



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**

**RESOLUÇÃO Nº 42/2015**

O CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, no uso de suas atribuições legais e estatutárias,

CONSIDERANDO o que consta do Processo nº **12.788/2014-21 – DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA/CCS;**

CONSIDERANDO o que estabelecem os Artigos 5º e 10 do Estatuto desta Universidade;

CONSIDERANDO, ainda, a aprovação da Plenária, por unanimidade, na Sessão Ordinária do dia 11 de agosto de 2015,

**R E S O L V E:**

**Art. 1.º** Regulamentar as atividades do Núcleo de Bioengenharia Tecidual, vinculado ao Centro de Ciências da Saúde desta Universidade.

**Art. 2.º** Revogam-se as disposições em contrário.

Sala das Sessões, 11 de agosto de 2015.

**REINALDO CENTODUCATTE**  
PRESIDENTE



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**

**ANEXO DA RESOLUÇÃO Nº 42/2015 – CEPE**

**NÚCLEO DE BIOENGENHARIA TECIDUAL**



## UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

### Apresentação

O presente projeto trata da criação do Núcleo de Bioengenharia Tecidual, cuja vinculação se dará com o Centro de Ciências da Saúde da UFES. Inicialmente o referido Núcleo funcionará nas dependências do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) do Departamento de Morfologia, Prédio Básico I, até que possa captar recursos para construção de sede própria. A partir da sua criação será gerado um regimento próprio a fim de regulamentar suas atividades internas.

O objetivo principal do Núcleo de Bioengenharia Tecidual é o desenvolvimento de órgãos *in vitro* para transplantação em seres humanos. Dessa forma, objetivamos acabar com a fila de espera para transplantes. Inicialmente, os estudos serão feitos em modelos experimentais murinos e posteriormente, em órgãos de animais de grande porte, como porcos, para posterior estudo com órgãos humanos, mediante aprovação do CEP/CONEP.

O Núcleo de Bioengenharia estará sob a coordenação do docente Breno Valentim Nogueira e a vice-coordenação do docente Marco Cesar Cunegundes Guimarães. O Núcleo contará com a presença de alunos de pós-graduação (mestrandos e doutorandos), iniciação científica e pesquisadores colaboradores.

A experiência científica do nosso grupo de pesquisa está associada a terapia celular (células-tronco)/fatores de crescimento celular, como demonstrado pelas recentes publicações na referida área:

1. CAMPAGNARO, BIANCA P.; TONINI, CLARISSA L.; **NOGUEIRA, B. V.**; Casarini, Dulce E.; VASQUEZ E.C.; Vasquez, Elisardo C.; Meyrelles, Silvana S. DNA Damage and Augmented Oxidative Stress in Bone Marrow Mononuclear Cells from Angiotensin-Dependent Hypertensive Mice. *International Journal of Hypertension*, v. 2013, p. 1-10, 2013.

2. CAMPAGNARO, BIANCA P.; TONINI, CLARISSA L.; DOCHE, LUCIANO M.; **NOGUEIRA, B. V.**; VASQUEZ E.C.; VASQUEZ, ELISARDO C.; Meyrelles, Silvana S. Renovascular Hypertension Leads to DNA Damage and Apoptosis in Bone Marrow Cells. *DNA and Cell Biology* **JCR**, v. 32, p. 130620073411002, 2013.

3. **Nogueira, Breno V.**; Palomino, Zaira; Porto, Marcella L.; Balarini, Camille M.; Pereira, Thiago M.C.; Baldo, Marcelo P.; Casarini, Dulce E.; Meyrelles, Silvana Santos; Vasquez, Elisardo C. Granulocyte Colony Stimulating Factor Prevents Kidney Infarction and Attenuates Renovascular Hypertension. *Cellular Physiology and Biochemistry* **JCR**, v. 29, p. 143-152, 2012.

4. Lima, Leandro C.F. ; [Porto, Marcella L.](#); Campagnaro, Bianca P.; Tonini, Clarissa L ; **Nogueira, Breno V.**; Pereira, Thiago M.C. ; Vasquez, Elisardo C.; Meyrelles, Silvana S. Mononuclear cell therapy reverts cuff-induced thrombosis



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**

in apolipoprotein E-deficient mice. *Lipids in health and disease* **JCR**, v. 11, p. 96, 2012.

5. [Porto, Marcella L.](#); [Lima, Leandro C.F.](#); Pereira, Thiago M.C.; **NOGUEIRA, B.V.**; Meyrelles, Silvana S.; Vasquez, Elisardo C.; VASQUEZ E.C. Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. *Lipids in health and disease* **JCR**, v. 10, p. 155, 2011.

6. Pereira, Thiago M.C.; **Nogueira, Breno V.**; [Lima, Leandro CF](#) ; [Porto, Marcella L.](#); Arruda, Jose A.; Vasquez, Elisardo C.; Meyrelles, Silvana S. Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender. *Lipids in health and disease* **JCR**, v. 9, p. 87, 2010.

A seguir, será descrito o projeto experimental inicial com estudos em modelos murinos, para o desenvolvimento de corações e rins *in vitro*.

## **INTRODUÇÃO**

A incidência de Insuficiência Cardíaca (ICA) e de Doença Renal Crônica (DRC) tem crescido significativamente ao longo dos anos e continuará a elevar-se progressivamente por causa do aumento da expectativa de vida da população. A ICA e a DRC frequentemente coexistem, o que pode estar relacionado a fatores de risco comuns, como, por exemplo, hipertensão, diabetes e aterosclerose, mas também aos mecanismos patogênicos comuns, tais como a ativação do sistema nervoso simpático, o sistema renina-angiotensina, a inflamação e o estresse oxidativo. A evidência também sugere que a disfunção cardíaca pode causar a disfunção renal, e vice-versa (METRA et al., 2012).

A ICA, é a maior causa de morte no mundo. Somente nos Estados Unidos, mais de 5 milhões de pessoas sofrem de ICA, geralmente fatal, principalmente por causa da escassez de órgãos para doação. Muitos pacientes com ICA não respondem a terapias medicamentosas, havendo, portanto, a necessidade de transplantes, como única forma de tratamento (LU et al., 2013).

Similarmente, milhões de pessoas com DRC evoluem subsequentemente para a falência renal, necessitando de transplante para sobreviverem. Nos Estados Unidos existem cerca de 26 milhões de americanos nessas condições e o número de novos casos de falência renal ultrapassa 90.000 anualmente (CORESH et al., 2007). No Brasil o cenário não é diferente. De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), existem atualmente cerca de 92 mil pacientes em diálise no Brasil. Nos últimos 10 anos, esse número cresceu 115% e deve aumentar em uma proporção de 500 casos



## UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

por milhão de habitantes a cada ano. O gasto com o programa de diálise e transplante renal no Brasil situa-se ao redor de 1,4 bilhão de reais ao ano.

Uma das novas promessas para o tratamento de ICA e da DRC é a utilização de técnicas de engenharia tecidual para formação de estruturas orgânicas, que consistem basicamente na descelularização do coração/rim com a manutenção do arcabouço, preservando os constituintes da matriz extracelular (MEC), posteriormente repovoada utilizando-se células-tronco. Esse processo possibilita a criação de estruturas e órgãos, diminuindo o tempo de espera na fila de transplantes, além de possibilitar a utilização desse arcabouço recelularizado em testes pré-clínicos na pesquisa farmacêutica.

### JUSTIFICATIVA

Sabe-se atualmente que existem milhões de pessoas à espera de doadores de coração e rim. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 66.000 transplantes de rim e 6.000 transplantes de coração foram feitos no mundo em 2005, porém o acesso dos pacientes aos sistemas de transplantes varia de acordo com a situação de cada país e é determinado principalmente pela disponibilidade de órgãos.

Como alternativa para aumentar o número de órgãos disponíveis e conseqüentemente diminuir as filas de espera por transplantes, as técnicas de bioengenharia tecidual estão se desenvolvendo cada vez mais com o intuito de obter órgãos bioartificiais.

Estudos recentes têm demonstrado a obtenção de coração bioartificial funcional por meio da descelularização e recelularização de órgãos cadavéricos (OTT et al., 2008). Apesar dos estudos terem sido conduzidos em murinos e primariamente no coração, alega-se que o conceito dos experimentos pode ser aplicado ao coração humano e a outros órgãos. Outros estudos demonstram a eficiência dos processos de descelularização para coração e outros órgãos, com manutenção dos componentes da MEC e a rede vascular, e a utilização dessa técnica na engenharia e na medicina regenerativa (AKHYARI, *et al.*, 2011; HE e CALLANAN, 2013; HREBIKOVA, DIAZ e MOKRY, 2013).

Um dos problemas oriundos do transplante de órgãos é que, além da necessidade de compatibilidade sanguínea entre o doador e o receptor, há também o uso de medicamentos imunossupressores após a cirurgia, o que pode levar ao aparecimento de outros agravos à saúde do paciente. Nesse cenário, um benefício da descelularização é a redução do uso de medicamentos e/ou moléculas imunologicamente ativas, o que permite, conseqüentemente, a minimização das taxas de rejeição de transplante (HREBIKOVA, DIAZ e MOKRY, 2013). Adicionalmente, a recelularização do órgão com as células-tronco do próprio paciente também reduz a resposta imunológica; portanto, há queda do uso de imunossupressores, o que reduz os gastos com esse tipo de droga.

Assim, preferivelmente ao processo de geração de novo órgão (JORAKU et al., 2009; LITTLE, 2006; YOKOO, MATSUMOTO e YOKOTE,



## UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

2011), estudos têm demonstrado com sucesso a repovoação de arcabouços acelulares com células de vários outros tecidos (ATALA, 2006; BHRANY et al., 2006; MATSUNUMA et al., 2006; OTT et al., 2008).

Assim, pela mimetização do procedimento de descclularização de um órgão retirado de um rato e subsequente recelularização (repovoação) da matriz extracelular com células do próprio animal, um órgão bioartificial funcional pode ser obtido. Então a engenharia de tecidos ajudaria a preencher essa lacuna pela regeneração do órgão danificado, usando arcabouços repovoados com células precursoras (BONANDRINI *et al.*, 2014).

### OBJETIVOS

#### Objetivo geral

O objetivo desse projeto é o desenvolvimento de um coração e de um rim bioartificial e funcional, com a manutenção dos componentes da matriz extracelular (MEC).

#### Objetivos específicos

- Cultura de células-tronco mesenquimais retiradas da medula óssea e do tecido adiposo de ratos;
- Padronização de técnicas de descclularização de coração e rim de ratos para formação do arcabouço, contendo componentes da matriz extracelular;
- Obtenção de um arcabouço descclularizado viável para repovoamento com células-tronco mesenquimais;
- Repovoamento do coração e do rim com células-tronco mesenquimais;
- Verificação da eficiência do processo de repovoamento celular.

### METODOLOGIA

#### *Animais*

Serão utilizados 30 ratos machos adultos Wistar. Esses animais serão mantidos no Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde, localizado no *campus* da UFES em Maruípe, até os primeiros 60 dias de vida, pesando cerca de 250 gramas. Os animais serão mantidos em gaiolas, em ambiente com regime de ciclo claro/escuro (12h/12h), com temperatura e umidade controladas, água e ração comercial para animais experimentais *ad libitum*.

Os animais serão utilizados de acordo com normas estabelecidas por entidades científicas nacionais e internacionais. Após os experimentos, os animais sacrificados serão colocados em sacola de plástico branco com a identificação de risco biológico. Os animais serão acondicionados em *freezer* a -20°C até a coleta da Prefeitura de Vitória.



## UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

### *Procedimento para Retirada dos Órgãos*

No 60.<sup>o</sup> dia após o nascimento, os animais serão previamente pesados, segregados em gaiolas individuais identificadas e posteriormente anestesiados com a administração intraperitoneal (i.p.) de sobredose de solução anestésica contendo ketamina e xilazina (9/1). Após a constatação visual da completa indução anestésica, proceder-se-á à laparotomia e à esternotomia para que sejam acessados os órgãos internos. Serão retirados os rins, o coração, o tecido adiposo, o baço, o fígado e os membros inferiores (ossos).

### *Descelularização*

Uma vez que os animais tenham sido selecionados, os órgãos obtidos serão descelularizados com detergentes. Essa etapa poderá ser acompanhada pela primeira perfusão da matriz com SDS, um detergente iônico comumente utilizado em descelularização, que atua como surfactante, lizando as células. A matriz será então perfundida com Triton X-100, um detergente não iônico. Esse processo tem conseguido remover mais de 96% de todos os resquícios de DNA (ROSS et al., 2012).

### *Fonte Celular*

O próximo passo nesse processo é a obtenção de células-tronco para a colonização da matriz. Células-tronco derivadas da medula óssea (BMSCs) e de tecido adiposo (ASCs) têm se diferenciado de células nativas de órgãos (IMAI e ITO, 2002; YAMADA *et al.*, 2014).

As BMSCs e as ASCs serão cultivadas em meio enriquecido com soro fetal bovino (10%) em DMEM com acréscimo de penicilina e estreptomicina. Atingida a confluência, essas células serão mantidas em subculturas até a utilização necessária.

### *Repovoamento*

As células-tronco provenientes da cultura celular serão perfundidas retrogradamente no arcabouço por meio dos vasos que constituem esses órgãos. No caso do coração, as células serão inoculadas através da artéria aorta no limite do arco aórtico no tronco braquicefálico. Analogamente, no caso dos rins, as células-tronco serão perfundidas de forma retrógrada através dos ductos coletores. Isso resultará em células tubulares que revestirão os ductos coletores e os túbulos renais. Podócitos serão perfundidos através do sistema de vasos sanguíneos do rim descelularizado, utilizando-se um meio de cultivo oxigenado. Pretende-se que essas células sejam localizadas na cápsula de Bowman por causa da composição peculiar da matriz. Em seguida, as células mesangiais serão adicionadas à solução de perfusão. Essas células iniciarão a confecção da linha de vasos sanguíneos presentes no rim. Posteriormente, as células endoteliais serão adicionadas à linha interna dos vasos sanguíneos.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**

*Caracterização e Validação do Coração e do Rim Recelularizados*

As BMSCs e APCs serão imunomarcadas e coradas com CD34, CD133, c-Kit e GATA-4 para comprovarmos realmente a sua origem, qual seja, células-tronco derivadas da medula óssea e do tecido adiposo. Após a diferenciação das BMSCs e das ASCs em cultura celular, as células serão isoladas mediante imunosseleção com anticorpos monoclonais (mABs) como, por exemplo, ST.12 (FEJES-TÓTH e NÁRAY-FEJES-TÓTH, 1992). As células que obtiverem tempo de ciclo celular lento serão distinguidas pela retenção de um marcador nucleotídico, a bromodeoxiuridina (BrdU), incorporada no DNA das células durante a síntese de DNA (OLIVER et al., 2004). Após a administração de BrdU as células serão monitoradas por determinado período; apenas as células com tempo de ciclo celular lento reterão quantidades de BrdU suficientemente altas para permitir sua marcação e consequente identificação.

## REFERÊNCIAS

- AKHYARI, P. et al. The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. *Tissue engineering. Part C, Methods*, v. 17, n. 9, p. 915–26, doi:10.1089/ten.TEC.2011.0210, 2011.
- ATALA, A. Recent applications of regenerative medicine to urologic structures and related tissues. *Current opinion in urology*, v. 16, p. 305–309, doi:10.1097/01.mou.0000232055.20084.f6, 2006.
- BHRANY, A. D. et al. Development of an esophagus acellular matrix tissue scaffold. *Tissue Eng*, v. 12, p. 319–330, doi:10.1089/ten.2006.12.319, 2006.
- 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. 1486–98, doi:10.1089/ten.TEA.2013.0269, 2014.
- CORESH, J. et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, v. 298, n. 17, p. 2038–47, doi:10.1001/jama.298.17.2038, 2007.
- FEJES-TÓTH, G. e NÁRAY-FEJES-TÓTH, A. Differentiation of renal beta-intercalated cells to alpha-intercalated and principal cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, n. 12, p. 5487–91, 1992.
- HE, M. e CALLANAN, A. Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, v. 19, n. 3, p. 194–208, doi:10.1089/ten.TEB.2012.0340, 2013.
- HREBIKOVA, H.; DIAZ, D.; MOKRY, J. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix. *Biomedical papers of the*



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**

*Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia, doi:10.5507/bp.2013.076, 2013.*

IMAI, E. e ITO, T. *Can bone marrow differentiate into renal cells? Pediatric Nephrology.* [S.l: s.n.], 2002.

JORAKU, A. et al. In vitro generation of three-dimensional renal structures. *Methods*, v. 47, p. 129–133, doi:10.1016/j.ymeth.2008.09.005, 2009.

LITTLE, M. H. Regrow or repair: potential regenerative therapies for the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, v. 17, p. 2390–2401, doi:10.1681/ASN.2006030218, 2006.

LU, T.-Y. et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nature communications*, v. 4, p. 2307, doi:10.1038/ncomms3307, 2013.

MATSUNUMA, H. et al. Constructing a tissue-engineered ureter using a decellularized matrix with cultured uroepithelial cells and bone marrow-derived mononuclear cells. *Tissue engineering*, v. 12, p. 509–518, doi:10.1089/ten.2006.12.ft-44, 2006.

METRA, M. et al. The role of the kidney in heart failure. *European heart journal*, v. 33, n. 17, p. 2135–42, doi:10.1093/eurheartj/ehs205, 2012.

OLIVER, J. A. et al. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *The Journal of clinical investigation*, v. 114, n. 6, p. 795–804, doi:10.1172/JCI20921, 2004.

OTT, H. C. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine*, v. 14, n. 2, p. 213–21, doi:10.1038/nm1684, 2008.

ROSS, E. A. et al. Mouse stem cells seeded into decellularized rat kidney scaffolds endothelialize and remodel basement membranes. *Organogenesis*, v. 8, n. 2, p. 49–55, doi:10.4161/org.20209, 2012.

YAMADA, A. et al. Comparison of multipotency and molecular profile of MSCs between CKD and healthy rats. *Human cell*, v. 27, n. 2, p. 59–67, doi:10.1007/s13577-013-0082-7, 2014.

YOKOO, T.; MATSUMOTO, K.; YOKOTE, S. Potential use of stem cells for kidney regeneration. *International journal of nephrology*, v. 2011, p. 591731, doi:10.4061/2011/591731, 2011.

WHO | The state of the international organ trade: a provisional picture based on integration of available information. WHO, 2011-03-04 20:46:00 2011.

Disponível em: < <http://www.who.int/bulletin/volumes/85/12/06-039370/en/> >.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**