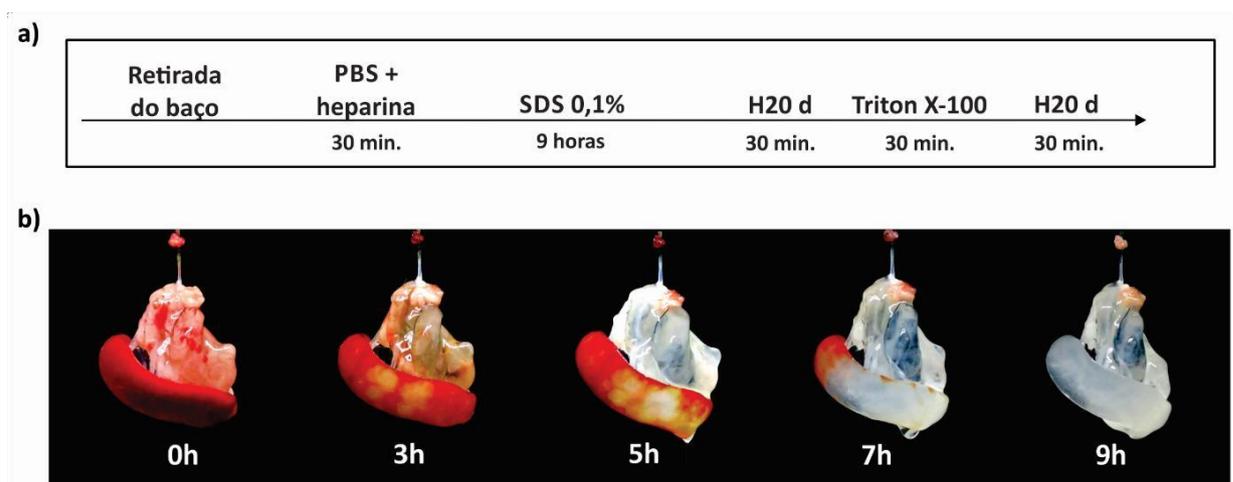
## 5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t de Student* para amostras independentes e ANOVA de uma e duas vias seguido do teste de *Bonferroni's* para múltiplas comparações. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prisma (Prism 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 DESCELULARIZAÇÃO DO BAÇO

O passo-a-passo do processo usado para descелularização do baço e imagens macroscópicas do órgão durante o processamento são mostrados respectivamente nas **Figuras 29a e 29b**. Após a remoção do órgão, diferentes soluções são infundidas através da artéria esplênica com o objetivo de remover o máximo de material celular sem causar danos à MEC (**Figura 29a**). Para isso, utilizou-se um detergente aniônico (SDS), com uma concentração bem abaixo daquela utilizada em outros órgãos (0,1%), além do auxílio de uma bomba peristáltica, a qual continha pressão de infusão próxima a  $100 \pm 10$  mmHg. Assim, através da ação conjunta do detergente e da pressão, o baço tornou-se gradualmente cada vez mais translúcido com a dissolução e remoção das células e seus detritos. Com aproximadamente 9 horas após o início do processo, o órgão estava totalmente translúcido, demonstrando não haver material celular remanescente visível, mas com permanência de uma rede intacta de estruturas semelhantes a vasos (**Figura 29b**).



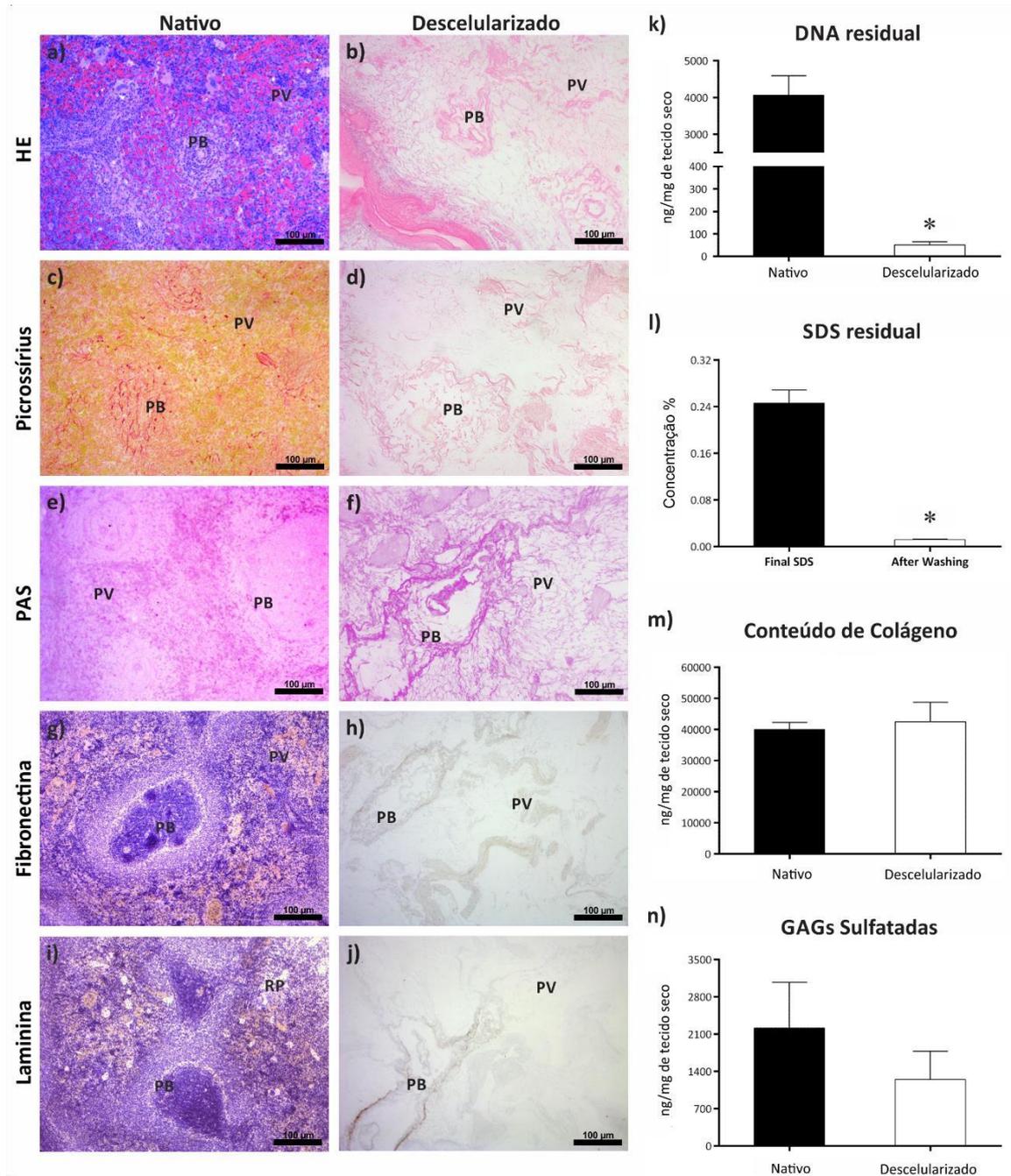
**Figura 29-** Processo de descелularização do baço. **a)** Representação esquemática do protocolo utilizado na descелularização esplênica. **b)** Imagens representativas do processo de descелularização esplênica ao longo do tempo.

## 6.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA

Para avaliação histológica as amostras foram coradas com HE, onde se pode observar a ausência de restos celulares e material genético (**Figuras 30a e b**). Os resultados obtidos pela coloração foram confirmados pela quantificação do DNA residual, onde observou-se uma redução significativa na quantidade de DNA no arcabouço descelularizado quando comparado ao tecido nativo ( $4068 \pm 522,8$  vs.  $51,25 \pm 13,17$  ng/mg de peso seco do tecido) (**Figura 30k**). Da mesma forma, o conteúdo de SDS residual foi verificado no arcabouço, o qual pode interferir no sucesso da recelularização (ZVAROVA et al., 2016). Verificou-se que após o uso de um segundo detergente (Triton X-100) e sucessivas lavagens com água destilada, houve redução significativa na concentração de SDS presente no efluente do órgão quando comparada à concentração de SDS do passo anterior às lavagens ( $0,2463 \pm 0,02252$  % vs.  $0,0120 \pm 0,00057$  %) (**Figura 30l**).

A manutenção do colágeno foi verificada através da coloração com picrossírius (**Figuras 30c e d**) e quantificação indireta do aminoácido hidroxiprolina (**Figura 30m**), onde não foram observadas diferenças estatísticas entre o órgão nativo e o arcabouço descelularizado, respectivamente ( $2001,88 \pm 113,8$  vs.  $2109 \pm 320,3$  µg/mg de peso seco do tecido). A manutenção de glicoproteínas no arcabouço descelularizado foi demonstrada através da coloração com PAS (**Figuras 30e e f**). O conteúdo total de glicosaminoglicanos sulfatados no tecido nativo e no arcabouço, respectivamente, foi medido (**Figura 30n**), não sendo observada diferença estatística entre os grupos ( $2216,01 \pm 856,8$  vs.  $1250,90 \pm 528,9$  µg/mg de peso seco do tecido).

A imunomarcagem mostrou a expressão e distribuição de fibronectina e laminina na MEC dos tecidos nativos e descelularizados, com total manutenção dessas moléculas na estrutura após o processo de descelularização (**Figuras 30g - j**).

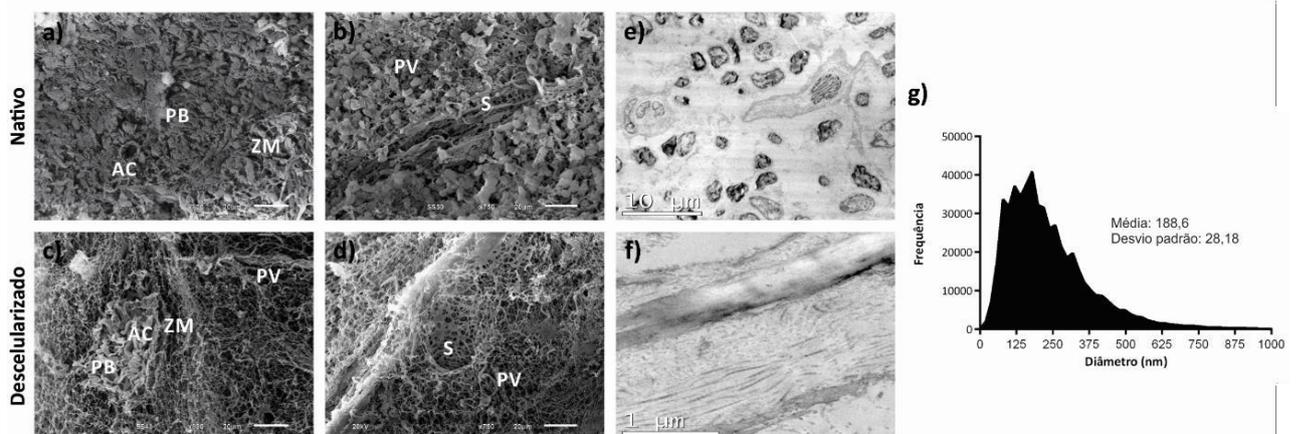


**Figura 30-** Avaliação do processo de decelularização. **(a-b)** Imagens representativas de baço nativo e do arcabouço decelularizado corados por HE, mostrando a presença de células com seus núcleos no nativo e sua ausência com manutenção da ECM no arcabouço decelularizado. **(c-d)** Imagens do órgão nativo e do arcabouço corados com picrosulfúrio, demonstrando a preservação das fibras de colágeno após a decelularização. **(e-f)** Imagens de órgão nativo e do arcabouço corados com PAS, mostrando a preservação de glicoproteínas após a decelularização. **(g-h)** Análise imuno-histoquímica da glicoproteína fibronectina no tecido nativo e sua manutenção após a decelularização. **(i-j)** Análise imuno-histoquímica da glicoproteína laminina no tecido nativo e sua manutenção após a decelularização. **k)** Gráfico de barras mostrando a diferença no conteúdo de DNA residual entre o baço nativo e o arcabouço decelularizado. **l)** Gráfico de barras mostrando a diferença na concentração do teor residual de SDS no arcabouço em dois momentos do processo de decelularização: efluente coletado no final do processo de decelularização; efluente coletado após a etapa final de lavagem com H<sub>2</sub>O. **m)** Gráfico de barras mostrando que não há diferença entre o conteúdo de colágeno entre o baço nativo e o arcabouço. **n)** Gráfico de barras mostrando que não há diferença entre o conteúdo de GAGs sulfatados entre o baço nativo e o arcabouço. Todos os valores estão representados com média ± SEM, \* p < 0,05. Barra de escala: 100 µm. Polpa Branca: (PB); Polpa Vermelha (PV).

## 6.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

As análises de MEV e MET foram usadas para avaliar o impacto da descelularização na ultraestrutura da MEC. Observou-se a ausência de células e detritos celulares, com boa preservação e organização de importantes estruturas do parênquima esplênico, como polpa branca, zona marginal e polpa vermelha (**Figuras 31 a-d**). Além disso, foi observada uma boa preservação e integridade de toda a estrutura vascular esplênica, como a artéria central da polpa branca (AC) (**Figuras 31 a e c**), os vasos de grande calibre e os sinusóides de polpa vermelha (S) (**Figuras 31 b e d**). Nos vasos, foi possível observar a remoção total das células endoteliais após a descelularização com manutenção da membrana basal e estrutura do vaso, como no órgão nativo.

A análise do diâmetro das fibras demonstrou que elas possuíam diâmetros variáveis, partindo desde fibras muito pequenas (com 20 nanômetros de espessura) a fibras grandes (com aproximadamente 1000 nanômetros de espessura), com média de  $188,60 \text{ nm} \pm 28,18$  nanômetros (**Figura 31g**). A análise do MET pode destacar a ultraestrutura dos diferentes componentes da MEC do arcabouço que não são visíveis no baço nativo por causa das células presentes (**Figuras 31e e f**). Além disso, a organização e manutenção de estruturas fibrilares de colágeno com suas bandas claras e escuras podem ser claramente observadas (**Figura 31f**).



**Figura 31-** Análise ultraestrutural do arcabouço esplênico. **(a-d)** Micrografias eletrônicas de varredura mostrando a remoção de todas as células e seus detritos com a manutenção dos principais

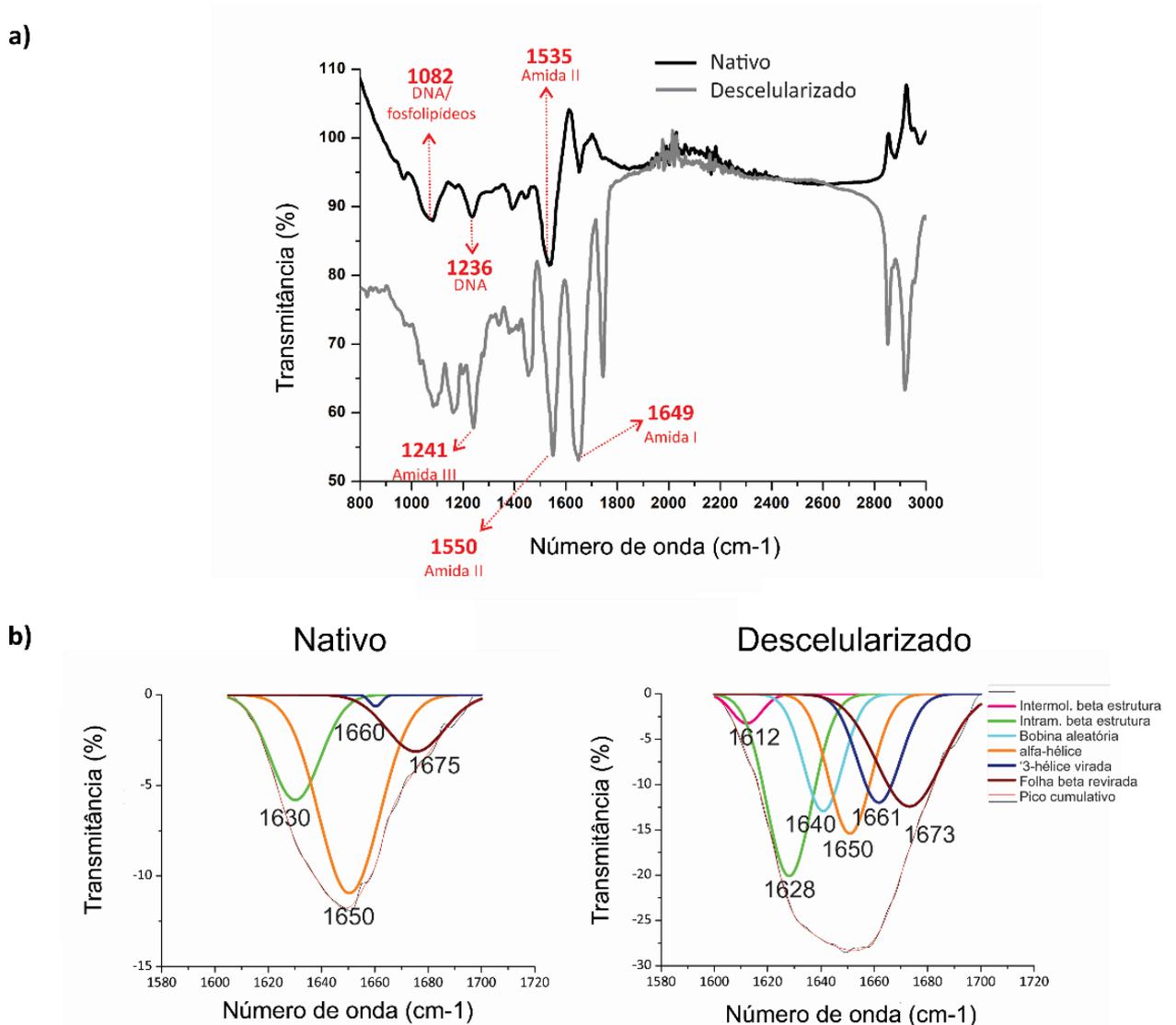
componentes do parênquima esplênico como no tecido nativo após a descclularização do arcabouço. **(e-f)** Análise ultraestrutural por MET demonstrando a ausência de células no arcabouço diferentemente do órgão nativo, além da manutenção dos principais componentes da MEC, principalmente fibras colágenas. **g)** Análise quantitativa das fibras da matriz de arcabouços descclularizados mostrando sua diversidade de diâmetros. Barras de escala: **a-d**: 20  $\mu\text{m}$ ; **e**: 10  $\mu\text{m}$ ; **f**: 1  $\mu\text{m}$ . Polpa Branca: **(PB)**; Polpa Vermelha **(PV)**; Zona marginal **(ZM)**; artéria central da polpa branca **(AC)**; sinusóides de polpa vermelha **(S)**.

### 6.3 ANÁLISE POR INFRAVERMELHO

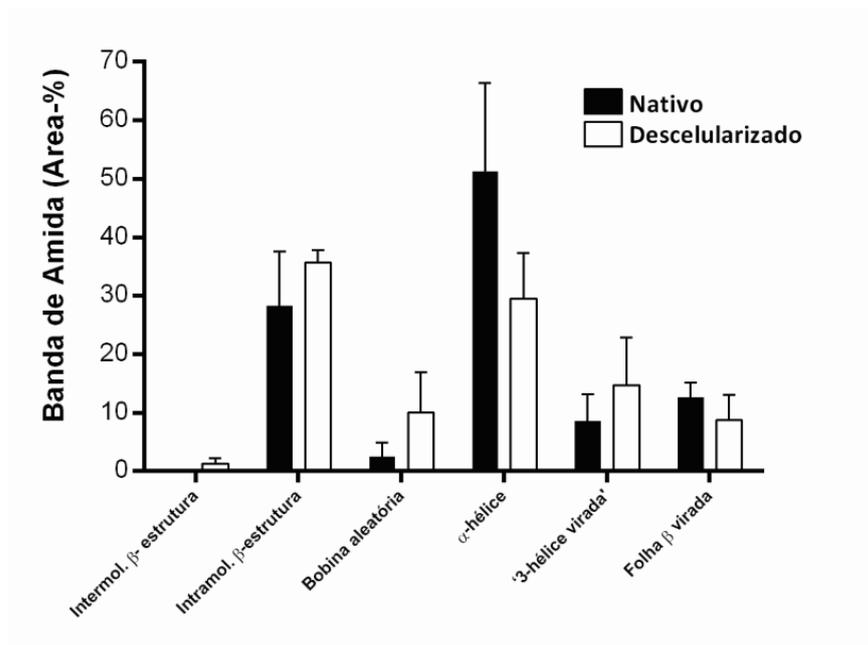
Para caracterizar quimicamente os tecidos antes e após a descclularização, utilizou-se a análise por infravermelho. Como mostrado na **Figura 32a**, os dados espectrais de tecidos nativos e descclularizados mostram diferenças. Primeiramente, poucos picos no tecido descclularizado têm posições com números de onda iguais aos do espectro obtido dos tecidos nativos. Os picos mais intensos obtidos em todos os baços nativos foram 1535  $\text{cm}^{-1}$  (Curvatura NH + alongamento C-N - amida II), 1082  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento simétrico  $\text{PO}_2$  - ácidos nucleicos e fosfolipídios) e 1236  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{PO}_2$ -estiramento assimétrico – ácidos nucleicos) (MALEK; WOOD; BAMBERY, 2014). Por outro lado, nos tecidos descclularizados os maiores picos foram 1649  $\text{cm}^{-1}$  (alongamento C = O + NH curvatura - amida I), 1550  $\text{cm}^{-1}$  (curvatura NH + CN alongamento - amida II) e 1241  $\text{cm}^{-1}$  (amida III) (MALEK; WOOD; BAMBERY, 2014).

A deconvolução dos espectros na região relacionada à banda amida I (1600 - 1700  $\text{cm}^{-1}$ ) foi usada para determinar a conformação da estrutura secundária do colágeno e de outras proteínas presentes no baço nativo e após a descclularização (YANG et al., 2015). A **Figura 32b** mostra deconvoluções representativas dos espectros provenientes do baço nativo e descclularizado, respectivamente. É possível observar que o tecido nativo apresenta um pico maior em 1650  $\text{cm}^{-1}$ , o qual está relacionado principalmente à estrutura da  $\alpha$ -hélice (STUART, 2004). Além disso, haviam vários picos menores em torno do pico principal, com números de onda em 1630  $\text{cm}^{-1}$ , 1660  $\text{cm}^{-1}$ , 1675  $\text{cm}^{-1}$ , relacionados à estrutura beta intramolecular, tripla hélice e folha  $\beta$  virada, respectivamente (MALEK; WOOD; BAMBERY, 2014b; STUART, 2004). Ao contrário do tecido nativo, o tecido descclularizado teve um pico maior em 1628  $\text{cm}^{-1}$ , que está relacionado com a estrutura  $\beta$  (MALEK; WOOD; BAMBERY, 2014b; STUART, 2004). Outros picos menores em torno foram 1612  $\text{cm}^{-1}$ , 1640  $\text{cm}^{-1}$ , 1650

$\text{cm}^{-1}$ ,  $1661 \text{ cm}^{-1}$  e  $1673 \text{ cm}^{-1}$ , relacionados à estrutura  $\beta$  intermolecular, espiral aleatória,  $\alpha$  hélice, tripla hélice e folha  $\beta$  revirada respectivamente (MALEK; WOOD; BAMBERY, 2014; STUART, 2004). Após o cálculo das porcentagens relacionadas às frações das várias conformações pertencentes à banda amida I ( $1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ ), foi possível obter uma compreensão mais clara sobre a estrutura secundária das proteínas antes e após a descelularização (**Figura 32c**). Apesar da diferença entre picos de números de onda da banda amida I, as porcentagens médias das áreas de cada conformação não mostraram diferença estatística entre os tecidos nativos e os descelularizados.



c)



**Figura 32-** Análise por infravermelho do arcabouço descelularizado. **a)** Espectro comparativo representativo entre o tecido nativo (linha preta) e o arcabouço descelularizado (linha cinza), mostrando a diferença entre a transmitância e os números de onda de cada tecido. **b)** Deconvoluções representativas dos tecidos nativos e descelularizados, exibindo as diferentes conformações das estruturas secundárias da banda amida I. **c)** Área relativa (%) de cada conformação calculada pela fração correspondente a formação da banda total de amida I.

#### 6.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

A análise proteômica foi realizada com o objetivo de obter uma melhor compreensão da influência do processo de descelularização sobre a matriz esplênica. Para isso, amostras representativas dos tecidos nativos e descelularizados foram processadas e analisadas em um espectrômetro de massa com geração de um espectro dos peptídeos. Estes, por sua vez, foram comparados com bancos de dados de proteínas da espécie *Rattus norvegicus* para determinação e quantificação das proteínas presentes nas amostras. No total, foram identificadas 411 proteínas, das quais 339 estavam relacionadas ao conteúdo celular (tabela de proteínas relacionadas ao conteúdo celular não mostrada) e 72 ao matrissoma esplênico (**Tabela 3**).

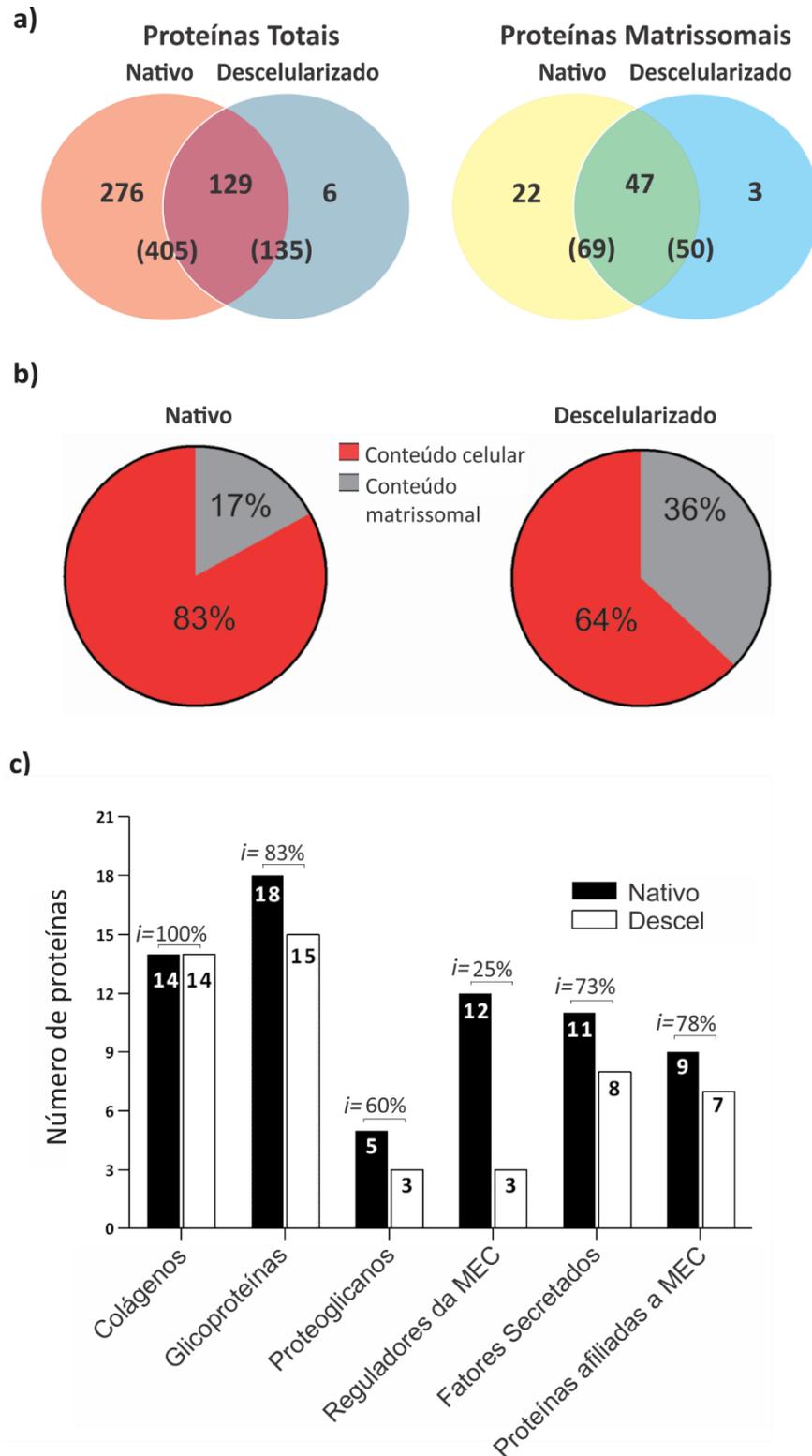
Das 411 proteínas identificadas, 405 estavam presentes em tecidos nativos e 135 em tecidos descelularizados, dos quais 129 foram identificados em ambos (6 presentes somente nos descelularizados). Em relação às proteínas constituintes do matrissoma, 69 estavam presentes no nativo e 50 estavam presentes nos arcabouços descelularizados, com 47 compartilhadas por ambos os tecidos (3 presentes somente nos descelularizados) (**Figura 33a e Tabela 3**). Ou seja, houve retenção de aproximadamente 72% no conteúdo de proteína matrissomal após o processo de descelularização.

A análise proporcional do teor de proteína celular e do matrissoma variou antes e após o processo de descelularização, com enriquecimento de proteínas matrissomais no órgão descelularizado com 17% no tecido nativo (69 matrissomais de 405 proteínas totais) vs. 37% no descelularizado (50 matrissomais de 135 proteínas totais) (**Figura 33b e Tabela 3**).

Após a separação das proteínas matrissomais por classe, foi possível observar quais foram mais ou menos influenciadas pelo processo de descelularização. Os subtipos de colágeno obtiveram a maior taxa de manutenção (*i*) com 100% de preservação, enquanto as proteínas reguladoras da MEC demonstraram ser as mais sensíveis ao processo de descelularização, com uma taxa de manutenção de cerca de 25% quando comparadas ao tecido nativo (**Figura 33c**).

A relação de cada proteína matrissomal e sua presença ou ausência nos tecidos nativos e descelularizados, bem como suas intensidades médias, são mostradas através da **Tabela 3**. Diferenças significativas foram observadas em relação a intensidade de algumas proteínas entre os grupos nativo e descelularizado, tais como: Proteinase Inibidor de Serina (Serpin1); Proteína Igh-6 (Igh-6); Anexina A3 (Anxa3) e Galectina-5 (Lgals5).

Entretanto, proteínas de extrema importância para a matriz, como os subtipos de colágeno e elastina (responsáveis pela manutenção da estrutura e modulação da diferenciação celular) (MOUW; OU; WEAVER, 2014), lamininas (responsáveis pela adesão celular) (MOUW; OU; WEAVER, 2014) e fibronectina (regulam a adesão, migração e diferenciação celular) (MOUW; OU; WEAVER, 2014), entre outras, não obtiveram perdas significativas ou mesmo apresentaram maior intensidade (**Tabela 3**).



**Figura 33-** Conteúdo celular e matrissomal antes e após o processo de descclularização do baço. **a)** Composição percentual relativa ao conteúdo de proteína celular e matrissomal no tecido nativo e descclularizado. **b)** Diagrama de Venn mostrando a quantidade de proteínas totais e matrissomais compartilhadas entre os tecidos nativos e descclularizados. **c)** Gráfico de barras mostrando o número de proteínas e a taxa de manutenção percentual (*i*) por classe entre tecidos nativos e descclularizados (c). Os resultados são representados como a porcentagem do número total de proteínas e entre parênteses, como o número de proteínas para cada classificação.

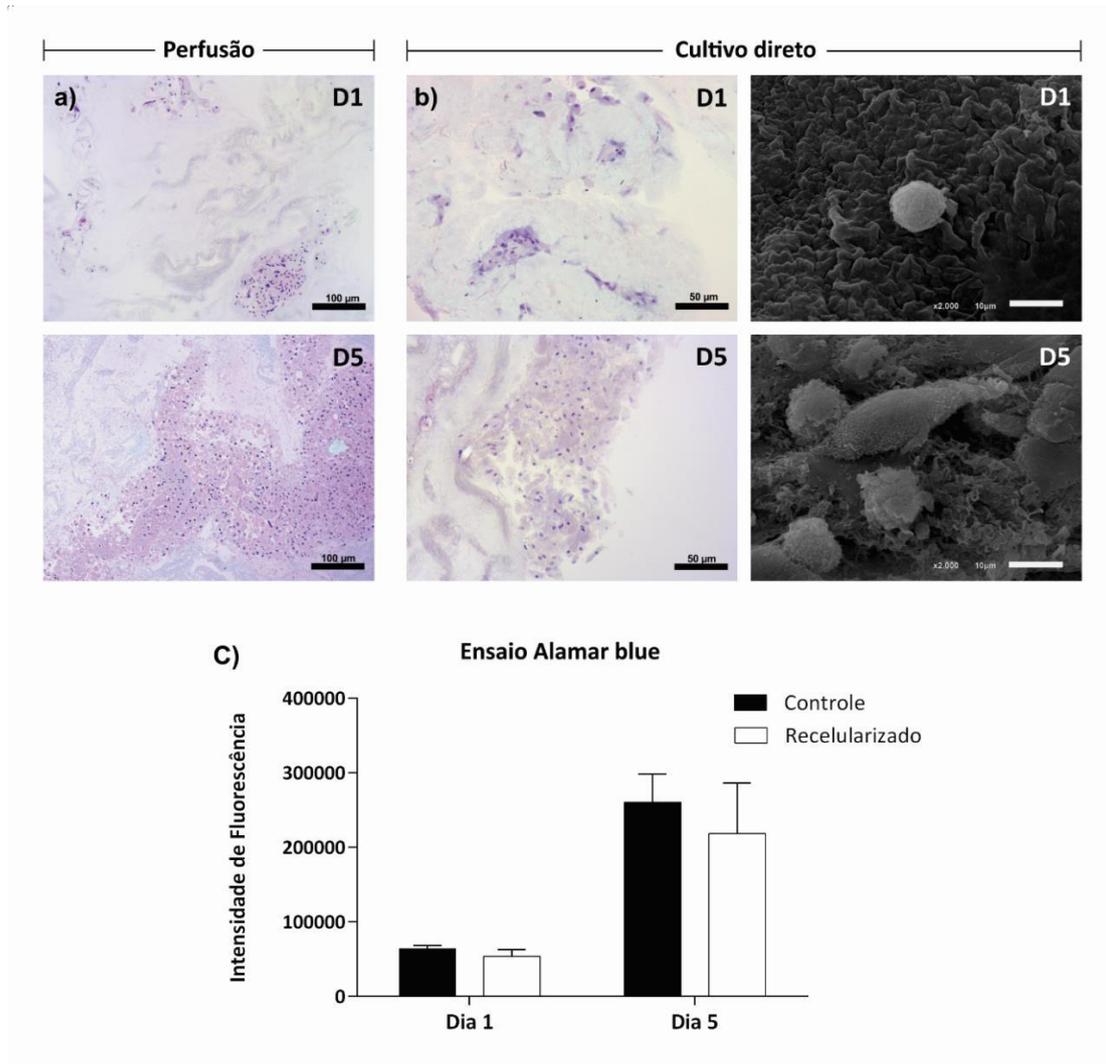
**Tabela 3 -** Relação de proteínas matrissomais presentes e ausentes em tecidos esplênicos nativos e descelularizados com sua intensidade média.

Classe de Proteínas	Gene	Nome da Proteína	Intensidade Média (Média ± EPM) *p<0,05		
			Nativo	Decel	
Colágenos	Col1a1	Colágeno tipo I cadeia alfa 1	2,66E+08 ± 1,23E+08	1,72E+08 ± 7,34E+07	
	Col1a2	Colágeno tipo I cadeia alfa 2	2,20E+08 ± 9,99E+07	2,32E+08 ± 1,35E+08	
	Col4a1	Colágeno tipo IV cadeia alfa 1	3,55E+07 ± 2,39E+07	1,18E+08 ± 4,56E+07	
	Col4a2	Colágeno tipo IV cadeia alfa 2	8,33E+07 ± 3,46E+07	1,45E+08 ± 6,52E+07	
	Col5a1	Colágeno tipo V cadeia alfa 1	8,17E+06 ± 5,99E+06	1,60E+07 ± 7,00E+06	
	Col5a2	Colágeno tipo V cadeia alfa 2	2,33E+06 ± 2,33E+06	5,93E+05 ± 5,93E+05	
	Col6a1	Colágeno tipo VI cadeia alfa 1	4,52E+08 ± 1,89E+08	3,96E+08 ± 2,72E+08	
	Col6a2	Colágeno tipo VI cadeia alfa 2	7,61E+08 ± 2,30E+08	5,05E+08 ± 3,42E+08	
	Col6a3	Colágeno tipo VI cadeia alfa 3	2,75E+07 ± 1,85E+07	3,70E+07 ± 2,78E+07	
	Col6a5	Colágeno tipo VI cadeia alfa 5	4,06E+08 ± 1,38E+08	3,74E+08 ± 2,08E+08	
	Col12a1	Colágeno tipo XII cadeia alfa 1	1,89E+07 ± 1,08E+07	6,60E+06 ± 6,41E+06	
	Col18a1	Colágeno tipo XVIII cadeia alfa 1	6,90E+06 ± 2,81E+06	1,00E+04 ± 1,00E+04	
	procol1a2	Pró-colágeno I cadeia alfa 2	2,20E+08 ± 9,99E+07	1,98E+08 ± 1,11E+08	
	procol6a1	Pró-colágeno tipo VI cadeia alfa 1	4,57E+08 ± 1,89E+08	3,77E+08 ± 2,68E+08	
	Glicoproteínas	Eln	Elastina microfibrila 1	9,93E+07 ± 5,06E+07	1,50E+08 ± 6,41E+07
		Emilin1	Emilina 1	1,09E+08 ± 4,44E+07	1,41E+08 ± 6,30E+07
		Fga	Fibrinogênio cadeia alfa	1,05E+07 ± 4,16E+06	6,57E+06 ± 4,49E+06
Fbn1		Fibrilina 1	4,75E+07 ± 2,51E+07	1,17E+08 ± 5,37E+07	
Fgb		Fibrinogênio cadeia beta	5,35E+07 ± 2,94E+07	9,15E+06 ± 5,71E+06	
Fgg		Fibrinogênio cadeia gama	5,34E+07 ± 4,08E+07	1,76E+07 ± 1,25E+07	
Fn1		Fibronectina	1,73E+08 ± 6,01E+07	6,78E+07 ± 3,40E+07	
Lama5		Lamina subunidade alfa 5	2,88E+06 ± 1,26E+06	1,11E+07 ± 6,37E+06	
Lamb2		Lamina subunidade beta 2	2,86E+06 ± 1,72E+06	1,72E+06 ± 7,63E+05	
Lamc1		Lamina subunidade gama 1	1,71E+07 ± 9,70E+06	1,15E+07 ± 3,10E+06	
Ltbp1		TGF beta proteína 1		1,90E+07 ± 1,25E+07	
Mmrr1		Multimerina 1	7,41E+05 ± 5,10E+05		
Nid-2		Nidogênio 2	2,84E+06 ± 1,21E+06		
Susd2		Domínio Sushi 2 isoforma CRA_a	1,14E+07 ± 5,50E+06		
Thbs1		Trombospondina 1	6,76E+07 ± 3,66E+07	9,20E+05 ± 9,20E+05	
Tnxb		Tenascina-X (Fragmento)	1,16E+07 ± 7,02E+06	1,58E+07 ± 1,46E+07	
Tgfb1		Fator Transformante de crescimento, beta-induzido		2,09E+07 ± 1,89E+07	
Tinag1		Antígeno Tubulointersticial	1,93E+07 ± 9,06E+06	2,42E+07 ± 6,10E+06	
Vwf		Fator de von Willebrand	8,84E+06 ± 5,17E+06	5,88E+05 ± 5,88E+05	
Proteoglicanos		Pgpm	Sulfato de heparan	2,25E+06 ± 6,53E+05	7,37E+04 ± 0,00E+00
	Bgn	Biglican	1,16E+08 ± 2,26E+07		
	Prg2	Proteoglicano da medula óssea	2,11E+08 ± 1,38E+08	4,00E+07 ± 3,44E+07	
	Lum	Lumican	2,92E+07 ± 2,10E+07	5,98E+06 ± 5,98E+06	
	Prelp	Prolargina	6,78E+06 ± 5,03E+06		
Reguladores da MEC	Serpina1	Alfa-1-antiproteínase	7,59E+07 ± 3,76E+07		
	ApoE	Apolipoproteína E	1,66E+07 ± 4,00E+06		
	Ctsb	Catepsina B	7,95E+07 ± 3,89E+07	7,88E+05 ± 7,88E+05	
	CtsG	Catepsina G	2,57E+07 ± 1,12E+07		
	CtsZ	Catepsina Z	4,43E+06 ± 1,69E+06		
	Dpp4	Dipeptidil peptidase 4	1,49E+06 ± 1,35E+06		
	Serpinh1a	Elastase A inibidora de leucócitos	1,90E+06 ± 1,12E+06	2,03E+05 ± 2,03E+05	
	Mug1	Murinoglobulina-1	7,28E+07 ± 2,19E+07		
	Serpin1	Proteínase inibidora de Serina ou Cisteína	6,87E+07 ± 2,20E+07 *	1,07E+07 ± 5,01E+06	
	Tf	Serotransferrina	4,73E+06 ± 3,76E+06		
Serpinh1	Precursor de Serpina H1	2,58E+07 ± 1,27E+07			
Tgm2	Transglutaminase 2, polipeptídeo C	5,65E+07 ± 2,15E+07			
Fatores Secretados	B2m	Beta-2-microglobulina	4,38E+07 ± 2,61E+07		
	N/A	Dermicidina	7,70E+07 ± 2,59E+07	1,37E+08 ± 8,11E+07	
	Gsn	Gelsolina	1,40E+08 ± 4,57E+07		
	N/A	Cadeia Ig kappa	9,94E+07 ± 5,78E+07	1,21E+06 ± 1,21E+06	
	Igh-6	Proteína Igh-6	2,15E+08 ± 9,45E+07 *	2,85E+07 ± 1,23E+07	
	AOA0G2K1A2	Mieloperoxidase	4,24E+07 ± 2,42E+07	2,79E+07 ± 1,60E+07	
	Np4	Pepídeo antibiótico de Neutrófilo NP-4	8,74E+07 ± 1,22E+07	3,16E+07 ± 1,36E+07	
	D3Z96	Proteína granulocítica de Neutrófilos	7,56E+07 ± 2,32E+07		
	Pf4	Plaqueta fator 4	6,69E+07 ± 2,49E+07	4,56E+06 ± 3,14E+06	
	S100a8	Proteína S100-A8	3,84E+07 ± 1,91E+07	7,85E+06 ± 7,52E+06	
	S100a9	Proteína S100-A9	7,16E+06 ± 3,37E+06	2,71E+06 ± 1,68E+06	
	Proteínas afiliadas a MEC	Anxa1	Anexina A1	1,95E+07 ± 1,04E+07	1,48E+06 ± 1,48E+06
Anxa2		Anexina A2	2,47E+07 ± 6,84E+06	2,83E+06 ± 2,83E+06	
Anxa3		Anexina A3	8,00E+07 ± 4,60E+07 *	9,05E+05 ± 9,05E+05	
Anxa6		Anexina A6	2,83E+07 ± 1,29E+07	3,95E+07 ± 2,14E+07	
Anxa11		Anexina A11	6,13E+05 ± 6,13E+05	1,53E+07 ± 1,04E+07	
Anxa4		Anexina A4		1,32E+07 ± 6,83E+06	
C3		Complemento C3	1,05E+05 ± 7,54E+04		
C1qbp		Complemento componente 1 Q	1,30E+07 ± 7,76E+06		
Fcna		Ficolina 1	1,95E+07 ± 1,33E+07	8,23E+05 ± 8,23E+05	
Lgals1		Galectina-1	7,45E+06 ± 2,45E+06		
Lgals5	Galectina-5	7,05E+07 ± 2,15E+07 *	1,05E+05 ± 1,05E+05		
			Total proteínas: 69 Nativo vs 50 Descelularizado		

## 6.5 RECELULARIZAÇÃO

Os arcabouços esplênicos foram recelularizados com células estromais oriundas do baço de neonatos por 5 dias, através de dois protocolos diferentes: perfusão de células através da artéria esplênica e cultivo direto sobre o arcabouço (**Figura 34**). A coloração por hematoxilina e eosina e a análise por microscopia eletrônica de varredura confirmaram a capacidade do arcabouço esplênico em suportar a adesão e o crescimento celular. As células aumentaram em número do dia 1 para o dia 5, em ambos os métodos de sementeira, indicando a capacidade do arcabouço em suportar a proliferação das células estromais (**Figuras 34a e b**).

Através do ensaio Alamar blue foi possível confirmar a proliferação celular, além de quantificar a viabilidade das células cultivadas com o arcabouço. A intensidade de fluorescência produzida através da metabolização da rezasurina pelas células estromais viáveis aumentou consideravelmente do dia 1 ( $64080 \pm 4036$  vs.  $54186 \pm 8501$ ) para o dia 5 ( $260952 \pm 37211$  vs.  $218730 \pm 67812$ ), tanto no grupo de células cultivadas individualmente quanto no grupo de células cultivadas no arcabouço, respectivamente. Além disso, quando comparados os grupos controle e recelularizado não houve diferença na intensidade de fluorescência para o dia 1 e para o dia 5, demonstrando desse modo, que o arcabouço não foi citotóxico para as células (**Figura 34c**).



**Figura 34** - Recelularização do arcabouço esplênico. **a)** Imagens representativas de hematoxilina e eosina mostrando o arcabouço recelularizado com células estromais pelo método de perfusão, nos dias 1 e 5 após semeadura. **b)** Imagens representativas de hematoxilina e eosina e MEV mostrando o arcabouço recelularizado com células estromais pelo método de cultivo direto sobre a MEC, nos dias 1 e 5 após semeadura. **c)** Ensaio de viabilidade e proliferação com Alamar blue, mostrando a diferença de intensidade de fluorescência produzida pelas células metabolicamente ativas nos grupos controle (somente células) e recelularizado (células + arcabouço), após 1 e 5 dias da semeadura.

## 7. DISCUSSÃO

Neste trabalho, utilizamos a técnica de descelularização para criar uma matriz esplênica acelular com manutenção dos principais constituintes da MEC. Até o momento, existem apenas 6 trabalhos com descelularização de baço: GAO et al., 2015, ZHENG et al., 2015, XIANG et al., 2015, XIANG et al., 2016, LIU et al., 2019 e VISHWAKARMA et al., 2019. No entanto, a maioria desses trabalhos tiveram o mesmo propósito: utilizar a matriz esplênica descelularizada como um suporte para promover a regeneração de hepatócitos e tentar restaurar a função hepática. Já no estudo de Vishwakarma, descelularizou-se o baço com o objetivo de produzir um neo-órgão produtor de insulina, para uso em distúrbios endócrinos, tais como no diabetes *mellitus* não controlado. De outro modo, em nosso estudo, objetivamos produzir um arcabouço esplênico viável, que possa ser utilizado em estudos posteriores que visem restaurar a função do baço ou até mesmo em estudos que visem estudar a estrutura de sua matriz extracelular. Para isso, foi utilizado um protocolo adaptado de Gao et al (2015), onde o baço de ratos foi descelularizado com detergente (SDS) em uma concentração menor que a utilizada para outros órgãos, como coração (NGUYEN et al., 2018), rim (SULLIVAN et al., 2012), fígado (ROBERTSON et al., 2018), entre outros, que usam uma concentração de SDS em torno de 1%. Assim, após 9 horas do início do processo de descelularização com SDS, obtemos um arcabouço totalmente translúcido.

Em comparação com o estudo de Gao, utilizamos um protocolo que não utiliza o método de congelamento/descongelamento. Isso pode ser vantajoso, visto que esse processo pode levar a uma ruptura e ou degradação dos principais componentes da MEC, prejudicando as etapas de recelularização e transplante. Além disso, Gao não utilizou um sistema para monitorar a pressão de perfusão no arcabouço, o que pode ser extremamente prejudicial para a matriz (CRAPO et al., 2011).

Com o objetivo de demonstrar que o processo de descelularização removia a maior parte do material celular com manutenção dos principais componentes da MEC, sendo assim viável para uso em bioengenharia tecidual, avaliamos extensivamente o arcabouço através de diferentes metodologias, como histoquímica, imunohistoquímica, quantificação de componentes da matriz, DNA e conteúdo de SDS residual. Primeiramente, para evitar possíveis reações inflamatórias no hospedeiro,

avaliamos a remoção do conteúdo de DNA presente no arcabouço após a descclularização. Segundo Crapo; Gilbert; Badylak, 2011, como critério mínimo para uma boa descclularização, o arcabouço deve conter no máximo 50 ng/mg de DNA por peso seco, além da ausência de células visíveis após a coloração com hematoxilina e eosina. Obtemos uma média aproximada de 50 ng/mg de DNA por peso seco no órgão descclularizado, o que é suficiente para evitar possíveis respostas imunológicas após o transplante para o hospedeiro. Além disso, similarmente ao encontrado no estudo de Gao et al., 2015, obtivemos uma média aproximada de 99% de redução no conteúdo de DNA quando comparado a tecidos nativos e descclularizados. Acreditamos que o sucesso na redução do conteúdo de DNA após a descclularização se deve em parte à regulação do fluxo e à pressão de infusão dos detergentes, que ocorreram durante todo o processamento e que consideramos indispensáveis para o sucesso da descclularização.

Da mesma forma, é extremamente importante remover o SDS do arcabouço, pois sabe-se que ele pode prejudicar a recelularização, se presente em altas concentrações. Em um estudo de ZVAROVA et al., 2016, onde foi avaliado o impacto da concentração de SDS residual no lavabo após descclularização de pulmão em diferentes tipos celulares, observou-se que existe um limiar de concentração diferente para cada tipo celular. Por exemplo, células-tronco mesenquimais humanas sobreviviam a concentrações de SDS de 0,002%, enquanto a linhagem celular endotelial vascular pulmonar humana necessita de concentrações abaixo de 0.00012 % de SDS residual no lavabo. Em nosso estudo obtemos 0,01% de SDS residual no lavabo, o qual está muito acima dos valores do estudo de Zvarova. Entretanto, isso não impediu a adesão, proliferação e viabilidade de células estromais esplênicas de ratos neonatos, quando cultivados com o arcabouço. De outro modo, são necessários mais estudos para atestar se essa concentração é citotóxica ou não para outros tipos celulares.

Macroscopicamente, o arcabouço descclularizado era completamente translúcido e mantinha sua forma e estrutura tridimensional. Além disso, análises histológicas e de MEV demonstraram a manutenção de estruturas do parênquima esplênico, como polpa branca, zona marginal e polpa vermelha, além da rede vascular. A manutenção de sua estrutura macroscópica e microscópica é de extrema importância, pois servirá de suporte para as células após a recelularização. Além disso, a preservação da rede

vascular é fundamental para o suprimento de nutrientes e remoção de metabólitos no arcabouço (ZHENG et al., 2015).

A retenção de proteínas da MEC nativas é essencial para replicar o nicho de células da MEC, além de facilitar a ligação e sinalização celular (SACKETT et al., 2018). O colágeno é o principal componente da MEC e desempenha um papel fundamental na biomecânica, transduzindo as forças teciduais nas células (WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018). Além disso, o colágeno atua modulando o fenótipo e funções celulares armazenando localmente e liberando fatores de crescimento e citocinas durante os processos de reparo tecidual (MIRANDA-NIEVES; CHAIKOF, 2017). Para confirmar a manutenção do colágeno após a descclularização, várias técnicas foram utilizadas, como coloração por picrossirius, quantificação indireta por hidroxiprolina, além das análises por MET e MEV. Neste estudo, demonstramos não apenas a manutenção do colágeno no arcabouço descclularizado, mas também a manutenção de seu diâmetro após sua quantificação em imagens de MEV. Sua estrutura secundária foi mantida, como demonstrado após a deconvolução e análise do espectro da banda amida I por FTIR, na região de 1600-1700. Estes resultados sugerem a ausência de ruptura ou pequena ruptura das estruturas de colágeno após a descclularização, assim como demonstrado no estudo de (NARA et al., 2016), que analisou a estrutura secundária do colágeno após descclularização de córnea.

Outras moléculas de extrema importância também foram preservadas no arcabouço após a descclularização como glicoproteínas (lamininas e fibronectinas) e GAGs sulfatadas. Corroborando com nossos achados, outros estudos também demonstraram a manutenção desses componentes da MEC em vários órgãos como o coração (MORONI; MIRABELLA, 2014), rim (BONANDRINI et al., 2014), fígado (SHUPE et al., 2010) e pâncreas (ELEBRING et al., 2017), ressaltando sua importância. No baço, várias moléculas da matriz, como laminina, fibronectina e colágenos, constituem as membranas basais e intersticiais desse órgão, sendo fundamentais para a manutenção de sua estrutura (LOKMIC et al., 2008). Além disso, sabe-se que as moléculas da MEC regulam a adesão, migração, proliferação, apoptose, sobrevivência e diferenciação celular e são, portanto, indispensáveis para o sucesso da recclularização (PELOSO et al., 2016).

A análise proteômica pode confirmar os achados anteriores, além de esclarecer completamente a estrutura esplênica, através de uma análise completa da MEC do baço nativo e após a descelularização. Os subtipos de colágenos têm a melhor retenção na MEC após a descelularização, com intensidades muito próximas aos tecidos nativos, tal como observado diversos em estudos (LI et al., 2016; SACKETT et al., 2018). Apesar de algumas proteínas reduzirem sua intensidade no material descelularizado em relação ao tecido nativo, muitas delas aumentam de intensidade, o que significa que, em relação a outras proteínas da MEC, elas são mais enriquecidas após a descelularização (SACKETT et al., 2018). O mesmo não é verdadeiro para proteoglicanos, reguladores da MEC, fatores secretados e proteínas associadas à matriz que obtiveram abundância no nativo com redução da intensidade após descelularização. Isso era esperado, uma vez que, com exceção dos proteoglicanos, todas as outras classes de moléculas não estão ligadas ou fracamente ligadas à MEC, sendo, portanto, mais “fáceis” de remover.

Após atestar a manutenção e preservação dos principais componentes da MEC, verificamos a capacidade do arcabouço em suportar a adesão, crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Para isso utilizamos células estromais esplênicas de ratos neonatos, visto que essas células (e não linfócitos) são fundamentais para regeneração do baço (TAN; WATANABE, 2014). Corroborando com esse resultado, Tan; Watanabe, 2017 identificaram que a população celular estromal MAdCAM-1<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD201<sup>+</sup> é essencial para a formação de novos tecidos. Apesar da regeneração completa do tecido esplênico, ambos os trabalhos utilizaram a cápsula renal para transplantar as células estromais individualmente, seja pela grande vascularização local ou devido à falta de um suporte ideal para semeadura das células. Assim, a MEC esplênica descelularizada funcionaria como um arcabouço ideal, servindo como suporte para semeadura, com modulação do comportamento celular. Além disso, após recelularizado, o arcabouço poderia ser reimplantado em vários sítios anatômicos, inclusive no peritônio, sobre o omento maior, local de origem anatômica do baço.

Futuramente, outros estudos são necessários para avaliar a capacidade do arcabouço esplênico em suportar a adesão, proliferação e sobrevivência de outros tipos celulares com possibilidade real de aplicação na prática clínica, tais como o *pool* de células esplênicas e *pool* de células da medula óssea. Além disso, em nosso estudo não foi

avaliado a influência do arcabouço sobre a diferenciação celular. Do mesmo modo, se fazem necessários outros estudos para avaliar a funcionalidade *in vitro* e *in vivo* do arcabouço esplênico recelularizado, principalmente após infecção por bactérias encapsuladas.

## 8. CONCLUSÃO

Este estudo fornece um método simples e eficiente para descelularização do baço, usando o detergente SDS em baixa concentração. Além disso, apresentamos uma visão geral da estrutura e composição molecular do baço antes e após a descelularização, sendo este o primeiro trabalho relatando quantitativamente por espectrometria de massa as proteínas da MEC esplênica de ratos após a descelularização. Posteriormente, demonstramos que o arcabouço por nós desenvolvido suporta a adesão e proliferação, além de manter a viabilidade de células estromais esplênicas após semeadura. Assim, esperamos que este trabalho sirva de base para trabalhos futuros que pretendam utilizar esse arcabouço para reconstituir a função esplênica, ou mesmo para estudos comparativos que avaliem mudanças na estrutura e proteoma da MEC do baço causadas por doenças.

## 9. REFERÊNCIAS

- BAJÉNOFF, M.; GLAICHENHAUS, N.; GERMAIN, R. N. Fibroblastic Reticular Cells Guide T Lymphocyte Entry into and Migration within the Splenic T Cell Zone. **The Journal of Immunology**, 2008.
- BARALLOBRE-BARREIRO, J. et al. Glycoproteomics of the Extracellular Matrix: A Method for Intact Glycopeptide Analysis Using Mass Spectrometry. **Journal of Visualized Experiments**, n. 122, 2017.
- BOAM, T. et al. Adherence to vaccination guidelines post splenectomy: A five year follow up study. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 6, p. 803–808, 2017.
- BONANDRINI, B. et al. Recellularization of Well-Preserved Acellular Kidney Scaffold Using Embryonic Stem Cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 9–10, p. 1486–1498, 2014.
- BORGES DA SILVA, H. et al. **Splenic macrophage subsets and their function during blood-borne infections** *Frontiers in Immunology*, 2015.
- BRONTE, V.; PITTET, M. J. **The spleen in local and systemic regulation of immunity** *Immunity*, 2013.
- BRUFORD, M. W. et al. **Single-locus and multilocus DNA fingerprinting**. [s.l: s.n.] 1992.
- CALDERWOOD, D. A.; CAMPBELL, I. D.; CRITCHLEY, D. R. **Talins and kindlins: Partners in integrin-mediated adhesion** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013.
- CARLSON, C. G. Determination of hydroxyproline content as a measure of fibrosis in nondystrophic and dystrophic skeletal muscle . **Neuromuscular Network**, v. 1, p. 1–10, 2014.
- CESTA, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 455–465, 25 Aug. 2006.
- COUCHMAN, J. R.; PATAKI, C. A. An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 2012.

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

DA SILVA, A. V. A. et al. Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of *Leishmania infantum*-naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4+ T cell frequency in spleens. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2018.

DE PORTO, A. P. N. A. et al. **Assessment of splenic function***European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2010.

DEN HAAN, J. M. M.; KRAAL, G. **Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen***Journal of Innate Immunity*, 2012.

DEN HAAN, J. M.; MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Stromal cells of the mouse spleen. **Frontiers in Immunology**, 2012.

DESTEFANI, A. C.; SIRTOLI, G. M.; NOGUEIRA, B. V. Advances in the Knowledge about Kidney Decellularization and Repopulation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2017.

DIAMETER J. Disponível em: <<https://imagej.net/DiameterJ>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2020.

DI SABATINO, A.; CARSETTI, R.; CORAZZA, G. R. **Post-splenectomy and hyposplenic states***The Lancet*, 2011.

DOMOGATSKAYA, A.; RODIN, S.; TRYGGVASON, K. Functional Diversity of Laminins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 2012.

ELEBRING, E. et al. Cold-perfusion decellularization of whole-organ porcine pancreas supports human fetal pancreatic cell attachment and expression of endocrine and exocrine markers. **Journal of Tissue Engineering**, 2017.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, 2010.

GANZ, T. Review Macrophages and Iron Metabolism. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 492–504, 2016.  
GAO, R. et al. Hepatocyte culture in autologous decellularized spleen matrix. **Organogenesis**, v. 11, n. 1, p. 16–29, 2015.

GARRETA, E. et al. **Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting** **Materials Today**, 2017.

GENOVESE, L.; BRENDOLAN, A. **Lymphoid tissue mesenchymal stromal cells in development and tissue remodeling** **Stem Cells International**, 2016.

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

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

GOLUB, R. et al. **Origin and Immunological Functions of Spleen Stromal Cells** **Trends in Immunology**, 2018.

GUPTA, S. K. et al. Surface modified goat-lung decellularized scaffold for bio-artificial skin tissue engineering applications. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, 2013.

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

HILLEBRANDT, K. H. et al. Strategies based on organ decellularization and recellularization. **Transplant international**. v. 32, p. 571-585, 2019.

HOTALING, N. A. et al. DiameterJ: A validated open source nanofiber diameter measurement tool. **Biomaterials**, v. 61, p. 327–338, 2015.

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

HYNES, R. O.; NABA, A. Overview of the matrisome-An inventory of extracellular matrix constituents and functions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 1, 2012.

IJIMA, S. Sporadic isolated congenital asplenia with fulminant pneumococcal meningitis: A case report and updated literature review. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 2017.

JAYADEV, R.; SHERWOOD, D. R. **Basement membranes***Current Biology*, 2017.

KAPLINSKY, C.; SPIRER, Z. Post-splenectomy antibiotic prophylaxis unfinished story: To treat or not to treat? **Pediatric Blood & Cancer**, v. 47, n. S5, p. 740741, 2006. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/pbc.21014>&gt;.

KARLSSON, M.; BJÖRNSSON, S. Quantitation of Proteoglycans in Biological Fluids Using Alcian Blue. In: **Proteoglycan Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2001. v. 171p. 159–173.

KLIMENT, C. R. et al. A novel method for accurate collagen and biochemical assessment of pulmonary tissue utilizing one animal. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 4, n. 4, p. 349–355, 2011.

KODAMA, S.; DAVIS, M.; FAUSTMAN, D. L. **Regenerative medicine: A radical reappraisal of the spleen***Trends in Molecular Medicine*, 2005.

KRISTINSSON, S. Y. et al. Long-term risks after splenectomy among 8,149 cancer-free American veterans: A cohort study with up to 27 years follow-up. **Haematologica**, v. 99, n. 2, p. 392–398, 2014.

KULAR, J. K.; BASU, S.; SHARMA, R. I. **The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering***Journal of Tissue Engineering*, 2014.

KYAW, M. H.; HOLMES, E. M.; TOOLIS, F.; et al. Evaluation of severe infection and survival after splenectomy. **The American journal of medicine**, v. 119, n. 3, p. 276.e17, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16490477>&gt;

Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares – LABIOM-UFES. Disponível em: <<http://labiom.ufes.br/espectrofot%C3%B4metro-nanodrop%C2%AE-2000-thermo-scientific>>.

Acesso em: 22 de janeiro de 2020.

Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins – LUCCAR-UFES. Disponível em: <<http://www.luccar.ufes.br/equipamentos>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2020.

- LEVENBERG, S.; KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. Embryonic Stem Cells in Tissue Engineering. In: **Essentials of Stem Cell Biology: Third Edition**. [s.l: s.n.].
- LI, Q. et al. Proteomic analysis of naturally-sourced biological scaffolds. **Biomaterials**, v. 75, p. 37–46, 2016.
- LIU, P. et al. Hemocompatibility improvement of decellularized spleen matrix for constructing transplantable bioartificial liver. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 14, n. 2, 2019.
- LOKMIC, Z. et al. The extracellular matrix of the spleen as a potential organizer of immune cell compartments. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 1, p. 4–13, 2008.
- LONDONO, R.; BADYLAK, S. F. Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In vivo Remodeling. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, n. 3, p. 577–592, 12 Mar. 2015.
- LU, P. et al. Extracellular Matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2011.
- MALEK, K.; WOOD, B. R.; BAMBERY, K. R. FTIR Imaging of Tissues: Techniques and Methods of Analysis. In: **Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 419–473.
- MALHOTRA, D.; FLETCHER, A. L.; TURLEY, S. J. Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity. **Immunological Reviews**, v. 251, n. 1, p. 160–176, Jan. 2013.
- MAZZA, G. et al. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.
- MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 606–616, 2005.
- MECHAM, R. P. Overview of Extracellular Matrix. **Current Protocols in Cell Biology**, n. December, p. 1–16, 2012.
- MESCHER, A. L. The Immune System & Lymphoid Organs. In: **Junqueira's Basic Histology, 14e**. [s.l: s.n.].

MIRANDA-NIEVES, D.; CHAIKOF, E. L. **Collagen and Elastin Biomaterials for the Fabrication of Engineered Living Tissues**ACS Biomaterials Science and Engineering, 2017.

MONCRIEF, K.; KAUFMAN, S. Splenic baroreceptors control splenic afferent nerve activity. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 290, n. 2, p. R352–R356, 2006.

MORONI, F.; MIRABELLA, T. Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering. **Am J Stem Cells**, 2014.

MOUW, J. K.; OU, G.; WEAVER, V. M. **Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction**Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014.

MUIZNIEKS, L. D.; KEELEY, F. W. **Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective**Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 2013.

NABA, A. et al. The Matrisome: *In Silico* Definition and *In Vivo* Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices. **Molecular & Cellular Proteomics**, 2012.

NABA, A. et al. **The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era**Matrix Biology, 2016.

NARA, S. et al. Preservation of biomacromolecular composition and ultrastructure of a decellularized cornea using a perfusion bioreactor. **RSC Advances**, v. 6, n. 3, p. 2225–2240, 2016.

NGUYEN, D. T. et al. Humanizing Miniature Hearts through 4-Flow Cannulation Perfusion Decellularization and Recellularization. **Scientific Reports**, 2018.

O'NEILL, H. C. et al. **Spleen as a site for hematopoiesis of a distinct antigen presenting cell type**Stem Cells International, 2011.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. **Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling**Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007.

PELOSO, A. et al. Glycosaminoglycans as a measure of outcome of cell-on-scaffold seeding (decellularization) technology. **Expert Review of Medical Devices**, v. 13, n. 12, p. 1067–1068, 2016.

PLANTMAN, S. Proregenerative Properties of ECM Molecules. **BioMed Research International**, 2013.

POLÁK, Š.; GÁLFIOVÁ, P.; VARGA, I. Ultrastructure of human spleen in transmission and scanning electron microscope. **Biologia**, v. 64, n. 2, Jan. 2009.

RAM, S.; LEWIS, L. A.; RICE, P. A. **Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy** *Clinical Microbiology Reviews*, 2010.

REMUZZI, A. et al. Experimental Evaluation of Kidney Regeneration by Organ Scaffold Recellularization. **Scientific Reports**, 2017.

RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2011.

ROBERTSON, M. J. et al. Recellularization of rat liver: An in vitro model for assessing human drug metabolism and liver biology. **PLoS ONE**, 2018.

RUBIN, L. G.; SCHAFFNER, W. Care of the Asplenic Patient. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 4, p. 349–356, 2014.

RUVINOV, E.; COHEN, S. Alginate biomaterial for the treatment of myocardial infarction: Progress, translational strategies, and clinical outlook. From ocean algae to patient bedside. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016.

SACKETT, S. D. et al. Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. **Scientific Reports**, 2018.

SAMUEL, C. S. Determination of collagen content, concentration, and sub-types in kidney tissue. **Methods in Molecular Biology**, v. 466, p. 223–235, 2009.

SCARRITT, M. E.; PASHOS, N. C.; BUNNELL, B. A. **A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015.

SCHAEFER, L. Proteoglycans, key regulators of cell-matrix dynamics. **Matrix Biology**, 2014.

SEKUŁA, M.; ZUBA-SURMA, E. K. Biomaterials and Stem Cells: Promising Tools in Tissue Engineering and Biomedical Applications. In: **Biomaterials in Regenerative Medicine**. [s.l: s.n.].

SHAFIEE, A.; ATALA, A. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. **Annual Review of Medicine**, 2016.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen Structure and Stability. **Annual Review of Biochemistry**, 2009.

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

SINGH, V. K. et al. **Induced pluripotent stem cells: Applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2015.

SONG, J. et al. Extracellular matrix of secondary lymphoid organs impacts on B-cell fate and survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 31, p. E2915-24, 2013.

SPROUL, E.; NANDI, S.; BROWN, A. Fibrin biomaterials for tissue regeneration and repair. In: *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*. [s.l: s.n.].

STEINIGER, B. Spleen. In: **eLS**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006. p. 1–9.

STEINIGER, B. S. Human spleen microanatomy: Why mice do not suffice. **Immunology**, v. 145, n. 3, p. 334–346, 2015.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. [s.l: s.n.]. v. 8

SULLIVAN, D. C. et al. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. **Biomaterials**, v. 33, n. 31, p. 7756–7764, 2012.

- TABLIN, F.; CHAMBERLAIN, J. K.; WEISS, L. The Microanatomy of the Mammalian Spleen. In: **The Complete Spleen**. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. p. 11–21.
- TAN, J. K. H.; WATANABE, T. Murine Spleen Tissue Regeneration from Neonatal Spleen Capsule Requires Lymphotoxin Priming of Stromal Cells. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 3, p. 1194–1203, 2014.
- TAN, J. K. H.; WATANABE, T. Stromal Cell Subsets Directing Neonatal Spleen Regeneration. **Scientific Reports**, 2017.
- TANIGUCHI, L.; CORREIA, M.; ZAMPIERI, F. Overwhelming Post-Splenectomy Infection: Narrative Review of the Literature. **Surgical infections**, v. 15, n. 6, p. 686–693, 2014.
- THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016.
- THOMSEN, R.W, et al. Risk for hospital contact with infection in patients with splenectomy: A population-based cohort study. **Ann Intern Med** 2009;151:546555.
- VECINO, E; KWOK, J. C. The Extracellular Matrix in the Nervous System: The Good and the Bad Aspects. **Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body. 2016**. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/composition-and-function-of-the-extracellular-matrix-in-the-human-body>.
- VISHWAKARMA, S. K. et al. Biofabricated Humanized Insulin Producing Neo-Organs Generates Secondary Neo-Organoids Through Ectopic Transplantation. **Cellular and Molecular Bioengineering**, v. 12, n. 6, p. 569–582, 2019.
- WALKER, C.; MOJARES, E.; DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. **Role of extracellular matrix in development and cancer progression** **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.
- WELEDJI, E. P. **Benefits and risks of splenectomy** **International Journal of Surgery**, 2014.
- WHITE, L. J. et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. **Acta Biomaterialia**, 2017.

XIANG, J. et al. Decellularized spleen matrix for reengineering functional hepatic-like tissue based on bone marrow mesenchymal stem cells. **Organogenesis**, 2016.

XIANG, J. X. et al. Liver regeneration using decellularized splenic scaffold: A novel approach in tissue engineering. **Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International**, 2015.

YANG, H. et al. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. **Nature Protocols**, v. 10, n. 3, p. 382–396, 2015.

YORUKOGLU, A. C. et al. A Concise Review on the Use of Mesenchymal Stem Cells in Cell Sheet-Based Tissue Engineering with Special Emphasis on Bone Tissue Regeneration. **Stem Cells International**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

YUE, B. **Biology of the extracellular matrix: An overview** *Journal of Glaucoma*, 2014.

ZARRINTAJ, P. et al. Agarose-based biomaterials for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 2018.

ZHAO, P. et al. **Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review** *Frontiers of Mechanical Engineering*, 2018.

ZHENG, X. L. et al. Using a decellularized splenic matrix as a 3D scaffold for hepatocyte cultivation in vitro: A preliminary trial. **Biomedical Materials (Bristol)**, 2015.

ZVAROVA, B. et al. Residual Detergent Detection Method for Nondestructive Cytocompatibility Evaluation of Decellularized Whole Lung Scaffolds. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 22, n. 5, p. 418–428, 2016.

## 10. ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



**CERTIFICATE**

We certify that the Protocol **42/2016** related to research project entitled "**Decellularization and recellularization of rodent organs for Development of Functional Bioartificial Organs**", under responsibility of **Breno Valentim Nogueira**, is in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by this Ethics Committee on Animal Use (CEUA-UFES), being approved at the regular assembly in October 07, 2016.

  
**Prof. Roger Lyrio dos Santos**  
 Presidente do Comitê de Ética no Uso de Animais  
 CEUA/OCS/UFES

Vitória (ES), October 07, 2016.

## 11. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Encontram-se a seguir os trabalhos científicos publicados em revistas indexadas, frutos de colaborações realizadas durante o período de desenvolvimento desta tese (2016-2020), participação em pedido de patente e participação em eventos.

**Artigo 1:** DIAS, A. T.; LEAL, M. A. S.; ZANARDO, T. C.; et al. Beneficial Morphofunctional Changes Promoted by Sildenafil in Resistance Vessels in the Angiotensin II-Induced Hypertension Model. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2018.

**Artigo 2:** MORRA, E. A.; RODRIGUES, P. L.; JESUS, I. C. G. DE; et al. Endurance training restores spatially distinct cardiac mitochondrial function and myocardial contractility in ovariectomized rats. **Free Radical Biology and Medicine**, 2019.

**Artigo 3:** PEREIRA, R. H. A.; PRADO, A. R.; CARO, L. F. C. DEL; et al. A non-linear mathematical model using optical sensor to predict heart decellularization efficacy. **Scientific Reports**, 2019.

**Pedido de Patente:** Sensor óptico aplicado a descclularização de órgãos. (2017). INPI – BR 10 2017 009187 2

**Participação em evento:** CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ DESCCLULARIZADA DERIVADA DO BAÇO PARA USO NA BIOENGENHARIA TECIDUAL - Zanardo TEC, Taufner GH, Pereira RHA, Iwai LK, Amorim FG, NOGUEIRA BV. **XIII Reunião Regional da FeSBE**, 2019.

**Participação em evento:** Detecção Óptica do Processo de Descclularização como Método de Avaliação Não Destrutivo - Pereira RHA, Prado AR, Caro LFCD, Zanardo TEC, Alencar AP, NOGUEIRA BV. **XIII Reunião Regional da FeSBE**, 2019.