



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Aplicação de Ferramentas de Engenharia de Tecidos na Biofabricação de Intestino Delgado: Desafios da Medicina Regenerativa

Rafael Factor Carandina

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), para a obtenção de título de Doutor em Biotecnologia.

**BOTUCATU – SP
2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Aplicação de Ferramentas de Engenharia de Tecidos na
Biofabricação de Intestino Delgado: Desafios da Medicina
Regenerativa**

Rafael Factor Carandina

Orientador: Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), para a obtenção de título de Doutor em Biotecnologia.

**BOTUCATU – SP
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Carandina, Rafael Factor.

Aplicação de ferramentas de engenharia de tecidos na biofabricação de intestino delgado : desafios da medicina regenerativa / Rafael Factor Carandina. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Willian Fernando Zambussi
Capes: 90194000

1. Medicina regenerativa. 2. Engenharia tecidual. 3. Intestino delgado. 4. Transplante.

Palavras-chave: Medicina regenerativa; engenharia de tecidos; intestino delgado; scaffold; transplante.

Dedicatória

Dedico este trabalho, assim como todas as minhas conquistas, àqueles que são a razão da minha vida: **Noelei Aparecido Angelucci Carandina e Maria Luiza Factor Carandina.**

Agradecimentos

Não sei definir o que é Deus, mas de alguma forma me sinto grato a Ele.

Agradeço aos meus pais, Maria Luiza Factor Carandina e Noelei Aparecido Angelucci Carandina, pelo apoio em minhas escolhas e pela enorme paciência comigo. Espero ainda conseguir retribuir tudo o que fazem por mim.

Aos meus cachorros, Clarinha, Francisco, Julie e Olívia pela felicidade que me trazem, pelo amor incondicional, por serem parte da família e pela alegria que me recebem quando volto para casa.

À Babi, que apesar de não estar mais presente, estará para sempre em meu coração.

À CAPES, pelo financiamento de bolsa durante o doutoramento e pela bolsa de estudos PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior).

À *Wake Forest Institute for Regenerative Medicine* (WFIRM), por me receberem de braços abertos durante toda a estadia nos Estados Unidos e fazerem da Carolina do Norte a minha segunda casa.

Ao professor Khalil Bitar, por ser tão amigável, solícito e por toda ajuda na minha jornada nas pesquisas na WFIRM.

Ao professor Anthony Atala, por me receber tão bem na WFIRM, mesmo com toda sua agenda extremamente cheia.

Ao professor Willian Fernando Zambuzzi, por toda ajuda e apoio neste projeto, e pela sua amizade.

Aos professores Dr. João Pessoa Araújo Júnior e Dr. Robson Francisco Carvalho; e à Camila Malossi Dantas, por serem tão solícitos e por toda ajuda que me deram nos experimentos referentes à Biologia Molecular presentes neste estudo.

À Claudete e ao Thiago, técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/UNESP), pelo preparo das amostras e por me ensinarem a usar o Microscópio Eletrônico de Transmissão.

À professora Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, pelo apoio dado às Lâminas de histologia.

A bibliotecária Rosangela Aparecida Lobo pela elaboração da ficha catalográfica desta tese.

A todas as pessoas difíceis com quem tive que conviver durante todos os anos da pós-graduação, pois me fizeram perceber o tipo de pessoa que não quero me tornar.

Grato também a todos que me fizeram compreender que é preciso desenvolver em nós mesmos as qualidades de pessoas as quais admiramos.

Por fim, sou grato por ter percebido que títulos e dinheiro não me realizam em minha plenitude, e que a maior conquista que posso ter na vida é estar em paz.

*“Você tem de saber responder a esta pergunta:
Se você morresse agora, como se sentiria a respeito da sua vida?”*

“O maior desafio da vida é descobrir quem você é. O segundo maior desafio é você ser feliz com o que descobriu.”

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código
de Financiamento 001.*

Nota Explicativa

A forma de apresentação desta Tese segue uma sugestão da coordenação do programa de pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB-UNESP), com o objetivo de facilitar a publicação em revistas científicas. Assim, fica dividida em dois artigos:

1. **Artigo 1:** Dos transplantes intestinais convencionais à Engenharia de Tecidos: estado da arte.
2. **Artigo 2:** Avaliação e caracterização de *scaffolds* de matriz extracelular para aplicações na Engenharia de Tecidos do trato gastrointestinal

O **Artigo 3**, referente à pesquisa feita na *Wake Forest Institute for Regenerative Medicine (WFIRM)*, não pode ser parte desta tese por normas contratuais de confidencialidade com a própria universidade nos Estados Unidos. O contrato é regido pela interpretação de acordo com as leis da Carolina do Norte, e qualquer reivindicação ou disputa decorrente dos termos ou desempenho do contrato será submetida à jurisdição dos tribunais estaduais ou federais da Carolina do Norte (**Anexo 4**).

Portanto, o artigo referente à pesquisa lá realizada será publicado diretamente em uma revista científica, com agradecimentos à CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos do PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior).

Lista de figuras

Figura 1 30

Figura 2 31

Figura 3 33

Figura 4 34

Figura 5 36

Figura 6..... 37

Lista de tabelas

Tabela 1..... 32

Tabela 2..... 32

Tabela 3..... 35

Tabela 4..... 36

Sumário

Artigo 1 - Dos transplantes intestinais convencionais à Engenharia de Tecidos: estado da arte

Resumo	12
Abstract	13
1 Introdução	14
1.1 Complicações.....	16
1.2 Nutrição.....	16
1.3 Qualidade de vida	16
1.4 Custos.....	16
1.5 Engenharia de Tecidos	17
2 Referências	18

Artigo 2 - Avaliação e caracterização de *scaffolds* de matriz extracelular para aplicações na Engenharia de Tecidos do trato gastrointestinal

Resumo	22
Abstract	24
1 Introdução	25
2 Material e Métodos.....	26
2.1 Animais e coleta das amostras	26
2.2 Tratamentos para descelularização e análise histológica.....	26
2.3 Análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	26
2.4 Extração e quantificação de DNA e RNA residuais	27
2.5 Análise de integridade de DNA e RNA residuais	27
2.6 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)	27
2.7 Caracterização biomecânica	28
2.8 Avaliação de toxicidade residual	28
2.9 Avaliação de biocompatibilidade	29
3 Resultados	29
3.1 Tratamentos para descelularização e análise histológica.....	29
3.2 Análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	31

3.3 Extração e quantificação de DNA e RNA residuais	32
3.4 Análise de integridade de DNA e RNA residuais	33
3.5 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)	34
3.6 Caracterização biomecânica	35
3.7 Avaliação de toxicidade residual	35
3.8 Avaliação de biocompatibilidade	36
4 Discussão	38
5 Conclusão	39
6 Referências	40

Anexos

Anexo 1	42
Anexo 2	46
Anexo 3	49
Anexo 4	50

Artigo 1

Dos transplantes intestinais convencionais à Engenharia de Tecidos: estado da arte

RESUMO

O intestino delgado é responsável pela realização de múltiplas funções, incluindo motilidade, digestão e absorção de alimentos e nutrientes. Nos distúrbios gastrointestinais, algumas dessas funções são prejudicadas ou perdidas. A ressecção do segmento doente é uma abordagem comum, no entanto, pacientes sofrem de complicações e de baixa qualidade de vida. Substituições funcionais são, portanto, necessárias para restaurar, reparar ou substituir partes danificadas do intestino. A Engenharia de Tecidos e a Medicina Regenerativa fornecem uma abordagem alternativa para reconstruir diferentes segmentos do trato gastrointestinal. Os desafios são grandes e a área é extremamente promissora.

Palavras-Chave: Engenharia de Tecidos; Síndrome do Intestino Curto; Transplante de Intestino

From conventional intestinal transplants to Tissue Engineering: state of the art

ABSTRACT

The small intestine is responsible for performing multiple functions including motility, digestion and absorption of food and nutrients. In gastrointestinal disorders, some of these functions are impaired or lost. Resection of the diseased segment is a common approach; however, patients suffer from complications and poor quality of life. Functional replacements are therefore necessary to restore, repair or replace damaged parts of the gut. Tissue Engineering and Regenerative Medicine provide an alternative approach to reconstruct different segments of the gastrointestinal tract. There are many challenges and the research field is extremely promising.

Keywords: Tissue Engineering; Short Bowel Syndrome; Intestinal Transplants

Introdução

O intestino delgado constitui um tubo anatômico que se inicia na junção gastroduodenal (píloro) e termina na junção ileocecólica, onde desemboca o intestino grosso. Sua função inclui completar a digestão, a absorção e a secreção. De acordo com os anatomistas Dangelo & Fattini¹, três partes o compõem: o duodeno, mais curto e quase todo retroperitoneal, portanto imóvel, na sua maior parte; o jejuno e o íleo. Estas duas últimas partes são longas, convolutas e peritonizadas, estando presas à parede posterior do abdome pelo mesentério.

O trato gastrointestinal é suscetível a múltiplos distúrbios, sejam congênitos², tais como gastroquises, enterocolite necrosante e onfacoles; ou adquiridos tardiamente, devido a ressecções amplas do intestino delgado e/ou parte do intestino grosso por causa de enfermidades como a Doença de Chrön, eventos vasculares tromboembólicos e desordens de motilidade³. Como consequências, estas insuficiências intestinais podem causar a Síndrome do Intestino Curto (SIC), condição em que os pacientes são incapazes de manter a nutrição adequada e a hidratação através da ingestão oral normal⁴, necessitando, portanto, de Nutrição Parenteral. A incidência de insuficiência intestinal irreversível causada pela SIC tem sido estimada em 2-5 casos/milhão de habitantes⁵

A introdução da Nutrição Parenteral para os pacientes com SIC surgiu na década de 1970, permitindo maiores cuidados e a sobrevida destes pacientes⁶, mas muitos ainda não resistem as complicações da terapia devido a infecções por cateteres implantados, trombozes venosas, Síndrome da Realimentação e a doenças hepáticas⁷.

Paralelamente, várias técnicas cirúrgicas foram descritas para aumentar a capacidade absorptiva ou alongamento do intestino residual^{8,9,10} ou proporcionar a diminuição do tempo de trânsito intestinal^{11,12}. No entanto, existem limitações para seu emprego efetivo, com taxas variáveis de sucesso. Após o desenvolvimento de inúmeras pesquisas experimentais direcionadas para o tratamento da SIC, o transplante de intestino delgado surgiu como uma alternativa atraente.

A história dos transplantes intestinais começou em 1901, quando Alexis Carrel descreveu a viabilidade técnica da cirurgia¹³. Anos mais tarde, em 1959, Lillehei et al¹⁴ descreveram a técnica do transplante intestinal em cães. Já em 1971, Monchik & Russell¹⁵ desenvolveram o modelo experimental do transplante intestinal heterotópico em ratos e, posteriormente, em 1974, este modelo foi desenvolvido em porcos por Hay et al¹⁶. Apenas em 1984, o modelo ortotópico de transplante intestinal foi realizado, descrito por Deltz & Thiede¹⁷, os quais usaram ratos como modelo experimental.

A rejeição do enxerto intestinal ocorria precocemente após o transplante, bem como a reação do enxerto transplantado contra o receptor, ocasionado pela migração dos linfócitos oriundos do enxerto para o receptor após a revascularização. Este fenômeno foi demonstrado em ratos por Price et al¹⁸ em 1993.

As primeiras tentativas de transplantes intestinais em humanos foram realizadas nas décadas de 1960 e 1970 com a utilização de drogas imunossupressoras como as globulinas antilinfocitárias, azatioprina e corticoides^{19,20,21}. Entretanto, os resultados catastróficos decorrentes de complicações técnicas, sepses ou rejeição do enxerto transplantado fizeram diminuir o entusiasmo por esta modalidade de transplante.

A introdução da ciclosporina como droga imunossupressora no final da década de 1970 despertou novamente o interesse nas pesquisas nesta modalidade de transplante²². Estudos experimentais demonstraram a eficácia desta droga na prevenção da rejeição²³, posteriormente utilizada em transplantes intestinais em humanos^{24,25}. Em 1990, novos progressos ocorreram quando Grant et al²⁶ relataram a sobrevida de um paciente submetido ao transplante combinado de fígado e intestino delgado, tendo utilizado a ciclosporina como base da imunossupressão.

Apesar do controle inicial da rejeição com ciclosporina, a proposição do transplante intestinal como padrão ouro no tratamento da SIC não foi largamente aceita, tendo em vista a alta mortalidade decorrente da rejeição. Paralelamente à evolução das pesquisas sobre novas drogas imunossupressoras, a década de 90 foi marcada por inúmeros estudos direcionados para a indução de tolerância ao enxerto por meio da imunomodulação da resposta imune do receptor. A melhor forma para se atingir sobrevidas prolongadas dos enxertos transplantados seria a indução de tolerância específica aos tecidos do doador, circundando a necessidade de imunossupressão inespecífica em longo prazo e preservando a imunidade do receptor.

Entre as numerosas pesquisas para indução de tolerância aos enxertos, um método que na ocasião foi aceito envolveu a infusão de células derivadas do receptor, especialmente as da medula óssea, associada a vários protocolos de manipulação imunológica²⁷. Neste período, várias publicações apresentaram os resultados preliminares com este método, com melhora significativa na sobrevida de enxertos de fígado²⁷ e rins²⁸.

A indução da tolerância aos enxertos transplantados e a profilaxia da rejeição aguda ainda é dependente do uso de drogas imunossupressoras inespecíficas, com seus efeitos deletérios sobre a qualidade de vida dos pacientes. Com as drogas imunossupressoras atualmente disponíveis e dos novos protocolos de indução, as sobrevidas observadas após as várias modalidades de transplantes intestinais são atualmente comparáveis, até o primeiro ano,

aos de outros órgãos como fígado, rim e pâncreas²⁹. Houve um aumento na sobrevida dos enxertos e dos receptores para 80% a 90% no primeiro ano após o transplante, com diminuição significativa dos episódios de rejeição celular aguda grave nos primeiros meses de pós-operatório, como consequência dos protocolos de indução atualmente utilizados²⁹.

1.1 Complicações

A rejeição do enxerto transplantado ainda é a complicação primária mais frequente³⁰, além das complicações infecciosas decorrentes da imunossupressão. Apesar dos avanços dos agentes farmacológicos, incluindo antibióticos, antivirais, antifúngicos, a sepse se mantém como a causa de óbito no pós-operatório, desencadeando períodos de internações prolongadas e de custo elevado às instituições financiadoras³¹.

1.2 Nutrição

Apesar do transplante intestinal/multivisceral proporcionar autonomia nutricional aos pacientes, várias etapas de reabilitação intestinal são necessárias após o transplante para atingir este objetivo, havendo a necessidade na manutenção dos transplantados em regimes de nutrição parenteral após o procedimento por períodos variados, até sua transição a alimentação enteral³².

A alimentação parenteral por períodos prolongados após o transplante pode ser necessária naqueles pacientes que apresentam complicações, principalmente nos pacientes pediátricos⁷.

1.3 Qualidade de Vida

Os índices que avaliam a qualidade de vida após o transplante intestinal melhoram em todas as subáreas, incluindo ansiedade, depressão, aspecto físico, estresse e relacionamento familiar naqueles pacientes com enxertos funcionais quando comparados com os pacientes mantidos em nutrição parenteral³³.

1.4 Custos

O custo na nutrição parenteral varia de \$75.000,00 a \$150.000,00 por ano nos EUA³⁴, excluindo-se os custos dos profissionais envolvidos, suporte, equipamentos e materiais de suporte, podendo aumentar na vigência das complicações da nutrição parenteral (internações, infecções por cateter).

O custo do transplante varia de \$200.000,00 a \$400.000,00, podendo atingir valores como \$1.000.000,00 nas complicações³⁴. Tendo em vista as internações frequentes durante o primeiro ano após o transplante, o procedimento não é custo-efetivo quando comparado à nutrição parenteral. Entretanto, após o segundo ou terceiro ano após o transplante, os valores da Nutrição Parenteral se tornam equiparáveis ao do transplante intestinal.

1.5 Engenharia de Tecidos

A Engenharia de Tecidos tem sido descrita, desde 1987, como:

(...) “a aplicação dos princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para a compreensão fundamental das relações de estrutura e função no tecido normal e patológico e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função”³⁵ (...)

Além das inúmeras modalidades terapêuticas para o tratamento da Síndrome do Intestino Curto, a Engenharia de Tecidos aplicada ao trato gastrointestinal vem sendo estudada com intuito de, um dia, beneficiar os pacientes com SIC, proporcionando uma substituição e/ou aumento do intestino com morfologia e função semelhante ao órgão nativo.

A produção de um material biocompatível para a fabricação de um arcabouço tubular e que sirva como um suporte mecânico para o cultivo das células é o primeiro desafio para a produção de um intestino em laboratório e sua substituição viável no paciente receptor. Para tanto, tem sido usado materiais sintéticos, tais como o ácido poliglicólico³⁶; naturais, como o colágeno³⁷ e a quitosana³⁸; e matrizes extracelulares, obtidas por meio de técnicas de descelularização³⁹.

O segundo desafio é a formação da mucosa intestinal. O cultivo de unidades organoides intestinais tem sido amplamente difundido^{40,41}, com resultados bem-sucedidos na formação do epitélio intestinal⁴². Por outro lado, o isolamento e a expansão destes grupos celulares ainda requerem estudos para melhoramento dos protocolos e pesquisas adicionais devem ser feitas para a verificação das funções absorptivas. Ademais, é importante ressaltar que a ausência do epitélio no tecido bioengenheirado leva o órgão à estenose⁴³.

Ainda assim, o intestino não é fisiologicamente funcional sem uma das suas principais unidades funcionais: a musculatura lisa. O requisito principal (quarto desafio) para a regeneração bem-sucedida da camada muscular do intestino é a o alinhamento exato do músculo liso nativo, o qual é dividido em duas camadas: a circular interna e a longitudinal

externa. A contração da camada muscular longitudinal externa leva ao encurtamento do intestino e a contração da camada muscular circular interna leva ao estreitamento do lúmen⁴⁴. Outrossim, a manutenção do fenótipo contrátil destas células *in vitro* é mais um dos obstáculos a ser vencido.

Não obstante, proporcionar a inervação adequada é essencial para a execução da função muscular, constituindo, assim, o sexto desafio: a integração neuromuscular. Apesar dos estudos neste campo ainda serem extremamente recentes, um deles, por exemplo, mostra o uso da terapia celular usando injeção de células progenitoras neurais e células intersticiais de Cajal para restabelecer a função de disfunções neuromusculares do piloro⁴⁵.

O intestino, bem como todo o trato gastrointestinal, apesar de ser um órgão tubular e oco, é extremamente complexo e, portanto, é importante ter em mente todos os diferentes tipos celulares que o compõem, além do alinhamento celular específico em cada camada tecidual. O desafio final é manter todos os fenótipos celulares para substituir ou regenerar a função adequada do órgão como um todo, incluindo o peristaltismo, a absorção e a secreção.

Embora o *crosstalk* entre os diversos tipos celulares do intestino não seja ainda muito bem compreendido, dois estudos^{46,47} mostram que a secreção de BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*) pelas células da musculatura lisa induz a diferenciação neural das células do Sistema Nervoso Entérico. Estas pesquisas abrem mais um caminho para o desenvolvimento de segmentos de intestino em laboratório, além de terem um alto potencial para o uso de fatores solúveis na terapia celular de doenças neuroentéricas.

Os desafios da Engenharia de Tecidos do trato gastrointestinal ainda são grandes, mas a área é extremamente promissora. Há necessidade de uma melhor compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvidos com o desenvolvimento de tecido bioengenheirado *in vitro*, a fim de recapitular processos originais e funcionais do tecido.

2 Referências

1. Dangelo, José Geraldo; Fattini, C. A. *Anatomia humana Sistêmica e Segmentar*. (Atheneu, 2007).
2. Morris, G., Kennedy, A. & Cochran, W. Small Bowel Congenital Anomalies: a Review and Update. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **18**, (2016).
3. Troppmann, Christoph; Gruessner, R. Intestinal transplantation. in *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*. (ed. Holzheimer, RG; Mannick, J.) (2001).
4. O'Keefe, S. J. D. *et al.* Short bowel syndrome and intestinal failure: Consensus definitions and overview. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 6–10 (2006).

5. Bakonyi Neto, A. *et al.* Demographic of short gut syndrome: Increasing demand is not followed by referral of potential candidates for small bowel transplantation. *Transplant. Proc.* **36**, 259–260 (2004).
6. Langnas, A. N. Advances in Small-Intestine Transplantation. *Transplantation* **77**, S75–S78 (2004).
7. Hartl, W. H., Jauch, K. W., Parhofer, K. & Rittler, P. Complications and monitoring - Guidelines on Parenteral Nutrition, Chapter 11. *Ger. Med. Sci.* **7**, 1–12 (2009).
8. Saday, C. & Mir, E. A surgical model to increase the intestinal absorptive surface: Intestinal lengthening and growing neomucosa in the same approach. *J. Surg. Res.* **62**, 184–191 (1996).
9. A., B. Longitudinal intestinal lengthening and tailoring: Results in 20 children. *J. R. Soc. Med.* **90**, 429–432 (1997).
10. Bianchi, A. Intestinal loop lengthening-A technique for increasing small intestinal length. *J. Pediatr. Surg.* **15**, 145–151 (1980).
11. Blanco-Benavides, R. & Niño, J. Construction of a new intestinal valve. *Dis. Colon Rectum* **37**, 606–609 (1994).
12. Zurita, M., Raurich, J. M., Ramirez, A., Gil, J. & Darder, J. A new neovalve type in short bowel syndrome surgery. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **96**, 110–118 (2004).
13. Carrel, A. The transplantation of organs: A preliminary communication. *J. Am. Med. Assoc.* **XLV**, 1645–1646 (1905).
14. Lillehei, R. C., Goott, B. & Miller, F. a. The physiological response of the small bowel of the dog to ischemia including prolonged in vitro preservation of the bowel with successful replacement and survival. *Ann. Surg.* **150**, 543–560 (1959).
15. Monchik, G. J. & Russell, P. S. Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery* **70**, 693–702 (1971).
16. Hay, JM; Fragniez, P. Resultats de l'allotransplantation orthotopique de l'intestin grele chez le porc. *Ann. Chir.* **28**, 1063–1067 (1974).
17. Deltz, E;Thiede, A. *Experimental transplantation of small-intestine: Microsurgical techniques and their applicability in research.* Olszewski WL (ed) *Handbook of Microsurgery* **2**, (1984).
18. Price, B. A. *et al.* The effect of rejection and graft-versus-host disease on small intestinal microflora and bacterial translocation after rat small bowel transplantation. *Transplantation* **56**, 1072–1076 (1993).
19. Alican, F. *et al.* Intestinal transplantation: laboratory experience and report of a clinical case. *Am J Surg* **121**, 150–9 (1971).
20. Lillehei, R. C. *et al.* Transplantation of stomach, intestine, and pancreas: experimental and clinical observations. *Surgery* **62**, 721–741 (1967).
21. Okumura, M. *et al.* [Transplantation of the small intestine. Case report]. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao. Paulo.* **24**, 39–54 (1969).
22. Borel, J. F., Feurer, C., Magnée, C. & Stähelin, H. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* **32**, 1017–1025 (1977).
23. Deltz, E. [Immune reactions after allogeneic small bowel transplantation. Graft rejection and graft versus host reaction in the rat model]. *Fortschr. Med.* **102**, 760–762 (1984).
24. Cohen, Z. *et al.* Small intestinal transplantation using cyclosporine. Report of a case. *Transplantation* **42**, 613–621 (1986).
25. Goulet, O. J. *et al.* Small intestinal transplantation in a child using cyclosporine. *Transplant. Proc.* **20**, 288–296 (1988).
26. Grant, D. *et al.* Successful small-bowel/liver transplantation. *Lancet (London, England)* **335**, 181–184 (1990).

27. Ricordi, C. *et al.* High-dose donor bone marrow infusions to enhance allograft survival: the effect of timing. *Transplantation* **63**, 7–11 (1997).
28. Rao, A. S. *et al.* Perioperative Donor Bone Marrow Infusion in Recipients of Organ Allografts. *Transplant. Proc.* **29**, 2192–2193 (1997).
29. International Small Bowel Transplant Registry - XI Small Bowel Transplant Symposium. in (2009).
30. Tzakis, A. G. *et al.* Clinical intestinal transplantation: focus on complications. *Transplant. Proc.* **24**, 1238–1240 (1992).
31. Wu, G. *et al.* Graft-versus-host disease after intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation* **91**, 219–224 (2011).
32. Mercer, D. F., Iverson, A. K. & Culwell, K. A. Nutrition and small bowel transplantation. *Nutr. Clin. Pract.* **29**, 615–620 (2014).
33. DiMartini, A. *et al.* Quality of life after small intestinal transplantation and among home parenteral nutrition patients. *JPEN. J. Parenter. Enteral Nutr.* **22**, 357–362 (1998).
34. Sudan, D. Cost and quality of life after intestinal transplantation. *Gastroenterology* **130**, 158–162 (2006).
35. Meyer, U. The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective. *Fundam. Tissue Eng. Regen. Med.* 5–12 (2009). doi:10.1007/978-3-540-77755-7
36. Boomer, L. *et al.* Scaffolding for challenging environments: materials selection for tissue engineered intestine. *J. Biomed. Mater. Res. A* **102**, 3795–3802 (2014).
37. Wang, Y. *et al.* A microengineered collagen scaffold for generating a polarized crypt-villus architecture of human small intestinal epithelium. *Biomaterials* **128**, 44–55 (2017).
38. Zakhem, E., Raghavan, S., Gilmont, R. R. & Bitar, K. N. Chitosan-based scaffolds for the support of smooth muscle constructs in intestinal tissue engineering. *Biomaterials* **33**, 4810–4817 (2012).
39. Totonelli, G. *et al.* A rat decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration. *Biomaterials* **33**, 3401–3410 (2012).
40. Dedhia, P. H., Bertaux-Skeirik, N., Zavros, Y. & Spence, J. R. Organoid Models of Human Gastrointestinal Development and Disease. *Gastroenterology* **150**, 1098–1112 (2016).
41. Meneses, A. *et al.* Intestinal Organoids—Current and Future Applications. *Vet. Sci.* **3**, 31 (2016).
42. Spurrier, R. G. & Grikscheit, T. C. Tissue engineering the small intestine. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 354–358 (2013).
43. Ohki, T. *et al.* Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* **55**, 1704–1710 (2006).
44. Guyton, A. & Hall, J. *Guyton & Hall - Tratado de Fisiologia Médica.* (2017).
45. Dadhich, P., Zakhem, E., Koch, K. & Bitar, K. N. Therapy Using Co-Injection of Neural-Progenitor Cells and Interstitial Cells of Cajal to Reinstatement Function in an Ex Vivo Model of Neuromuscular Dysfunction of the Pylorus. (2018). doi:10.1016/s0016-5085(18)30605-x
46. Yan, W., Chen, Z.-Y., Chen, J.-Q. & Chen, H.-M. BMP2 promotes the differentiation of neural stem cells into dopaminergic neurons in vitro via miR-145-mediated upregulation of Nurr1 expression. *Am. J. Transl. Res.* **8**, 3689–3699 (2016).
47. Rego, S. L., Raghavan, S., Zakhem, E. & Bitar, K. N. Enteric neural differentiation in innervated, physiologically functional, smooth muscle constructs is modulated by bone

morphogenic protein 2 secreted by sphincteric smooth muscle cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2015).

Artigo 2

Avaliação e caracterização de *scaffolds* de matriz extracelular para aplicações na Engenharia de Tecidos do trato gastrointestinal

RESUMO

Várias estratégias têm sido exploradas para aumentar o número de enxertos de intestino delgado destinados a transplantes e, principalmente, para diminuir as taxas de rejeição deste tecido transplantado. Avanços recentes na Medicina Regenerativa estão fornecendo novas abordagens para os estudos de reparação ou substituição funcional do intestino afetado, seja por traumas ou por doenças. Neste contexto, a Engenharia de Tecidos se tornou uma opção para produzir *scaffolds* biocompatíveis a fim de produzir segmentos de intestino delgado em laboratório, sobretudo através de aplicação de metodologias de decelularização de tecidos *ex-vivo*. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar e caracterizar diferentes protocolos de decelularização de intestino delgado de ratos Wistar para a produção de *scaffolds* tubulares. Nossos resultados mostraram que a criopreservação dos intestinos a -80°C , seguida de imersão e agitação moderada em Deoxicolato de Sódio (DS) a 1% durante 2 horas foi o protocolo mais efetivo na remoção das células e melhor preservação da matriz extracelular, além de preservar a resistência mecânica. Porém, estudos adicionais de otimização do processo de decelularização devem ser implementados para garantir um maior controle de qualidade e produção em escala desses *scaffolds*, já que os mesmos apresentaram fragmentos longos de DNA residual, os quais podem ser um potencial agente imunogênico.

Palavras-Chave: Engenharia de Tecidos; Matriz Extracelular; *Scaffolds*

Lista de abreviações:

MEC - Matriz Extracelular

PBS - Tampão Fosfato-Salino (*Phosphate-buffered saline*)

HE – Hematoxilina e Eosina

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

M – Molar

N – Normal

kV – Quilovolt

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

kN – Quilonewton

CTM – Célula-Tronco Mesenquimal

DS – Deoxicolato de Sódio

bp – Pares de Base (*Base Pair*)

Evaluation and characterization of extracellular matrix scaffolds for applications in Tissue Engineering of the gastrointestinal tract

ABSTRACT

Several strategies have been explored to increase the number of small bowel grafts intended for transplants and, mainly, to decrease the rejection rates of this transplanted tissue. Recent advances in Regenerative Medicine are providing new approaches for studies of functional repair or replacement of the affected bowel, whether by trauma or disease. In this context, Tissue Engineering has become an option to produce biocompatible scaffolds in order to produce segments of the small intestine in the laboratory, mainly through the application of ex-vivo tissue decellularization methodologies. Thus, the objective of this study was to evaluate and characterize different protocols of small intestinal decellularization of Wistar rats to produce tubular scaffolds. Our results showed that intestinal cryopreservation at -80 °C, followed by immersion and moderate agitation in 1% Sodium Deoxycholate (SD) for 2 hours was the most effective protocol for removal of cells and better preservation of the extracellular matrix, besides mechanical strength. However, further studies of optimization of the decellularization process should be implemented to ensure a higher quality control and scale production of these scaffolds, since they have long fragments of residual DNA, which may be a potential immunogenic agent.

Keywords: Tissue Engineering; Extracellular Matrix; Scaffolds

INTRODUÇÃO

Os transplantes intestinais são os transplantes de órgãos intraabdominais mais desafiadores e menos frequentes, apresentando evolução mais lenta em relação aos demais órgãos¹. Um dos motivos é a necessidade do uso de imunossupressão intensa em razão da grande resposta imunológica ao enxerto. Desta forma, infecções oportunistas e doenças proliferativas são mais prevalentes em relação aos demais transplantes de órgãos sólidos². Não obstante, em razão da grande quantidade de tecido transplantada, a doença Enxerto *versus* Hospedeiro também é mais prevalente^{1,3,4}.

Ao longo das últimas duas décadas, com o avanço do desenvolvimento dos biomateriais, da tecnologia de cultivo celular e com a evolução das técnicas de aquisição de imagens, o desenvolvimento de tecidos em laboratório tem se tornado realidade^{5,6,7,8}. Para tanto, *scaffolds* de matriz extracelular (MEC) têm sido rotineiramente utilizados^{9,10,11,12,13}. A MEC é uma rede intrincada composta por uma série de macromoléculas multidomínios organizadas de forma específica para as células:

Os componentes da MEC se unem para formar um composto estruturalmente estável, contribuindo para as propriedades mecânicas dos tecidos, além de ser um reservatório de fatores de crescimento e moléculas bioativas. É uma entidade altamente dinâmica que é de vital importância, determinando e controlando os comportamentos e características mais fundamentais das células, como proliferação, adesão, migração, polaridade, diferenciação e apoptose¹⁴.

Desta forma, os *scaffolds* de MEC são um nicho natural para as células a serem cultivadas *in vitro*, fornecendo arquitetura e integridade mecânica para orientar e regular o comportamento celular¹⁵, além de evitar respostas imunológicas adversas em futuros transplantes. Neste sentido, uma série de abordagens têm sido testadas para remover células e preservar a MEC intacta através de tratamentos físicos¹⁶, químicos^{17,18} e enzimáticos¹⁹, técnica denominada de descelularização. Portanto, o objetivo deste trabalho foi produzir matrizes extracelulares descelularizadas de intestino delgado que mantivessem as características biológicas e físicas do tecido original, para posterior uso na recelularização deste *scaffold* tubular e produção de tecidos intestinais autólogos em laboratório.

1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e coleta das amostras

As amostras de intestino delgado utilizadas para a validação dos protocolos de descelularização foram obtidas de animais de outros experimentos em andamento na Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP) com aprovação do comitê de ética, no momento da eutanásia. Foram excluídos animais que estavam sob regime de desnutrição, sob o uso de imunossupressores ou que estavam infectados. Desta forma, não houve necessidade de sacrifício de animal exclusivamente para a finalidade de padronização da técnica. Rapidamente, as necropsias intestinais foram limpas com Tampão Fosfato-Salino (PBS) gelado logo após a coleta e preservados a -80°C.

2.2 Tratamentos para descelularização e análise histológica

Foram testados 24 protocolos de descelularização usando diferentes agentes químicos, físicos e mecânicos (Anexo 1). Amostras de intestino delgado *in natura* e descelularizados foram fixadas por imersão em solução de formalina tamponada a 10% durante 24 horas e processadas pelos métodos habituais para a obtenção de cortes histológicos de 5 micra. Os parâmetros analisados da descelularização foram guiados pelas amostras de intestino delgado a fresco e analisados pela coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) em microscópio óptico *Olympus BX41*.

Apenas o tecido descelularizado histologicamente validado (*scaffold*) prosseguiu para análises posteriores.

2.3 Análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Uma amostra de intestino *in natura* e uma amostra de intestino descelularizado, ambas de aproximadamente 2 mm³, foram fixadas por imersão em solução de *Karnovsky* por 24 horas e, após este período, foram lavadas por três vezes (5 minutos cada lavagem) em tampão fosfato a 0,1M e pH= 7,1.

Em seguida, as amostras foram imersas em tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas. Os materiais foram desidratados em uma série crescente de acetonas, incorporados na resina Araldite (*Polysciences, Niles, EUA*) e cortes semifinos de 0,5µm foram realizados e corados com azul de toluidina para o preparo da microscopia óptica, com o objetivo da escolha da área de interesse para as análises ultraestruturais por MET.

Após a escolha da área de interesse, foram feitos cortes ultrafinos de aproximadamente 90 nm e contrastados com solução saturada de uranila em álcool 50% por 20 minutos, seguidos de contraste em solução de citrato de chumbo a 2% em solução de hidróxido de sódio 1N por 10 minutos.

As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão *Tecnai Spirit* (Fei Company, Oregon, EUA), operando a 80 kV.

2.4 Extração e quantificação de DNA e RNA residuais

Cinco amostras de intestino descelularizado e cinco amostras de intestino *in natura* (grupo controle), todas com 10 mg cada, foram armazenadas e congeladas a -80°C até o momento da purificação do material genético. O DNA dos tecidos foi extraído utilizando o *MagaZorb® DNA Mini-Prep Kit* (Promega, Madison, EUA) seguindo as instruções do fabricante e armazenado a -20°C.

As amostras de DNA foram analisadas no espectrofotômetro *NanoDrop 1000* a fim de verificar resíduos orgânicos e proteínas resultantes da extração, a partir das razões de 260/280 e 260/230. A quantificação foi realizada no fluorímetro *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Life Technologies, Carlsbad, EUA) com o *dsDNA BR (Broad-Range) Assay Kit* seguindo as recomendações do fabricante.

2.5 Análises de integridade de DNA e RNA residuais

O *Agilent 2100 Bioanalyzer System* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) foi utilizado para avaliar a integridade do DNA e RNA obtidos. Com uma eletroforese automatizada em chips com microcapilares, tamanho, quantificação e integridade dos materiais genéticos puderam ser observados. Para amostras de DNA, o *kit Agilent DNA 1000* foi utilizado com 1 uL de cada amostra. As amostras de RNA foram analisadas com o *kit Agilent RNA 6000 Nano*, utilizando 1 uL de amostra desnaturada conforme protocolo.

2.6 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

A amplificação do gene normalizador β -actina no DNA extraído dos intestinos *in natura* e dos intestinos descelularizados foi realizada por meio da reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados foram descritos por Piedade²⁰, baseados na sequência com número de acesso EF156276.1 no *GenBank*. Os *primers* amplificam uma região de um único éxon do gene, sem íntrons internos.

A reação padronizada por Piedade utiliza o intercalante de DNA SYBR como método de detecção na qPCR. Baseado no protocolo descrito, uma mistura contendo 10 uL de *GoTaq Master Mix* (Promega), 0,6 uL de cada oligonucleotídeo específico a 10 uM e 6,8 uL de água nucleasse-free foram adicionados a 2 uL de cada amostra de DNA. A reação foi realizada no aparelho *7500 Fast Real Time PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*), com o programa térmico com desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C seguidos de 40 ciclos de uma desnaturação por 15 s a 95°C e anelamento e extensão por 60s a 60°C. Ao final da reação uma curva de dissociação é lida através da ciclagem 95°C por 15s, 60°C por 1 minuto, leitura a 1% até 95°C por 30s, 60°C por 15s. Um controle negativo utilizando água nucleasse-free como amostra foi utilizado no experimento. O programa *7500 Software v2.0.6* (*Thermo Fisher Scientific*) foi utilizado para avaliar a quantificação de ciclos (*Cq*), *threshold*, *baseline* e curvas de amplificação e dissociação.

2.7 Caracterização biomecânica

Os ensaios biomecânicos tiveram como objetivo comparar a resistência entre intestinos delgados *in natura* e após o processo de descelularização. O equipamento utilizado foi a Máquina Universal de Ensaio Mecânicos EMIC®, modelo DL 10.000, com precisão de $\pm (0,018 + F/3700)$ kN. O equipamento trabalha em conjunto com um microcomputador, utilizando o programa Mtest® (DDL, Minnesota, EUA) para o controle gráfico e aferição dos resultados.

Para todas as medidas, 25 segmentos de intestinos delgados descelularizados foram comparados com 25 segmentos de intestinos delgados *in natura*, os quais foram feitos imediatamente após a coleta.

2.8 Avaliação de toxicidade residual

O teste de toxicidade residual do intestino delgado descelularizado foi realizado para avaliar uma possível indução de apoptose e necrose das células-tronco mesenquimais em terceira passagem, obtidas por dissociação mecânica de tecido adiposo (CTM-TA) de ratos Wistar (Banco de células do Laboratório de Engenharia Celular – UNESP Botucatu), cultivadas sobre o *scaffold*. Utilizou-se o teste proposto por Evaristo²¹, fazendo-se uso do teste de Anexina-V/Iodeto de Propídio com o kit BD *Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection* para Citometria de Fluxo.

Para tanto, cinco fragmentos de intestino delgado descelularizado foram colocados em cada poço de uma placa de cultura não-aderente de 6 poços (Nunc®) e 1×10^6 células foram

aplicadas sobre os mesmos. O controle foi realizado no sexto poço da placa de cultura, onde foram cultivadas as CTMs sem a presença dos *scaffolds*. O meio de cultura usado foi *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F-12) (Gibco™).

A placa de cultura foi mantida por 48 horas, a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, as células foram recuperadas e, imediatamente, foram realizadas as marcações com Anexina-V/Iodeto de Propídeo por citometria de fluxo, seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, as leituras foram feitas no equipamento *FACSCalibur BD*® e as reações analisadas pelo *software CellQuest™ BD*.

2.9 Avaliação de biocompatibilidade

A avaliação de imunogenicidade dos *scaffolds* foi feita a partir de análises histológicas de três segmentos de intestino *in natura* (grupo controle) e três intestinos descelularizados (*scaffolds*) implantados subcutaneamente em dorso de ratos Wistar, conforme descrição abaixo:

- 1) Anestesia geral intraperitoneal dos animais;
- 2) Antissepsia do dorso com álcool iodado;
- 3) Incisão no dorso;
- 4) Dissecção do tecido celular subcutâneo;
- 5) Implante dos segmentos no tecido celular subcutâneo;
- 6) Fechamento da pele com fio de nylon 3.0

Os animais foram eutanasiados após 15; 30 e 60 dias após os implantes, com a finalidade de se avaliar a rejeição dos segmentos enxertados, sendo corados com HE para a realização das análises histológicas.

3 RESULTADOS

3.1 Tratamentos para descelularização e análise histológica

Dos 24 protocolos testados na descelularização dos segmentos de intestino delgado, um protocolo (*Protocolo nº 17 – Anexo 1*) apresentou eficiência na remoção de todo material celular com melhor preservação da MEC, caracterizado histologicamente pela coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) – (**Figura 1B**).

Este protocolo é descrito a seguir: após a coleta do intestino e a lavagem com PBS gelado, o mesmo foi preservado a -80°C por no mínimo 24 horas. Durante o seu descongelamento em temperatura ambiente, segmentos de aproximadamente 5cm foram cortados de forma que a técnica fosse mais eficiente. Em seguida, foi feita uma raspagem com *cell scraper* para a remoção das células mortas devido ao processo de congelamento.

A próxima etapa foi a descelularização química, fazendo uso de Deoxicolato de Sódio (DS) a 1% por 2 ciclos de 1 hora, com 3 lavagens com PBS por 15 minutos intercaladas a cada ciclo.

Os outros 23 protocolos ou produziram estruturas frágeis com perda significativa da integridade da MEC, ou não foram eficientes na remoção total das células.

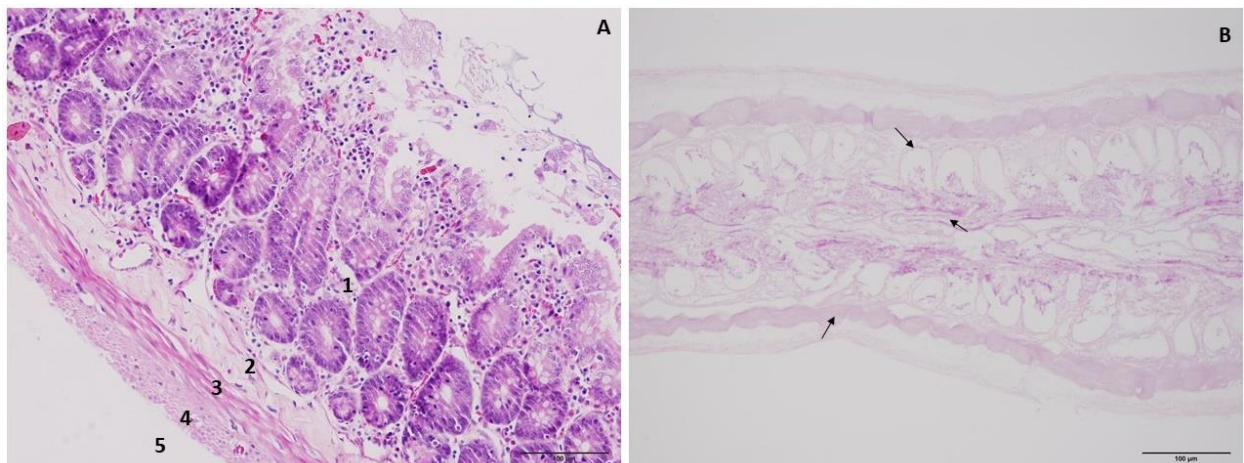


Figura 1 – Cortes histológicos de intestino delgado em coloração de HE. (A) intestino delgado *in natura*, mostrando as camadas teciduais que o compõem: (1) Mucosa; (2) Submucosa; (3) Camada Muscular Interna; (4) Camada Muscular Longitudinal Externa; (5) Serosa. (B) Intestino delgado descelularizado (*scaffold*), apresentando a perda total das células do órgão, preservando apenas a matriz extracelular (*setas*).

3.2 Análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises ultraestruturais do intestino *in natura* mostraram a presença das células nativas e a presença de fibras de colágeno em forma organizada e compacta (**Figura 2A**). As amostras de intestino descelularizado (*scaffold*) mostraram uma rede de fibras de colágeno menos compacta que o tecido a fresco, revelando uma diminuição dos componentes da matriz extracelular (**Figura 2B**). No entanto, não houve desorganização da orientação dos feixes de colágeno. Além disso, não foram observados núcleos intactos ou vestígios de células residuais no intestino descelularizado, confirmando os achados prévios das lâminas histológicas coradas por HE.

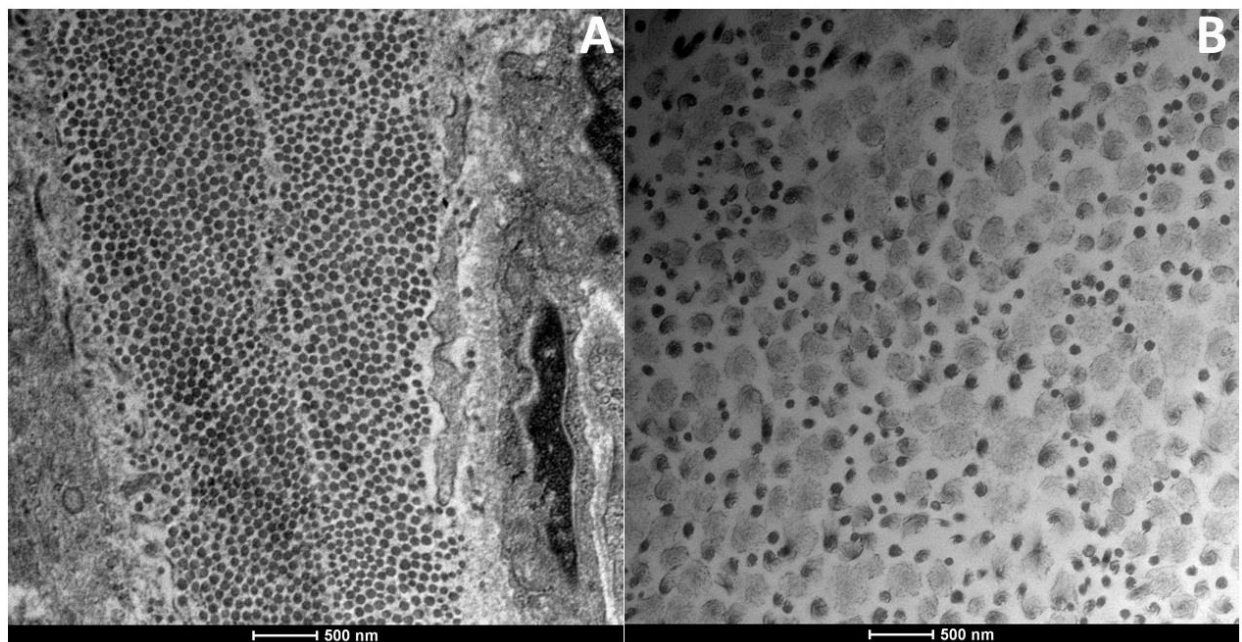


Figura 2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão. (A) Intestino Delgado *in natura*; (B) Intestino Delgado descelularizado

3.3 Extração e quantificação de DNA e RNA residuais

Após o processo de descelularização do intestino delgado, houve diminuição de 95,32% na média da quantidade de DNA quando comparado ao intestino delgado *in natura*, havendo diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

O mesmo acontece quando se trata de RNA, havendo diminuição de 99,52% na média da quantidade em relação aos *scaffolds*.

Tabela 1:

Quantificação de DNA e RNA (ng/uL) em 10 mg de intestino <i>in natura</i>		
Amostras	DNA	RNA
1	177,64	408,16
2	133,95	583,6
3	253,7	1173,38
4	209,47	961,43
5	136,69	2032,16
Média	182,29	1031,746

Tabela 2

Quantificação de DNA e RNA (ng/uL) em 10 mg de intestino descelularizado (<i>scaffold</i>)		
Amostras	DNA	RNA
1	8,97	17,82
2	7,5	2,8
3	5,0	1,32
4	16,96	0,95
5	4,21	1,5
Média	8,528	4,878

3.4 Análises de integridade de DNA e RNA residuais

Para as análises de integridade de DNA, o *kit Agilent DNA 1000* gerou eletroferogramas, ou seja, registros gráficos do sinal detector a partir da injeção das amostras, permitindo identificar e quantificar o material genético. Foram usados marcadores de tamanho mínimo de 15 pares de bases (bp) e de tamanho máximo de 1500bp.

Tanto as amostras controles (intestino *in natura*) quanto as amostras de intestino descelularizado (*scaffolds*) apresentaram fragmentos de DNA maiores que 1500bp (**Figura 3**).

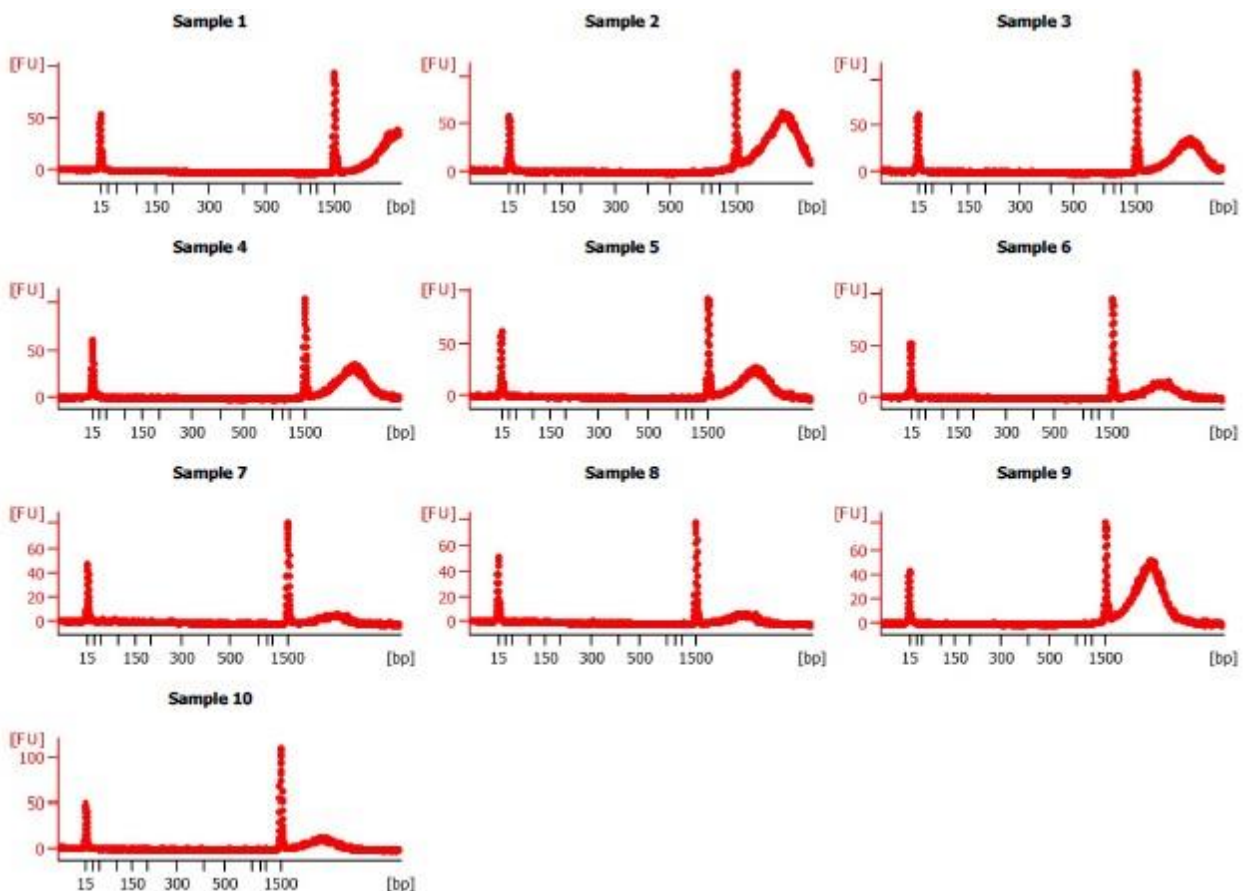


Figura 3 - Eletroferogramas: Amostras 1 a 5 - Intestinos *in natura*; Amostras 6 a 10 - Intestinos descelularizados

Na avaliação da integridade de RNA não foram possíveis observar nos eletroferogramas (**Figura 4**), tanto nas amostras controle quanto nas amostras de intestino descelularizado, os picos relacionados às subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal, mostrando, desta forma, a total degradação do RNA já após a coleta do órgão. Foram usados marcadores de 23 bases.

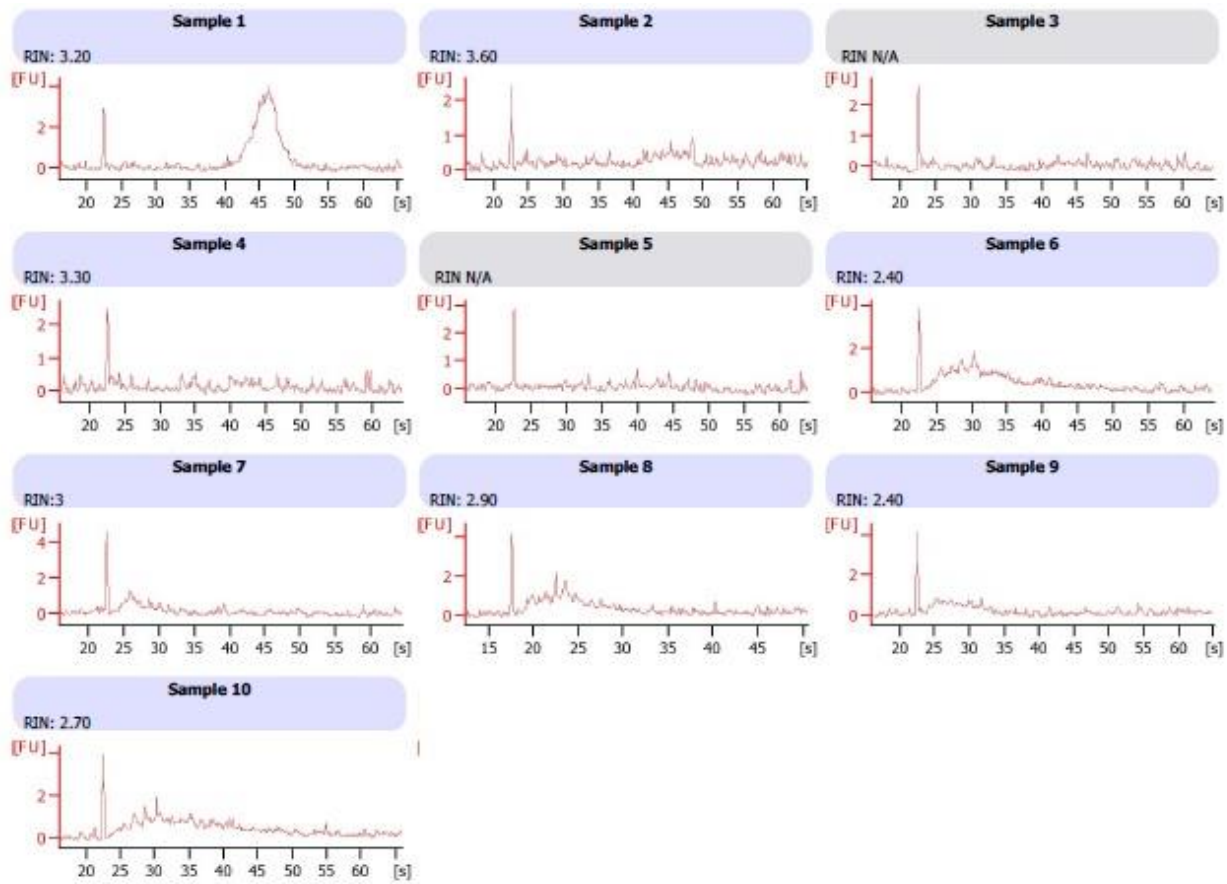


Figura 4 - Eletroferogramas: Amostras 1 a 5 - Intestinos *in natura*; Amostras 6 a 10 - Intestinos descellularizados.

3.5 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

A qPCR foi utilizada para avaliar especificamente fragmentos de material genético do organismo estudado (*Rattus norvegicus*). O C_q foi avaliado em um *threshold* de 1,0694 e *baseline* automática nos ciclos 3 a 12. Os valores obtidos de C_q podem ser observados na **tabela 3**.

Tabela 3 - Quantidade de Ciclos (Cq) necessários para a amplificação do DNA

Amostras	Intestino <i>in natura</i>	Intestino Descelularizado
1	19,85827	22,54747
2	19,86378	23,61018
3	20,15999	24,09172
4	20,17224	24,33137
5	20,23287	24,56044
Média	20,05743	23,82823
Desvio Padrão	0,162261	0,713668

3.6 Caracterização biomecânica

A análise estatística utilizada para os ensaios de Força Tênsil foi o teste T para a comparação dos dois grupos independentes, considerando as variâncias equivalentes.

Foi calculado o coeficiente de deformação elástica (k), dividindo o valor da Força (F) pela deformação máxima (x). Para tanto, as deformações calculadas em milímetros (mm) foram convertidas para metros (m), respeitando, desta forma, o Sistema Internacional de Unidades (SI) – (**Anexo 2**). Obtiveram-se os seguintes valores de *p* para as seguintes variáveis: Força Tênsil - *p*= 0,0851; deformação máxima – *p*= 0,1369; coeficiente de deformação elástica – *p*= 0,6564. Portanto, não houve diferença estatística significativa (*p*<0,05) para nenhum dos valores obtidos.

3.7 Avaliação de Toxicidade Residual

Os resultados da avaliação da citotoxicidade induzida pelo cultivo das células-tronco mesenquimais sobre o *scaffold* indicam a preservação da viabilidade celular nas amostras avaliadas, diante da ausência de marcação com Anexina-V e Iodeto de Propídio (**figura 5 e tabela 4**).

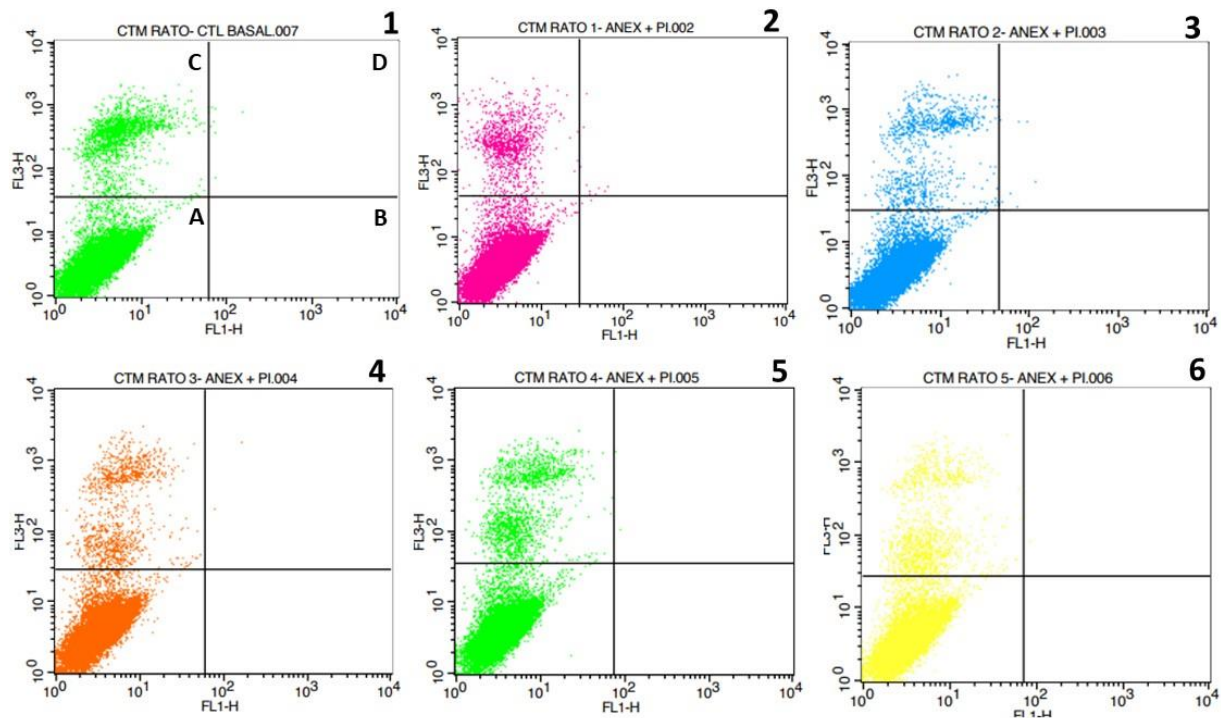


Figura 5 - DotPlot indicando em 1 o controle negativo, ou seja, apenas as CTMs no poço; de 2 a 6, CTM-TA cultivadas sobre o *scaffold*. Legenda: A - Células viáveis; B - Células nos estágios precoces de apoptose; C - Necrose Celular; D - Estágios finais de apoptose.

Tabela 4 – Percentual da viabilidade celular do grupo controle e das CTMs cultivadas sobre os *scaffolds*

Grupos	Células Viáveis (A)	Apoptose precoce (B)	Necrose (C)	Apoptose tardia (D)
1 (controle negativo)	93,78%	0%	6,19%	0,03%
2	95,75%	0,01%	4,21%	0,03%
3	96,51%	0%	3,46%	0,04%
4	95,73%	0%	4,26%	0,01%
5	94,45%	0%	5,54%	0,01%
6	95,40%	0%	4,60%	0%

3.8 Avaliação de biocompatibilidade

As análises histológicas dos intestinos descelularizados implantados subcutaneamente no dorso de ratos Wistar mostraram que os mesmos se mantêm íntegros e sem nenhum sinal de inflamação no dorso dos animais durante os 60 dias analisados (**figuras 6D; 6E; 6F**).

Já o grupo controle (intestino *in natura*) se mostrou altamente imunogênico durante todo o período analisado, evidenciando uma intensa reação inflamatória após 15 dias do implante

(figura 6A), apresentando processo de necrose tecidual dos intestinos implantados após 30 e 60 dias (figuras 6B; 6C).

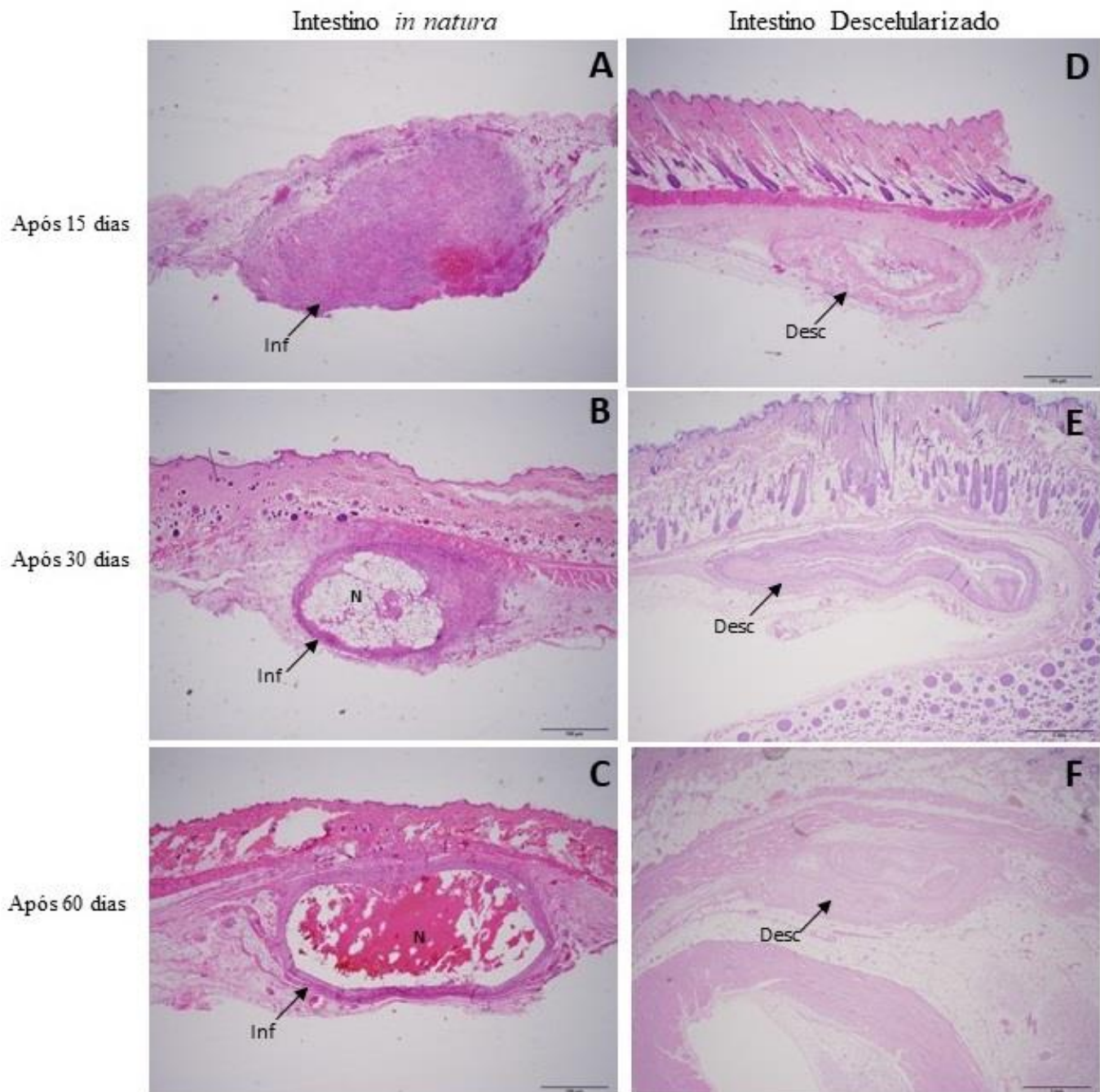


Figura 6 – Cortes histológicos de implantes de amostras de intestino delgado no subcutâneo de ratos Wistar: (A), (B), (C) mostram os implantes de intestino delgado *in natura* após 15; 30 e 60 dias, respectivamente. (D), (E), (F) mostram os implantes de intestino descelularizados após 15; 30 e 60 dias, respectivamente. Legenda: (inf) – Inflamação; (N) – Necrose; (Desc) – Intestino Delgado descelularizado.

Discussão

Embora o objetivo dos protocolos de descelularização seja a remoção de componentes celulares e a preservação da ultraestrutura e da composição bioquímica da MEC nativa, todos os métodos de descelularização invariavelmente comprometem a integridade da MEC²². Há um equilíbrio delicado entre a manutenção da estrutura e da composição nativa da MEC e a remoção de componentes celulares.

A caracterização do intestino descelularizado validado neste estudo para a produção de *scaffolds* tubulares mostrou-se completa com remoção das células nativas, com preservação das características histológicas, ao serem analisadas pela coloração de HE. Todavia, ao ser analisado ultraestruturalmente por Microscopia Eletrônica de Transmissão, constatou-se notável depleção de elementos da MEC. É importante salientar, no entanto, que a força tênsil dos intestinos descelularizados não alterou significativamente, mostrando a preservação da resistência mecânica do tecido, importante para a preservação da arquitetura nativa do órgão. Não obstante, não houve desorganização dos feixes de componentes da MEC, importante para a orientação das células.

O *scaffold* de matriz extracelular, contudo, desempenha papéis secundários além do suporte mecânico tridimensional para as células, tais como a mediação celular através de receptores de integrina²³ e a influência da proliferação celular²⁴. Desta forma, o *scaffold* tridimensional validado neste estudo provavelmente cumprirá estas funções, em estudos posteriores, ao ser recelularizado com células nativas de intestino delgado.

Para tanto, é de suma importância que a descelularização do órgão não apresente toxicidade residual na MEC constitutiva, causada por possíveis resquícios do detergente usado na técnica. A avaliação da toxicidade pode ser realizada pela quantificação do produto químico usado²⁵ ou na manutenção da viabilidade de diferentes tipos celulares cultivados no *scaffold*²⁶. Ao cultivarmos células-tronco mesenquimais sobre a estrutura, os resultados indicaram uma preservação da viabilidade celular nas amostras avaliadas, diante da ausência de marcação com Anexina-V e Iodeto de Propídio.

Outro critério que estabelece o sucesso de uma técnica de descelularização é a remoção de agentes imunogênicos do *scaffold*. As moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) expressas nas membranas das células representam os mediadores mais críticos em uma rejeição crônica. Ao implantarmos os intestinos *in natura* e os intestinos descelularizados no dorso de ratos Wistar, avaliamos e comparamos a resposta imune do organismo dos animais frente aos implantes. Não houve rejeição do *scaffold* implantado e o se manteve íntegro e sem nenhum sinal de rejeição após 60 dias, indicando que os mesmos são biocompatíveis a um transplante.

A avaliação quantitativa de DNA é uma forma de se determinar a presença de restos nucleares no tecido decelularizado, analisando, desta forma, o *scaffold* em uma maneira mais criteriosa para aquém das análises histológicas. Em termos de eliminação de material genético, Crapo et al²⁷ propõem que a MEC decelularizada deve conter menos de 50 ng de dsDNA por mg de MEC seca; e DNA com fragmentos menores que 200 pares de base (bp). Apesar de nossa metodologia determinar um decréscimo de 95,32% na média da quantidade de DNA no *scaffold*, as análises feitas por eletroforese capilar mostraram que os fragmentos residuais são maiores do que 1000bp, não conseguindo, portanto, respeitar este critério. Para quebrar os fragmentos de ácidos nucleicos, DNases são amplamente usadas em protocolos experimentais de decelularização^{28,29,30}. No entanto, o alto custo dessas endonucleases tornaria inviável economicamente estas técnicas em um intestino delgado humano, em futuros experimentos translacionais e na prática clínica.

Para se confirmar uma possível imunogenicidade causada pelos fragmentos residuais de DNA em nosso *scaffold*, foi realizada uma qPCR, usando oligonucleotídeos iniciadores para o gene da β -actina, um gene constitutivo. Houve amplificação tanto das amostras controle quanto dos tecidos decelularizados, mostrando o risco potencial imunogênico desses fragmentos longos de DNA remanescentes na matriz extracelular. Todavia, todas as amostras de RNA já estavam degradadas a partir do momento da coleta dos intestinos, não devendo causar preocupação quanto a um possível fator imunogênico.

4 Conclusão

A metodologia usada em nosso estudo para a decelularização de intestino delgado é passível de ser usada na produção de *scaffolds* tubulares, com o intuito de se produzir tecidos intestinais em laboratório, com objetivos na ciência básica e translacional. No entanto, estudos adicionais de otimização do processo de decelularização devem ser implementados para garantir um maior controle de qualidade e produção em escala desses *scaffolds*. Ademais, entender a complexidade da matriz extracelular em seu nível estrutural, na sua forma de organização topográfica e na sua composição bioquímica é necessário para o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas na Engenharia de Tecidos, tal como sua produção sintética por bioimpressão 3D. Além disso, intestinos decelularizados têm o potencial de gerar números ilimitados de enxertos para transplantes alogênicos e xenogênicos.

Esforços conjuntos com diferentes especialistas (médicos gastroenterologistas, patologistas, biólogos e engenheiros biomédicos) devem ser realizados para se alcançar o sucesso nesta nova fronteira da medicina e da biotecnologia.

5 Referências

1. Fishbein, T. M. Intestinal transplantation. *N. Engl. J. Med.* **361**, 998–1008+946 (2009).
2. Gurkan, A. Advances in small bowel transplantation. *Turkish J. Surg.* **33**, 135–141 (2017).
3. Mayer, L. Mucosal Immunity and Gastrointestinal Antigen Processing. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**, (2000).
4. Newell, K. A. Transplantation of the Intestine: Is it Truly Different? *Am. J. Transplant.* **3**, 1–2 (2003).
5. De Filippo, R. E., Yoo, J. J. & Atala, A. Urethral Replacement Using Cell Seeded Tubularized Collagen Matrices. *J. Urol.* **168**, 1789–1793 (2002).
6. Jayo, M. J., Jain, D., Wagner, B. J. & Bertram, T. A. Early Cellular and Stromal Responses in Regeneration Versus Repair of a Mammalian Bladder Using Autologous Cell and Biodegradable Scaffold Technologies. *J. Urol.* **180**, 392–397 (2008).
7. Fuchs, J. R., Terada, S., Ochoa, E. R., Vacanti, J. P. & Fauza, D. O. Fetal tissue engineering: In utero tracheal augmentation in an ovine model. *J. Pediatr. Surg.* **37**, 1000–1006 (2002).
8. Gershlak, J. R. *et al.* Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **125**, 13–22 (2017).
9. Seetapun, D. & Ross, J. J. Eliminating the organ transplant waiting list: The future with perfusion decellularized organs. *Surg. (United States)* **161**, 1474–1478 (2017).
10. Totonelli, G. *et al.* Detergent enzymatic treatment for the development of a natural acellular matrix for oesophageal regeneration. *Pediatr. Surg. Int.* **29**, 87–95 (2013).
11. Reimer, J. M., Syedain, Z. H., Haynie, B. H. T. & Tranquillo, R. T. Pediatric tubular pulmonary heart valve from decellularized engineered tissue tubes. *Biomaterials* **62**, 88–94 (2015).
12. Pang, K., Du, L. & Wu, X. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. *Biomaterials* **31**, 7257–7265 (2010).
13. Sullivan, D. C. *et al.* Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials* **33**, 7756–7764 (2012).
14. Yue, B. Biology of the extracellular matrix: An overview. *J. Glaucoma* **23**, S20–S23 (2014).
15. Sheng, Y., Fei, D., Leiie, G. & Xiaosong, G. Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **12**, 233–246 (2017).
16. Hashimoto, Y. *et al.* Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. *Biomaterials* **31**, 3941–3948 (2010).
17. Yang, G., Sau, C., Lai, W., Cichon, J. & Li, W. Bioengineering human myocardium on native extracellular matrix. **344**, 1173–1178 (2015).
18. O'Neill, J. D. *et al.* Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. *Ann. Thorac. Surg.* **96**, 1046–1055 (2013).
19. Giraldo-Gomez, D. M. *et al.* Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: Morphological and biophysical characterization. *Mater. Sci. Eng. C* **59**, 930–937 (2016).
20. Piedade, W. P. Aspectos Estruturais e Moleculares do Músculo Cardíaco durante a Transição Entre a Disfunção e a Insuficiência Cardíaca. (Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', 2015).
21. Evaristo, T. C. Avaliação histológica e funcional do enxerto de neotraqueia de coelho desenvolvido por bioengenharia. (Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita

- Filho', 2015).
22. Hussey, G. S., Cramer, M. C. & Badylak, S. F. Extracellular Matrix Bioscaffolds for Building Gastrointestinal Tissue. *Cmgh* **5**, 1–13 (2018).
 23. Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11–25 (1992).
 24. Salvatori, M. *et al.* Extracellular matrix scaffold technology for bioartificial pancreas engineering: State of the art and future challenges. *J. Diabetes Sci. Technol.* **8**, 159–169 (2014).
 25. Dettin, M. *et al.* Natural scaffolds for regenerative medicine: Direct determination of detergents entrapped in decellularized heart valves. *Biomed Res. Int.* **2017**, (2017).
 26. Xu, H. *et al.* Comparison of decellularization protocols for preparing a decellularized porcine annulus fibrosus scaffold. *PLoS One* **9**, 1–13 (2014).
 27. Crapo, P. M., Gilbert, T. W. & Badylak, D. V. M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **32**, 3233–3243 (2011).
 28. Elder, Benjamin; Eleswarap, Sriram; Athanasio, K. Extraction Techniques for the Decellularization of Tissue Engineered Articular Cartilage Constructs. **30**, 3749–3756 (2010).
 29. Perea-Gil, I. *et al.* In vitro comparative study of two decellularization protocols in search of an optimal myocardial scaffold for recellularization. *Am. J. Transl. Res.* **7**, 558–573 (2015).
 30. Price, A. P. *et al.* Automated Decellularization of Intact, Human-Sized Lungs for Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part C Methods* **21**, 94–103 (2015).

Anexo 1

Protocolos testados para a descelularização de intestino delgado

Protocolo	Procedimento físico	Agente Mecânico	Agente químico	Procedimento
1	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	Suco de 1 limão Taiti	24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
2	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) Suco de 1 limão Taiti (2) SDS 0,1%	(1) 24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS) (2) 1 hora em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
3	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) Suco de 1 limão Taiti (2) SDS 0,1%	(1) 24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS) (2) 2 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
4	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) Suco de 1 limão Taiti (2) SDS 1%	(1) 24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS) (2) 1 hora em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
5	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) Suco de 1 limão Taiti em 100 mL de água deionizada	24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
6	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) Suco de 1 limão Taiti em 100 mL de	(1) 24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens

			água deionizada	por 15 min com PBS)
			(2) SDS 0,1%	(2) 1 hora em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
7	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) Suco de 1 limão Taiti em 100 mL de água deionizada (2) SDS 0,1%	(1) 24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS) (2) 2 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
8	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) Suco de 1 limão Taiti em 100 mL de água deionizada (2) SDS 1%	(1) 24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS) (2) 1 hora em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
9	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	AC 133 g/ 100 mL de água deionizada	24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
10	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) AC 133 g/ 100 mL de água deionizada (2) SDS 0,1%	(1) 24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS) (2) 1 hora em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
11	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) AC 133 g/ 100 mL de água deionizada (2) SDS 0,1%	(1) 24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS) (2) 2 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15

				min com PBS)
12	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) AC 133 g/ 100 mL de água deionizada (2) SDS 1%	(1) 24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS) (2) 1 hora em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
13	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	AC 66,5 g/ 100 mL de água deionizada	24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
14	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) AC 66,5 g/ 100 mL de água deionizada (2) SDS 0,1%	(1) 24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS) (2) 1 hora em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
15	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) AC 66,5 g/ 100 mL de água deionizada (2) SDS 0,1%	(1) 24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS) (2) 2 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
16	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	(1) AC 66,5 g/ 100 mL de água deionizada (2) SDS 1%	(1) 24 horas em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS) (2) 1 hora em imersão em agitação moderada (+ 3 lavagens por 15 min com PBS)
17	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scraper</i>	DS 1%	2 ciclos de 1 hora (+ 3 lavagens com PBS por 15 min entre cada ciclo)

18	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scrapper</i>	DS 1%	3 ciclos de 1 horas (+ 3 lavagens com PBS por 15 min entre cada ciclo)
19	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scrapper</i>	DS 1%	2 ciclos de 2 horas (+ 3 lavagens com PBS por 15 min entre cada ciclo)
20	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scrapper</i>	DS 1%	3 ciclos de 2 horas (+ 3 lavagens com PBS por 15 min entre cada ciclo)
21	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scrapper</i>	DS 2%	2 ciclos de 1 hora (+ 3 lavagens com PBS por 15 min entre cada ciclo)
22	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scrapper</i>	DS 2%	3 ciclos de 1 hora (+ 3 lavagens com PBS por 15 min entre cada ciclo)
23	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scrapper</i>	DS 2%	2 ciclos de 2 horas (+ 3 lavagens com PBS por 15 min entre cada ciclo)
24	Criopreservação a -80°C	<i>Cell scrapper</i>	DS 2%	3 ciclos de 2 horas (+ 3 lavagens com PBS por 15 min entre cada ciclo)

Legenda: AC: Ácido Cítrico; DS: Deoxicolato de Sódio; SDS: Dodecil Sulfato de Sódio.

Anexo 2
A. Ensaio biomecânico dos intestinos delgados *in natura*

Amostras	Força Máxima (N)	Deformação Máxima (mm)	Coefficiente de Deformação Elástica (k (N/m))*
1	1,251	1,944	643,5185185
2	1,331	4,353	305,7661383
3	2,827	2,629	1075,313808
4	1,839	3,027	607,5322101
5	1,664	2,43	684,7736626
6	2,404	4,574	525,5793616
7	1,983	2,298	862,924282
8	2,39	2,563	932,5009754
9	2,535	2,806	903,4212402
10	1,294	1,326	975,86727
11	2,407	3,27	736,0856269
12	2,293	3,425	669,4890511
13	2,293	3,425	669,4890511
14	1,14	1,834	621,5921483
15	1,893	2,806	674,6258019
16	1,852	2,983	620,8514918
17	1,567	3,049	513,9389964
18	1,869	2,563	729,2235661
19	2,151	2,453	876,8854464
20	3,301	6,032	547,2480106
21	7,127	3,403	2094,328534
22	3,963	3,425	1157,080292
23	1,167	1,812	644,0397351
24	1,728	2,386	724,2246438
25	4,189	3,535	1185,007072
Média	2,33832	2,97404	799,2522773
Máximo	7,127	6,032	2094,328534
Mínimo	1,14	1,326	305,7661383

- Para o cálculo do coeficiente de deformação elástica (k), a Deformação Máxima foi convertida para metros, respeitando o Sistema Internacional de Medidas (SI).

**B. Ensaios biomecânicos dos intestinos delgados descelularizados
(scaffolds)**

Amostras	Força Máxima (N)	Deformação Máxima (mm)	Coefficiente de Deformação Elástica (k) (N/m)**
1	0,6757	1,834	368,4296619
2	1,523	1,9	801,5789474
3	1,721	1,458	1180,384088
4	1,099	1,304	842,791411
5	1,946	1,701	1144,032922
6	2,38	0,8617	2761,982128
7	3,002	4,419	679,339217
8	1,856	2,563	724,1513851
9	1,2	0,928	1293,103448
10	1,577	2,519	626,0420802
11	1,819	3,005	605,3244592
12	1,711	5,237	326,7137674
13	2,313	2,121	1090,523338
14	1,358	1,746	777,7777778
15	2,205	4,043	545,3870888
16	2,784	2,21	1259,728507
17	2,4	2,519	952,7590314
18	1,049	1,657	633,0718165
19	2,121	3,712	571,3900862
20	2,763	4,706	587,1228219
21	1,294	2,033	636,4977865
22	1,294	1,966	658,1892167
23	2,118	3,403	622,3920071
24	1,92	2,187	877,914952
25	2,024	2,806	721,3114754
Média	1,846108	2,513548	851,5175768
Máximo	3,002	5,237	2761,982128
Mínimo	0,6757	0,8617	326,7137674

** Para o cálculo do coeficiente de deformação elástica (k), a Deformação Máxima foi convertida para metros, respeitando o Sistema Internacional de Medidas (SI).

Lembrando que:

$$F = k \cdot x$$

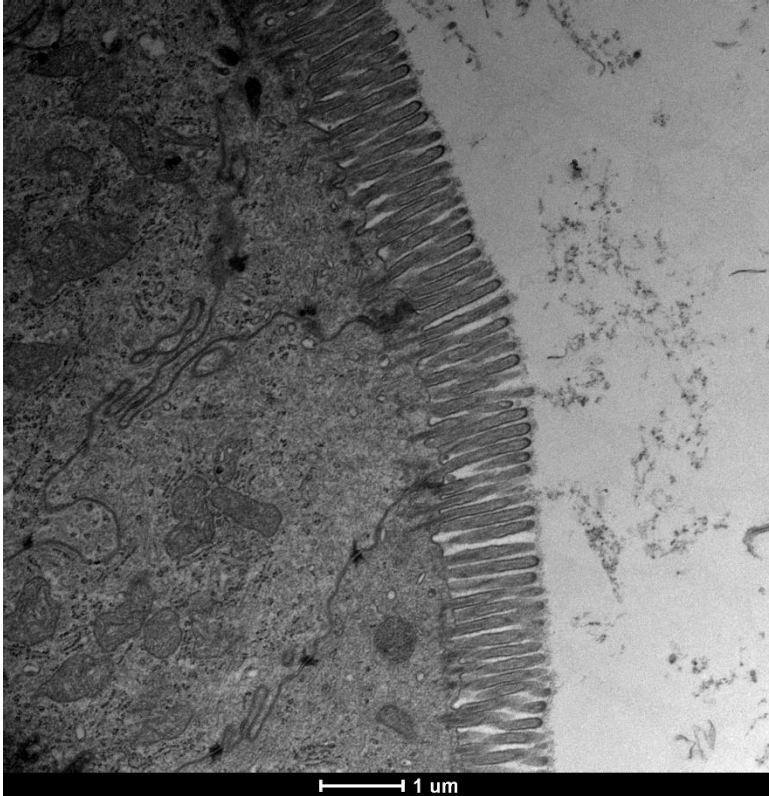
Onde:

F: Força (N)

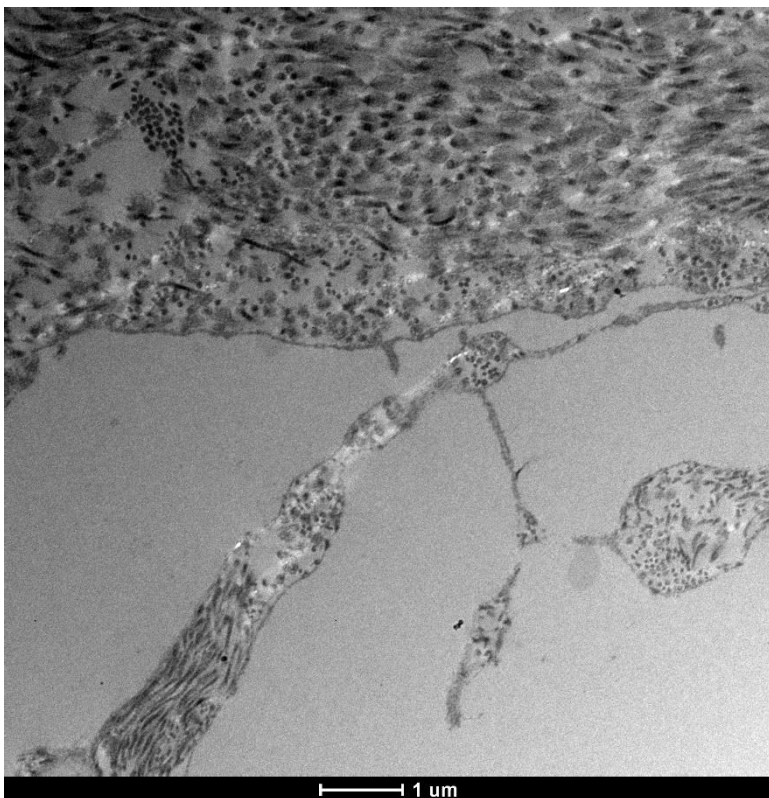
K: coeficiente de deformação elástica (N/m)

x: deformação (m)

Anexo 3
Fotomicrografias extras das análises feitas por Microscopia Eletrônica de
Transmissão (MET)



Microvilosidades intestinais –
Intestino *in natura*



Matriz extracelular se
desprendendo devido ao excesso de
manipulação – Intestino
descelularizado (*scaffold*)

Anexo 4
Contrato de confidencialidade com a *Wake Forest Institute for Regenerative Medicine (WFIRM)*

WAKE FOREST BAPTIST MEDICAL CENTER
NONEMPLOYEE
 CONFIDENTIALITY AGREEMENT

Wake Forest University Health Sciences and North Carolina Baptist Hospital, along with their subsidiaries (collectively “the Medical Center”) have, and will develop further, confidential, proprietary information and trade secrets related to their clinical, research and educational missions.

These trade secrets and confidential and proprietary information include but are not limited to, information concerning patients, research studies and subjects, animal care and use, faculty, staff and students, planning, financial and donor information, prices, pricing methods, costs, procedures or processes for the Medical Center’s business, fixtures, research and development methods, projects, data, goals or activities, business strategies, research techniques, the identities or addresses of the Medical Center’s employees or their functions, confidential reports prepared for the Medical Center by business consultants, or any other information concerning the Medical Center or its business that is not readily and easily available to the public or to those in the Medical Center’s business (any and all of which shall be referred to in this Agreement as “Information”). In the course of my relationship with the Medical Center, I may have access to such Information, and I understand and acknowledge the importance of protecting the confidential of such Information.

In consideration of my continued relationship, by signing this Agreement, I understand and agree to the following:

1. I may use Information disclosed to me solely in the course of my relationship with the Medical Center. I may not use Information for any other purpose.
2. During the after my relationship, I will hold all Information in the strictest confidence and will not disclose any Information or any portion of the Information to any other firm, entity, institution, or person, except that I may disclose the Information on a confidential basis to other employees and agents of the Medical Center on a “need to know” basis in the course of my relationship with the Medical Center. I understand and agree that my obligation to keep Information confidential forbids me to disclose Information even to family members or friends, and even when identifying details are not revealed.
3. I understand and agree that all property of and data and records with respect to the Medical Center and its affiliates coming into my possession or kept by me in connection with my relationship with the Medical Center, including without limitation, correspondence, management studies, research records, notebooks, blueprints, computer programs, software and documentation, bulletins, reports, patient lists, students and employee data, costs, purchasing and marketing information, are the exclusive property of the Medical Center. I agree to return to the Medical Center all such property and all copies of such data and records upon termination of my relationship or as otherwise directed by the Medical Center.
4. I understand that the Information is of a private, internal, or confidential nature and constitutes a valuable, special and unique asset of the Medical Center and its affiliates.
5. I understand a material breach of this Agreement will cause irreparable damage to the Medical Center and its affiliates, and that such damage will be difficult to quantify and for which money damages alone will not be adequate. Accordingly, I agree that the

Medical Center, in addition to another other legal rights or remedies available to the Medical Center on accounts of a breach or threatened breach of this Agreement, shall have the right to obtain an injunction against me enjoying any such breach without the need for posting a bond, and I waive the defense in any equitable proceeding that there is an adequate remedy at law for such breach.

6. I will not access any Information or area of the Medical Center that I have not been authorized to access. I will not discuss Information in areas where others who do not have a need to know such Information may overhear the conversation (e.g. hallways, elevators, cafeterias, shuttle buses, public transportation, restaurants, and social events).
7. I will not access any Information for other persons or employees who do not have the right to access the Information themselves. I will not disclose my or any other Medical Center employee's computer password(s) to anyone, nor will I use another person's password(s) instead of my own for any reason unless authorized by my point of contact or unless required by the Medical Center's Information Systems Department for maintenance reasons. I will inform my point of contact immediately if I know or have reason to believe someone without proper authority knows or is using my password(s).
8. I will not:
 - a. make any person or unauthorized inquiries* into my Medical Center computer or system;
 - b. make any person or unauthorized transmissions of any Information;
 - c. modify any Information without authority to do so; or
 - d. purge any Information without authority to do so.
9. I will log off, lock, or restart any computer prior to leaving it unattended.
10. I will inform my Medical Center point of contact, or other appropriate personnel of any known or suspected unauthorized disclosure or misuse of Information which I observe or of which I become aware.
11. I will protect Medical Center Information stores on a laptop computer by:
 - a. Encrypting all Information stored on the laptop;
 - b. Temporarily storing Information (during active use only) on the laptop; and
 - c. Maintaining a current secure backup of all Information stored on the laptop network, CD, DVD, etc.)
12. Any Information that I am authorized to store on removable storage media (e.g. CS's, DVD's, PDA's, USB/flash drives, external hard drives, etc.) will be stored in a secure manner (that is, with password protection.).
13. I will immediately report to my Medical Center point of contact if said media or any Information is ever lost or stolen.
14. I will secure all transmissions (email, file transfers, etc.) with password protection that contain Confidential Information in accordance with the Medical Center Information Security and Privacy Policies.
15. I understand that public (i.e. non-Medical Center) wired and wireless networks should not be considered secure for any reason. Therefore, whenever I am connected to a computer network other than the Medical Center's conducting Medical Center business; I will use the Medical Center's Portal or VPN (Virtual Private Network) software to access the Medical Center's resources remotely.
16. I understand and agree that this Agreement shall be governed by the construed in accordance with the laws of the State of North Carolina and any claim or dispute arising from the terms or performance of this Agreement will be submitted to the jurisdiction of the state or federal courts of North Carolina, and I consent to the exclusive jurisdiction of such Courts.

17. I understand that any violation of the terms of this Agreement may result in termination of my relationship with the Medical Center and/or termination of my access to Medical Center Information and/or the Medical Center facility as applicable. I further understand that all of my use and access to Medical Center systems, including e-mail and Internet use, is subject to auditing or monitoring by the Medical Center.

I acknowledge that I have read this Agreement, understand its terms, and agree to abide by both this Agreement and Medical Center's Information Security and Privacy Policies and all other policies in effect where applicable concerning the security and privacy of Information. I further understand and acknowledge that nothing contained in this Agreement creates a contract regarding the term of my relationship with the Medical Center, express or implied.