

Fernanda Rocha de Souza

**DESCELULARIZAÇÃO DE RINS PORCINOS E
CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS RENAIIS HUMANAS
ADULTAS**

Dissertação apresentada à Sociedade
Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

São Paulo

2017

Fernanda Rocha de Souza

**DESCELULARIZAÇÃO DE RINS PORCINOS E
CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS RENAIIS HUMANAS
ADULTAS**

Dissertação apresentada à Sociedade
Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Nádia Karina
Guimarães de Souza

São Paulo

2017

S725d

Souza, Fernanda Rocha de

Descelularização de rins porcos e caracterização de células renais humanas adultas / Fernanda Rocha de Souza. -- São Paulo, 2017. xii, 42 f.

Dissertação (Mestrado) – Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Porcine kidney descellularization and human kidney cell characterization*.

1. Descelularização. 2. Rim. 3. Células renais humanas. 4. Matriz extracelular. 5. Nefropatias/terapia. 6. Terapia baseada em transplante de células e tecidos.

NLM - WJ 300

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

SOCIEDADE BENEFICENTE ISRAELITA BRASILEIRA ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Fernanda Rocha de Souza

**DESCELULARIZAÇÃO DE RINS PORCINOS E CARACTERIZAÇÃO DE
CÉLULAS RENAIIS HUMANAS ADULTAS**

Presidente da banca: Profa. Dra. Nádia Karina Guimarães de Souza

BANCA EXAMINADORA:

Membros titulares:

Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni

Prof. Dr. Adalberto Ramon Vieyra

Profa. Dra. Mirian Aparecida Boim

Membros suplentes:

Prof. Dr. Marcelo Costa Batista

Prof. Dr. José Tarcisio Giffoni de Carvalho Junior

Aprovada em: 15/08/2017.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai, Francisco Fernandes de Souza Filho, maior exemplo de conduta e honestidade e por todo apoio e incentivo em todas as minhas decisões.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, a Deus fonte de inspiração divina e força para a perseverança na busca do cumprimento desta meta.

À minha orientadora Profa. Dra. Nádia Karina Guimarães de Souza por todo o conhecimento ensinado, dedicação, atenção e amizade.

Ao Prof. Dr. Roberto Soler pelo treinamento cirúrgico e pela confecção das gravuras da aula de defesa da dissertação de mestrado.

Ao Hospital Israelita Albert Einstein, por sediar meus experimentos.

Agradecimentos especiais

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por mais uma vez proporcionar o financiamento de meus estudos por meio da concessão de Bolsa de Mestrado (Processo FAPESP nº2015/04501-0).

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Agradecimentos especiais.....	vii
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xi
Resumo	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	9
2 MÉTODOS	10
2.1 Coleta das amostras de rins humanos	10
2.2 Cultura de células renais adultas	10
2.3 Caracterização das células renais adultas	11
2.4 Obtenção dos rins porcinos.....	12
2.5 Descelularização	13
2.6 Análise da descelularização	14
2.7 Análise estatística da caracterização das células renais adultas	15
3 RESULTADOS	16
3.1 Células renais humanas adultas: análise estatística	16
3.2 Células renais humanas adultas: citometria de fluxo	18
3.3 Descelularização	24
3.4 Análise de histologia	25
3.5 Análise da imunohistoquímica.....	28
4 DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÕES	37
6 REFERÊNCIAS.....	38
Abstract	

Lista de figuras

Figura 1. Biorreator e bomba de perfusão	14
Figura 2. Descelularização dodecil sulfato de sódio – 4 horas depois.....	24
Figura 3. Descelularização – 24 horas depois	25
Figura 4. Rim controle corado com H&E	26
Figura 5. Rim controle corado com Tricrômico de Masson.....	26
Figura 6. Rim controle corado com Sirius Red	27
Figura 7. Rim descelularizado corado com H&E	27
Figura 8. Rim descelularizado corado com Tricrômico de Masson.....	28
Figura 9. Rim descelularizado corado com Sirius Red	28
Figura 10. Rim controle marcado com Colágeno IV	29
Figura 11. Rim controle marcado com Fibronectina	29
Figura 12. Rim descelularizado marcado com Colágeno IV	30
Figura 13. Rim descelularizado marcado com Fibronectina	30
Figura 14. Análise estatística da imunohistoquímica comparando colágeno tipo IV do rim descelularizado com o rim controle	31
Figura 15. Análise estatística da imunohistoquímica comparando fibronectina do rim descelularizado com o rim controle	31

Lista de tabelas

Tabela 1. Distribuição dos anticorpos e fluorocromos para os ensaios de citometria ...	11
Tabela 2. Fatores investigados quanto à associação com falência da cultura.....	16
Tabela 3. Comparação das medidas de citometria de fluxo entre grupos	17

Lista de abreviaturas e símbolos

CETEC	Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia
DCR	Doença renal crônica
DCV	Doença cardiovascular
eGFR	Ritmo filtração glomerular estimado
eGFRcr	Ritmo filtração glomerular estimado de creatinina
EMA	Túbulo distal
EMC	Matriz extracelular
EMT	Epitélio mesenquimal
EPO	Eritropoietina
IMC	Índice de massa corpórea
KCL	Cloreto de potássio
KDOQI	<i>Kidney Disease Outcomes Quality Initiative</i>
MDRD	<i>Modification of diet in renal disease</i>
NEP	Anticorpo anti-neprilisina
NKF	National Kidney Foundation
PBS	Tampão fosfato
PTH	Hormônio da paratireoide
RBT	Registro Brasileiro de Transplantes
RC	Razão de chance
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SUS	Sistema Único de Saúde
THP	Anticorpo anti-proteína de TammHorsfal
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

Resumo

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo caracterizar células renais humanas adultas avaliando correlação de fatores clínicos laboratoriais e a viabilidade das culturas primárias renais. E avaliar uma nova metodologia de descelularização para rins porcinos.

Métodos: Células renais humanas adultas coletadas de diferentes doadores, que não foram utilizados para transplante de órgãos, foram cultivadas e caracterizadas através da citometria de fluxo. Parâmetros clínico-laboratoriais foram correlacionados com os desfechos celulares. A descelularização de rins porcinos realizada através do novo protocolo utilizando dodecil sulfato de sódio a 1% por 24 horas.

Resultado: A caracterização das células renais humanas adultas pela citometria de fluxo demonstrou a presença de células progenitoras, células renais de túbulo proximal, túbulo distal, ducto coletor e fibroblastos produtor de eritropoietina. Parâmetros clínico-laboratoriais sugerem associação de parada cardiorrespiratória do doador, presença de hipertensão arterial sistêmica do doador e valores maiores de tempo entre o clampeamento e início da cultura, diurese e creatinina inicial com a não viabilidade das culturas. Rins porcinos foram descelularizados em 24 horas e a preservação da matriz extracelular comprovada por histologia e imunohistoquímica. **Conclusão:** É possível obter-se uma cultura primária de células renais viáveis a partir de rins descartados para doação de órgãos. A nova metodologia para descelularização de rins porcinos foi bem-sucedida diminuindo o tempo de descelularização para 24 horas.

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) afeta milhões de pessoas ao redor do mundo e representa um importante problema de saúde pública devido ao seu crescimento, incidência e prevalência e os altos custos de tratamento.⁽¹⁻³⁾ De acordo com a Sociedade Internacional de Nefrologia, mais de 10% da população mundial sofre com DRC.⁽⁴⁾

No Brasil, a Sociedade Brasileira de Nefrologia, Censo 2015, estimou que cerca de 111.303 pacientes encontravam-se em regime de diálise e desse valor total 20.573 chegaram a óbitos. O mesmo censo mostrou que 84% dos pacientes em regime de diálise utilizaram o Sistema Único de Saúde (SUS) como fonte pagadora do tratamento.⁽⁵⁾ Embora a diálise seja ainda a terapia substitutiva predominante para os pacientes renais crônicos, o transplante renal tem conquistado considerável importância. No entanto, a oferta de doadores de rins atende menos de um quinto da demanda.⁽⁶⁾ De acordo com o Registro Brasileiro de Transplantes (RBT), de janeiro a setembro de 2016, foram realizados 4.114 transplantes renais de um total de 5.940 transplantes de órgãos no Brasil.⁽⁷⁾

A manifestação anormal de excreção de albumina ou declínio da função renal, quantificada pela mensuração ou estimativa da taxa de filtração glomerular (eGFR) que persiste por mais de 3 meses, é caracterizada como um dano ao rim e é chamada de DRC.^(8,9)

Apesar do *clearence* de creatinina poder ser calculado a partir da medição da concentração de creatinina na urina em 24 horas de urina coletada e a concomitante concentração de creatinina no soro, uma melhor abordagem é a eGFR a partir da concentração de creatinina no soro, usando ou o *Cockcroft-Gault* ou o *modification of diet in renal disease* (MDRD) estudos de equações de estimativas. Para avaliar a severidade da DRC, a National Kidney Foundation (NKF) desenvolveu um critério, como parte de sua iniciativa *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (NKF KDOQI), estratificando os pacientes com DRC.⁽¹⁰⁾:

- Estadio 1: normal eGFR $\geq 90\text{mL/min per } 1,73\text{m}^2$ e albumina persistente;
- Estadio 2: eGFR entre 60 a 89mL/min per 1,73m²;
- Estadio 3: eGFR entre 30 a 59mL/min per 1,73m²;

- Estadio 4: eGFR entre 15 a 29mL/min per 1,73m²;
- Estadio 5: eGFR < 15mL/min per 1,73m² ou estagio terminal da doença renal.

Em 2009 o grupo de colaboração para epidemiologia em DRC elegeu a fórmula “CKD-EPI” Ritmo filtração glomerular estimado de creatinina (eGFRcr) como melhor fórmula. O uso desta fórmula é mais acurado para todos os níveis de taxa de filtração glomerular.^(11,12)

Nos últimos anos o envelhecimento tem sido muito considerado como um fator de risco para a DRC. Outros fatores de risco clinicamente relevantes devem ser considerados, como a presença de doenças cardiovasculares, hipertensão e diabetes mellitus. Além disso, a anemia e desordens minerais e ósseas são complicações da perda progressiva da função renal.⁽¹³⁾

Anemia é definida como uma redução de uma ou mais das principais medidas de células vermelhas do sangue, tais como: concentração de hemoglobina, hematócrito ou contagem das células vermelhas do sangue. A World Health Organization define anemia como um nível de hemoglobina abaixo de 13g/dL em homens e mulheres pós-menopausa e menos de 12g/dL em mulheres prémenopausa.⁽¹⁴⁾ A NKF define anemia como uma hemoglobina abaixo de 13,5g/dL em homens e 12g/dL em mulheres.⁽⁸⁾

A anemia da DRC é usualmente normocrômica e normocítica e sua prevalência é de 50% dos pacientes. Ainda que a anemia possa ser diagnosticada em qualquer estadio da DRC, existe uma grande correlação entre prevalência da anemia e severidade da DRC.

Um quarto dos pacientes em estadio 1 da DRC, metade dos pacientes em estadio 2, 3 e 4 e três quartos dos pacientes que iniciam a diálise, sofrem com anemia. Portanto, cuidados primários desempenham um papel importante no diagnóstico e gestão.^(15,16) A anemia na DRC pode resultar de múltiplos mecanismos (ferro, folato ou vitamina B12 deficiente; sangramento gastrointestinal; severo hiperparatireoidismo, inflamação sistêmica, e sobrevida das células vermelhas deficientes), o decréscimo da síntese de eritropoietina é o mais importante e específica causa etiológica da anemia associada com a DRC.

A eritropoietina é uma glicoproteína secretada pelos fibroblastos intersticiais do rim e é essencial para o crescimento e diferenciação das células vermelhas na medula óssea.⁽¹⁷⁾ Na DRC, a atrofia tubular gera fibrose túbulointersticial,

o que compromete a capacidade renal de síntese da eritropoietina resultando na anemia.⁽¹⁸⁾ A anemia da DRC é tratada com eritropoietina humana recombinante. Esta intervenção substitui a transfusão como suporte principal do tratamento e melhora a sobrevida de pacientes com anemia causada pela DRC.⁽¹⁹⁾

Outra complicação da DRC são as desordens minerais e ósseas que compreendem abnormalidades nos ossos e no metabolismo mineral e/ou calcificação extra-esqueleto secundário a fisiopatologia da DRC.^(20,21)

O rim é o local primário para a excreção de fosfato e da produção de 1- α -hidroxilase da vitamina D. Os pacientes com DRC desenvolvem hiperfosfatemia como resultado das cicatrizes parenquimatosas produzidas em resposta a DRC causando uma redução da excreção do fosfato renal. Esse fosfato não excretado estimula a produção de 1- α -hidroxilase da vitamina D que alteram os níveis séricos de fosfato e cálcio.

Esses dois processos provocam a redução dos níveis séricos de cálcio, resultando em um aumento da secreção do hormônio da paratireoide (PTH). Esse hormônio tem um efeito fosfatúrico e pode aumentar os níveis de cálcio aumentando a reabsorção óssea e promovendo a síntese pelo fígado de 1- α -hidroxilase da 25-hidroxivitamina D.

Os níveis crescentes de fósforo são quase universalmente observados em pacientes com DRC a partir do estágio 3 da doença. No entanto, o hiperparatireoidismo secundário, muitas vezes começa a distorcer a arquitetura óssea antes que o fósforo sérico seja anormal, indicando que a terapia com aglutinante de fosfato precisa ser iniciada quando a eGFR diminuir abaixo de 50mL/min per 1,73m².⁽¹⁸⁾

O principal objetivo do tratamento das desordens minerais e ósseas associadas à DRC é a redução dos níveis de fósforo.⁽²²⁾ Além dos aglutinantes de fosfato, várias outras classes de fármacos foram desenvolvidas para administrar as desordens minerais e ósseas associadas à DRC. Dada a diminuição da 1-hidroxilação da vitamina D pelo rim que não funciona mais, a vitamina D e seus compostos podem ser necessários para aumentar a concentração sérica de cálcio para suprimir a secreção do hormônio da paratireoide.⁽¹⁸⁾

O aumento do risco cardiovascular associado à DRC terminal, tem sido bem estabelecido e as taxas de mortalidade cardiovasculares estimadas são bem altas. Uma vez que o indivíduo atinge a fase terminal da DRC, a doença cardiovascular (DCV) é responsável pela metade das mortes. Esses indivíduos são vinte vezes mais

propensos a terem uma morte relacionada ao sistema cardiovascular.^(23,24) Além disso, fatores de risco não-tradicionais, específicos para pacientes com DRC, também contribuem para o fardo da DCV.⁽¹⁸⁾ Fatores de risco ateroscleróticos tradicionais estabelecidos, como diabetes, hipertensão, dislipidemia e idade avançada, foram considerados importantes para DCV na DRC.

Outros fatores como: hemodinâmicos e metabólicos, sobrecarga de volume, anemia, desequilíbrio de cálcio e fósforo e inflamação crônica, são características únicas da insuficiência renal que podem contribuir para o risco e patogênese da DCV. Em pacientes transplantados renais, fatores como fonte de doação, falha do enxerto e tipo de terapia imunossupressora podem desempenhar algum papel na DCV.⁽²⁴⁾

A hipertensão é um tradicional risco cardiovascular o qual contribui para o risco cardiovascular associado à DRC. A prevalência de hipertensão entre os pacientes com DRC relatada em estudos anteriores variou de 60 a 100%, dependendo da população estudada e da causa e nível de disfunção renal.⁽²⁵⁻²⁷⁾

O diabetes mellitus está associado a resultados adversos em todos os estágios da DRC, manifestada por albuminúria, diminuição do eGFR ou ambos e ocorre em até 40% dos pacientes com diabetes.⁽²⁸⁻³¹⁾

Neste cenário de múltiplas complicações decorrentes da perda de função renal, o transplante renal representa a melhor opção terapêutica uma vez que a anemia, o distúrbio ósseo, o manejo hidroeletrolítico e metabólico são alcançados nesta terapia. Porém, existe uma grande limitação devido: (I) ao desbalanço entre a demanda de órgãos e a escassez de doadores que leva a uma alta mortalidade na lista de espera, (II) à rejeição e (III) às complicações da terapia imunossupressora. Aproximadamente, 40% de receptores morrem ou perdem a função do rim transplantado dentro dos 10 anos após o transplante.

Apesar de décadas de melhoria na qualidade da terapia de reposição renal, as taxas de mortalidade e morbidade associadas à DRC terminal, permaneceram inalteradas. As terapias de reposição renal convencionais, como hemodiálise e diálise peritoneal, tem mudado dramaticamente o prognóstico da DRC terminal, não é a terapia de substituição completa, porque fornece apenas função de filtração e não substitui as funções hemostáticas, reguladoras, metabólicas e endócrinas do rim.⁽⁸⁾

As modalidades dialíticas tratam a sobrecarga de volume, uremia, acidose e distúrbios eletrolíticos, mas não tem efeito direto sobre a desregulação imune que frequentemente se associa a DRC.⁽⁹⁾

Dois trabalhos demonstraram que os níveis de citocinas pro-inflamatórias IL6 e IL8 no plasma de pacientes com doença renal, predizem a mortalidade desses pacientes.^(32,33) Portanto, dispositivos terapêuticos melhorados devem ser desenvolvidos com a capacidade de substituir uma gama ampla de funções do rim, assim, proporcionando uma redução na mortalidade, morbidade e no geral, atuando no impacto econômico que a DRC causa aos serviços públicos.⁽³⁴⁾

Pacientes portadores de DRC com estádios 3, 4 e 5 apresentam complicações sistêmicas da falência renal. Neste cenário destaca-se: (1) a ocorrência de hiperfosfatemia que leva ao hiperparatiroidismo secundário; (2) anemia por deficiência de eritropoietina; (3) Hipertensão secundária ao manejo deficiente de líquidos; (4) doença cardiovascular. Portanto, terapias que retardem a progressão da DRC são necessárias já para esses pacientes.

A injúria no glomérulo e capilar peritubular associada à combinação de defeituosa resposta ao reparo dos capilares, são importantes mecanismos na patogênese e progressão da DRC.⁽³³⁾

Após o insulto, essas células rapidamente perdem suas características epiteliais e passam a expressar um fenótipo mesenquimal. As células dediferenciadas migram para as regiões onde a necrose celular, a apoptose ou o desprendimento resultaram na desnudação da membrana tubular. Essas células proliferam e, eventualmente, rediferenciam em um fenótipo epitelial, completando o processo de reparação.⁽³⁴⁾

O rim tem a capacidade de se regenerar após insultos como isquemia/reperfusão ou lesões tóxicas. Entretanto, em alguns insultos o rim inicia o processo de transição epitelial-mesenquimal com consequente acúmulo de tecido fibrótico e perda da função.

Para uma compreensão aprofundada da fisiologia humana e para promover avanços na medicina e toxicologia, a disponibilidade de plataformas de engenharia capazes de reproduzir porções funcionais de órgãos vivos é um desafio.⁽³⁵⁾

Os recentes desenvolvimentos baseados na medicina regenerativa com o objetivo de reparar ou substituir órgãos ou tecidos cronicamente lesados podem levar a uma nova esperança para o tratamento renal.

As terapias regenerativas surgem como uma nova opção de terapia. O rim tem sido extensivamente investigado no aspecto da biologia celular de progenitoras, bio-desenvolvimento e engenharia de tecidos. As quatro maiores estratégias para a medicina regenerativa para os rins são as seguintes: identificação de fatores renotrópicos, identificação de células renais progenitoras em rins embrionários ou adultos, terapia celular e construção de rim artificial ou componentes renais.⁽³⁶⁾

Na concepção de um rim bioartificial para a substituição da função renal, características essenciais do tecido renal devem ser utilizadas para direcionar o projeto de engenharia de tecidos. Os elementos críticos da função renal devem ser substituídos, incluindo o excretor, o regulador de transporte à função endócrina. A unidade excretora funcional do rim é composta pela unidade de filtração, pelo glomérulo e pela unidade reguladora ou de transporte, o túbulo. Portanto um rim bioartificial requer duas unidades principais, o glomérulo e o túbulo, para substituir as funções excretória e metabólica do rim.^(37,38)

Embora esteja em um período inicial, a bioengenharia tecidual tem progredido de forma significativa no domínio da regeneração de tecidos através da utilização de matrizes tridimensionais biocompatíveis e biodegradáveis que servem como suporte estrutural e da utilização dos elementos celulares, fatores de proliferação e diferenciação celular que são os ingredientes fundamentais para essa estratégia.⁽³⁹⁻⁴¹⁾

Um dos grandes desafios no desenvolvimento de modelos de micro-engenharia é encontrar os aspectos apropriados do microambiente *in vivo* que podem ser imitados *in vitro* por engenharia. Numerosos estudos geométricos, mecânicos e de fatores bioquímicos, identificaram que linhagens celulares primárias, células-tronco e células cancerosas possuem um fenótipo mais realista.⁽⁴²⁻⁴⁸⁾

O crescimento de células-tronco em substratos de vários tipos de rigidez induz a diferenciação dessas células em diferentes linhagens.⁽⁴⁹⁾ Ou o crescimento de células endoteliais em matriz tridimensional induzindo a formação de túbulos ao invés de uma monocamada de células planas.⁽⁵⁰⁾ A submissão de células progenitoras hematopoiéticas a gradientes estáveis de citocina induz o retorno destas células a comportamentos artificiais da medula óssea.⁽⁵¹⁾

Tais exemplos ilustram a forte sinergia entre engenharia do ambiente de cultura e a capacidade de auto-organização das células. Até fatores simples como rigidez de um substrato pode induzir uma cascata de eventos auto-organizacionais em uma população de células que levam a um modelo mais realista.

A aplicação de uma terapia celular específica requer várias escolhas metodológicas importantes e também a solução de uma série de barreiras tecnológicas. A maior decisão inicial crítica é a obtenção de células. Para terapias baseadas em células, as células precisam ser expandidas em grandes quantidades, mantendo a uniformidade na atividade e sendo livres de patógenos.

As abordagens atuais para assegurar requisitos robustos de expansão e uniformidade de células são dependentes de células progenitoras ou células transformadas. O uso de células-tronco embrionárias humanas *versus* células-tronco adultas está sob rigoroso debate ético, com o atual ambiente político favorecendo processos utilizando células-tronco adultas.^(52,53)

Uma escolha entre células humanas autólogas ou não autólogas é também crítica na formulação de uma aplicação baseada em células. As células não autólogas devem superar os processos de rejeição imunológica do hospedeiro natural. Uma vez que a maioria das indicações impede a utilização de fármacos imunossupressores para acomodar o implante de células discordantes, a imunoproteção de células não autólogas foi abordada com técnicas de microencapsulação utilizando membranas sintéticas ultrafinas para impedir a entrada de anticorpos e células imunocompetentes do hospedeiro.

A implantação de microcápsulas celulares teve sucesso limitado devido a um mau desempenho funcional em longo prazo secundário à perda progressiva da viabilidade celular.⁽⁵⁴⁾

O uso de células autólogas, embora superando a barreira imunológica, tem seu próprio conjunto de problemas. As abordagens autólogas requerem a obtenção de células do próprio paciente, expandindo-as *in vitro* em grandes quantidades ao longo de várias semanas e por último, reintroduzir as células de uma forma específica no local desejado. Assim, cada tratamento será individualizado e apresentará obstáculos regulatórios substanciais, incluindo a manutenção da qualidade uniforme das células, a prevenção de patógenos introduzidos durante o processamento celular e a possibilidade de regeneração após o implante.⁽⁵⁵⁾

Apesar da terapia baseada em células possuir barreiras tecnológicas, regulatórias e etiológicas substanciais, o potencial para desenvolver tratamentos inovadores para um grande número de desordens clínicas, incluindo doenças renais agudas e crônicas, tem se expandido rapidamente.

Outro importante avanço é a descelularização de matrizes extracelulares (EMC) específicas de órgãos e a capacidade de posicionar precisamente células e matérias por tecnologias de *bioprinting* 3D tem sido vistas como duas das mais promissoras abordagens para bioengenharia de órgãos.

A descelularização de órgãos inteiros abriu novas perspectivas para a engenharia de tecidos e muitos laboratórios tem relatado a geração de *scaffolds* renais de roedores, porcos, macacos e humanos.^(56,57) Uma variedade de protocolos de descelularização tem sido descritos e revistos, onde geralmente envolvem a perfusão de detergentes, enzimas ou outro tipo de soluções que lisam as células através da vasculatura do órgão para remover os componentes celulares enquanto preserva a arquitetura 3D e a composição bioquímica da EMC nativa.⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾

É de conhecimento geral que todos os protocolos de descelularização devem ser avaliados objetivamente de acordo com os seguintes critérios: (I) preservação dos componentes e fatores da EMC que atuam as células; (II) evitando respostas adversas do hospedeiro ao *scaffold*, que são normalmente desencadeadas por detritos celulares do tecido de origem.⁽⁶¹⁾

Após a descelularização, *scaffolds* renais demonstraram preservar a arquitetura da rede glomerular e tubular e a rede vascular.

Alguns estudos revelaram um papel essencial da EMC renal na modulação do comportamento celular. Células-tronco embrionárias semeadas em EMC de rim descelularizado, de macaco *rhesus*, formaram túbulos e expressaram uma bateria de marcadores relacionados com os rins, e esses achados não foram observados quando foram utilizadas EMCs pulmonares, indicando um certo grau de função da EMC renal específica.⁽⁶²⁾

Além disso, em um estudo recente, *scaffolds* acelulares de rins de roedores foram enxertados em rins de rato parcialmente nefrectomizados mostrando algum recrescimento da área excisada após 4 semanas de transplante. Curiosamente, a análise microscópica mostrou a migração de células *nestin* positivas do rim lesado para o andaime descelularizado enxertado, indicando que *scaffolds* acelulares de rins intactos tinham sinais bioativos. No entanto, não houve recuperação renal significativa.⁽⁶³⁾

Em geral, estes trabalhos apoiam a ideia de que a EMC renal retém sinais bioquímicos e biofísicos específicos de receptores renais que são capazes de modular a proliferação e diferenciação celular. Embora os mecanismos subjacentes estejam mal compreendidos, estas descobertas sugerem que os *scaffolds* de EMC de

órgãos derivados por descellularização seriam um sistema ideal para proporcionar às células o micro-ambiente apropriado para a produção do funcionamento renal.

Com base nessas descrições sobre a importância da Medicina Regenerativa no campo das Nefropatias, abre-se perspectiva de que as EMCs renais com suas proteínas características e suas propriedades biomecânicas possam ser utilizadas como plataformas de suporte para receber implantes de estruturas celulares, as quais serão repovoadas com células renais num processo de cultura biomimética *in vitro*. Esse sistema tem o potencial para gerar finalmente enxertos renais funcionais.

Esse estudo tem como objetivo validar uso de células humanas renais extraídas de rins descartados do transplante renal, demonstrando sua viabilidade e preservação de fenótipo e validar métodos de descellularização de rins porcos para uso com matriz de crescimento das células renais humanas.

1.1 Objetivos

1. Obter e Caracterizar células renais humanas adultas;
2. Avaliar a existência de fatores clínico-laboratoriais que determinem a viabilidade das culturas primárias renais e no crescimento de tipos celulares específicos;
3. Descellularizar rins porcos, caracterizando a matriz extracelular.

2 MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras de rins humanos

As amostras de 20 diferentes doadores de órgãos não utilizados para transplante foram coletadas do Hospital do Rim – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, de doadores falecidos seguindo o protocolo de coleta de amostras humanas elaborado pelo nosso grupo e aprovado pelo Comitê de Ética da Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein, São Paulo – número do CAAE 46672315.7.0000.0071.

Cada fragmento de rim coletado na proporção de 5cm³ foi colocado em placa de Pertri e a cápsula renal e o tecido conjuntivo adjacente foram retirados para evitar contaminação celular. As amostras renais resultantes (córtex e medula) foram repicadas e maceradas até chegarem a um aspecto gelatinoso. Em seguida foram adicionados 25mL de tampão fosfato-salino (PBS, Gibco) e o conteúdo da placa foi transferido para um tubo cônico de 50mL. Foram acrescentados no tubo cônico 150µL de enzima para digestão celular (Liberase, Roche) e mantida em agitação a 40RPM a 37°C por 40 minutos. Ao final deste período foram adicionados 25mL de meio de cultura (DEMEM; Gibco e KSFM; Gibco) para inativação da enzima. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e filtrado (Filtro BD Falcon). Os resíduos foram descartados e a solução filtrada foi centrifugada a 1500RPM a 5°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 2mL de meio de cultura DEMEM + KSFM e transferido para garrafas de cultura de células de 75cm³, na proporção de 1mL por garrafa mais 14mL de meio de cultura DEMEM + KSFM.

2.2 Cultura de células renais adultas

As células renais humanas adultas obtidas através da fragmentação das amostras dos diferentes doadores de órgãos foram cultivadas em meio apropriado para células renais, DEMEM + KSFM.

O processo de cultivo celular seguiu o protocolo de crescimento celular até atingirem confluência de 90% com trocas periódicas do meio de cultura

durante sete dias, onde então essas células foram congeladas em nitrogênio líquido, seguindo protocolo de congelamento, em frascos contendo 10^6 células/mL.

2.3 Caracterização das células renais adultas

As células renais adultas foram caracterizadas através do processo de citometria de fluxo (Citômetro BD Fortessa).

As células foram tripsinizadas, transferidas para tubos de citometria na proporção de 10^6 células/mL, lavadas três vezes com PBS, centrifugadas a 2000RPM a 4°C por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1mL de tampão de fixação/permeabilização contendo Paraformaldeído (BD Cytofix/Cytoperm) em cada tubo de citometria. As amostras foram incubadas a 4°C por 20 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados anticorpos primários para túbulo proximal, túbulo distal, ducto coletor, fibroblasto produtor de eritropoietina e para células progenitoras na concentração $1\mu\text{g/mL}$ e acrescido dos anticorpos secundários (fluorocromos, Zenon, Antibody Labeling Kits) na concentração de $3\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1). As amostras foram incubadas a 4°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Logo após esse período as amostras foram lavadas três vezes com 2mL de tampão contendo saponina (BD Perm/Wash buffer). Após a lavagem, as amostras foram ressuspensas em $300\mu\text{L}$ de solução tamponante e adquiridas através do processo de citometria de fluxo.

Tabela 1. Distribuição dos anticorpos e fluorocromos para os ensaios de citometria

Anticorpos	Células	Fluorocromo
THP	Túbulo distal e Ducto Coletor	Alexa Fluor 488 (Rabbit)
EMA	Túbulo distal	APC (Mouse)
EPO	Fibroblasto	Alexa Fluor 488 (Rabbit)*
Oct4	Célula progenitora	Alexa Fluor 647 (Goat)*
CD24	Célula progenitora	APC (Mouse)
CD44	Célula progenitora	Alexa Fluor 488 (Rabbit)
NEP	Túbulo proximal	Alexa Fluor 488 (Rabbit)
CD73	Fibroblasto	APC (Mouse)

*Anticorpos para marcação intracelular.

2.4 Obtenção dos rins porcinos

Todos os animais utilizados no projeto seguiram o protocolo de emprego de animais em pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética da Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein, São Paulo especificamente elaborado para o Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC) da Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein.

Os rins porcinos foram obtidos de animais providos da Granja RG – Suzano, SP; eram da raça Large White, do sexo feminino e masculino, média de idade de 4 a 5 meses, peso médio de 40 a 60kg. Os animais estavam em anestesia profunda para o procedimento de treinamento em saúde e após o procedimento principal os rins foram retirados seguindo o protocolo de remoção de órgãos elaborado pelo Comitê de Ética para o CETEC. Após a retirada dos rins os animais foram eutanaziados com overdose anestésica e KCL no final. Os rins porcinos foram congelados à -80°C.

Seguindo o protocolo de extração de órgãos de animais para pesquisa, todos os animais receberam medicação pré-anestésica com a droga Ketamina (cloridrato de cetamina) na dose de 10mg/kg associada com Dormonid (Maleato de Midazolan) na dose de 0,2mg/kg com aplicação intramuscular profunda na região do glúteo. Após 5 minutos, o animal é lavado com ducha de água para retirar a sujeira do corpo em seguida pesado e encaminhado para o centro cirúrgico. A veia periférica foi puncionada com jelco número 22 e a indução com Propofol na dose de 6 a 8mg/kg. O animal foi intubado com sonda orotraqueal número 6,5 e mantido em Isoflurane 2,0% e oxigênio de 1,5L, o volume corrente foi de 8mL/kg/h.

Os oxímetros foram colocados no animal para a sua monitorização durante todo o procedimento. Cada animal recebeu um prontuário para a coleta de dados durante a cirurgia.

Para o procedimento de eutanásia, como os animais na fase final chegam a pesar até 110kg, foi aplicado 1g de Thionembutal e aumento da porcentagem de Isoflurano de 2 para 5%. Após esse procedimento, os animais foram congelados para posterior incineração pela Prefeitura de São Paulo.

2.5 Descelularização

Para a obtenção de uma matriz acelular construímos um sistema de descelularização de alto rendimento para que os resultados fossem reprodutíveis no futuro (Figura 1). Este biorreator customizado foi ligado através de cateteres na artéria e veia dos rins porcinos e as mangueiras foram ligadas a dois galões de 20L, um para comportar as soluções de lavagem e outro para descarte dessas soluções.

Inicialmente o rim porcino foi descongelado à -20°C por 24 horas e depois colocado à 4°C por 12 horas. Após esse período de descongelamento o rim foi perfundido com solução salina por 5 minutos para verificar a viabilidade dos cateteres introduzidos na veia e artéria renal. A próxima etapa foi constituída por perfusão de solução de detergente iônico, dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% com perfusão contínua durante 24 horas para promover a total remoção celular. O órgão foi continuamente observado para acompanhar o clareamento que indicou a distribuição uniforme da perfusão confirmando o processo de descelularização. Concluído o período de descelularização com SDS, o rim porcino, foi reperfundido com Água Milli-Q por mais 24 horas até que o desaparecimento da espuma indicasse a total remoção do detergente.

O rim foi reperfundido utilizando PBS por mais 3 horas a fim de promover a osmolaridade do órgão.

Após a finalização da perfusão com PBS, os rins foram colocados em formol 10% e encaminhados para histologia.



Figura 1. Biorreator e bomba de perfusão

2.6 Análise da descelularização

Córtex e a medula da EMC dos rins porcinos descelularizados e de rins nativos, foram fixados em formalina 4:1, para preservação de suas estruturas, e analisados por histologia.

A EMC e rim controle foram parafinizados em cubos. Os blocos de parafina contendo a EMC e rim controle foram cortados em 2 μ m e posteriormente desparafinizados e corados com Hematoxilina e Eosina, Sirius Red e Tricrômico de Masson, para avaliar a total remoção das células e preservação da arquitetura da matriz. As colorações foram realizadas tanto na EMC quanto no rim controle. As amostras foram observadas e comparadas no microscópio óptico.

Como método de validação do processo de descelularização e demonstração da preservação da matriz realizaram-se ensaios de imunohistoquímica. Cortes de 3 μ m dos blocos de parafina foram colocados em lâminas silanizadas e desparafinizados, bloqueados e marcados com os anticorpos primários específicos para fibronectina (abcam, Anti-Fibronectin antibody ab23751) e colágeno tipo IV (abcam, Anti-

Collagen IV antibody ab6586) na titulação de 1/500 e 1/200 respectivamente, e após o tempo de incubação as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário e solução cromogênica DAB específica para imunohistoquímica e então analisados em microscopia.

2.7 Análise estatística da caracterização das células renais adultas

As análises foram realizadas pelo programa SPSS na versão 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Os dados dos doadores de órgãos que foram analisados para correlacionar com o sucesso do crescimento da cultura de células foram: índice de massa corpórea (IMC), idade, sexo, causa do óbito, creatinina inicial e final, uso de drogas vasoativas, diurese, parada cardiorrespiratória, hipertensão arterial sistêmica, Diabetes Mellitus, peso, uso de drogas e o tempo entre a data do clampeamento e data do início da cultura.

As variáveis quantitativas como idade, peso e índice de massa corpórea foram descritos por médias e desvios padrões. Medidas como: creatinina, diurese, tempo entre clampeamento e cultura e luminescência apresentaram assimetria na distribuição amostral dos dados e foram expressas como mediana e quartis, além dos valores mínimos e máximos.

A investigação dos fatores possivelmente associados ao descarte da cultura foi feita por meio de modelos de regressão logística simples, com resultados apresentados por razões de chance, intervalos de confiança de 95% e valores de p para os testes de igualdade das razões de chances a um.

Dentre as culturas não descartadas, foi investigada a relação entre luminescência e variáveis do doador, além de tempo entre clampeamento e cultura. Comparações entre grupos foram realizadas pelo teste não paramétrico de Mann Whitney e relações entre variáveis quantitativas foram investigadas por meio de coeficientes de correlação de Spearman.

3 RESULTADOS

3.1 Células renais humanas adultas: análise estatística

As células renais adultas foram extraídas por método digestivo de rins descartados para transplante renal do Hospital do Rim – UNIFESP. Foram coletadas vinte amostras, das quais cinco tiveram cultura descartada. Dos quinze doadores que tiveram suas culturas de células congeladas, apenas doze doadores tiveram suas células recultivadas e analisadas pela citometria de fluxo; os outros três doadores não tiveram crescimento celular após descongelamento.

A média de idade dos doadores foi de 53 (14) anos, IMC de 26 (3) e tempo entre clampeamento e início da cultura de células 34,7 (31,3 – 51,8) horas.

Não foi observada associação significativa entre as variáveis investigadas e o não crescimento da cultura de células, mas há indícios de que a chance do não crescimento da cultura de células seja maior entre homens [Razão de chance (RC): 3,5], entre doadores que tiveram parada cardiorrespiratória (RC: 6,5), que eram portadores de hipertensão arterial sistêmica (RC: 6,0) e com valores maiores de tempo entre clampeamento e cultura, de creatinina inicial e diurese (Tabela 2).

Tabela 2. Fatores investigados quanto à associação com falência da cultura

Características do doador	Razão de chances (IC 95%)	Valor-p
Idade (anos)	0,98 (0,91 a 1,05)	0,510
Sexo (masculino)	3,50 (0,31 a 39,15)	0,309
Teve parada cardiorrespiratória (sim)	6,50 (0,55 a 76,18)	0,136
Hipertensão arterial sistêmica (sim)	6,00 (0,49 a 73,45)	0,161
Creatinina inicial	2,24 (0,69 a 7,25)	0,180
Creatinina final	0,94 (0,51 a 1,72)	0,835
Diurese	1,05 (0,45 a 2,46)	0,902
Tempo entre clampeamento e cultura (horas)	1,01 (0,98 a 1,03)	0,658

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Na análise da citometria de fluxo todos os tipos celulares investigados foram encontrados.

Entre os resultados da citometria de fluxo, foi observada evidência de associação entre as medidas e gênero, sendo as proporções positivas para EMA + THP

e EPO + Oct4 maiores entre homens e proporções positivas para NEP + CD73 maiores para mulheres.

O uso de drogas vasoativas apresenta associação com as quatro proporções de positivos consideradas para todos os tipos celulares.

A ocorrência de parada cardiorrespiratória apresenta associação com a proporção de positivos para EPO + Oct4.

Há evidências de associação entre a presença de hipertensão arterial sistêmica e as proporções positivas para EMA + THP, EPO + Oct4 e NEP + CD73, sendo os valores maiores entre os casos positivos para hipertensão arterial sistêmica (Tabela 3).

Não foram observadas evidências de associação entre as medidas de citometria e as demais mensurações como: idade, creatinina inicial e final, diurese, IMC ou tempo entre clampeamento e início da cultura.

Tabela 3. Comparação das medidas de citometria de fluxo entre grupos

Características do doador	Medida de luz da citometria - positivo			
	EMA + THP (%)	EPO + Oct4 (%)	CD24+ CD44 (%)	NEP + CD73 (%)
Sexo				
Feminino (6)	2,0 (1,0 - 7,3)	83,7 (71,9 - 95,9)	18,7 (2,0 - 31,2)	0,9 (0,6 - 2,0)
Masculino (6)	18,7 (3,5 - 24,2)	95,9 (74,1 - 99,1)	16,3 (1,0 - 46,3)	0,8 (0,6 - 1,0)
Valor-p*	0,024	0,022	0,060	0,019
Uso droga vasoativa				
Sim (8)	10,9 (2,0 - 24,7)	95,0 (82,3 - 99,1)	31,1 (4,3 - 38,9)	0,8 (0,7 - 1,5)
Não (4)	4,7 (1,5 - 13,2)	73,7 (72,2 - 86,7)	1,1 (0,8 - 21,1)	0,8 (0,6 - 1,5)
Valor-p*	0,046	0,028	0,034	0,016
Parada cardiorrespiratória				
Sim (2)	2,5 (2,1 - 2,8)	71,5 (71,1 - 71,9)	16,2 (1,1 - 31,2)	1,0 (0,9 - 1,0)
Não (10)	12,8 (1,2 - 24,2)	95,0 (74,1 - 99,1)	18,7 (1,0 - 41,1)	0,8 (0,6 - 2,0)
Valor-p*	0,061	0,030	0,076	0,091
HAS				
Sim (3)	24,2 (18,3 - 25,1)	99,1 (92,7 - 99,1)	46,3 (0,5 - 83,7)	0,8 (0,7 - 2,0)
Não (9)	2,8 (1,2 - 7,3)	74,1 (71,9 - 95,9)	6,5 (1,1 - 31,2)	0,8 (0,6 - 1,0)
Valor-p*	0,018	0,014	0,055	0,036
DM				
Sim (1)	1,0 (1,0 - 1,0)	95,9 (95,9 - 95,9)	6,5 (6,5 - 6,5)	0,8 (0,8 - 0,8)
Não (11)	7,3 (2,1 - 24,2)	92,7 (71,9 - 99,1)	30,9 (1,0 - 41,1)	0,8 (0,6 - 2,0)
Valor-p*	0,083	0,083	0,083	0,167
Uso drogas				
Não (8)	5,1 (1,7 - 21,3)	83,0 (71,5 - 99,1)	16,6 (0,9 - 43,7)	0,9 (0,7 - 1,5)

continua...

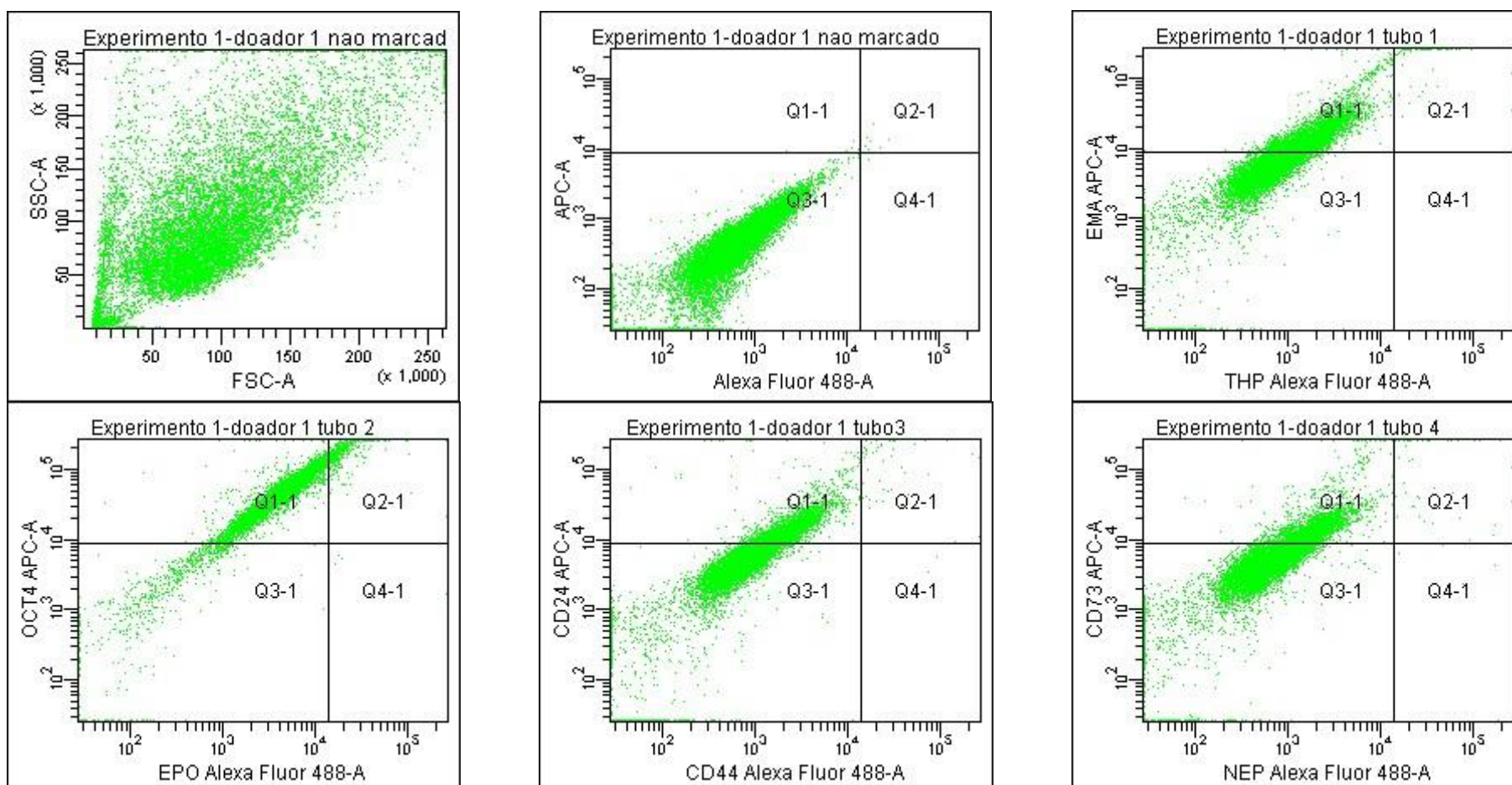
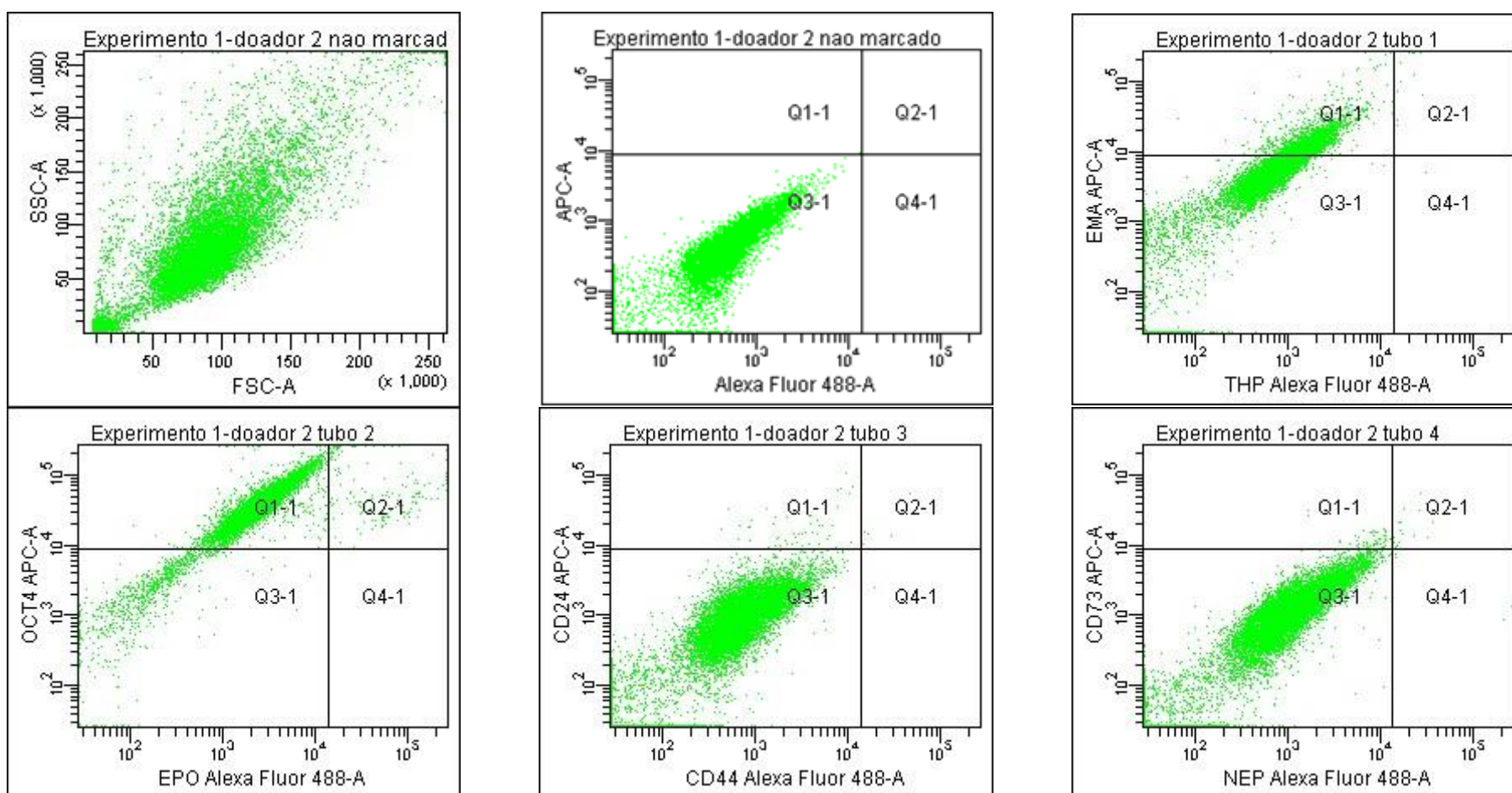
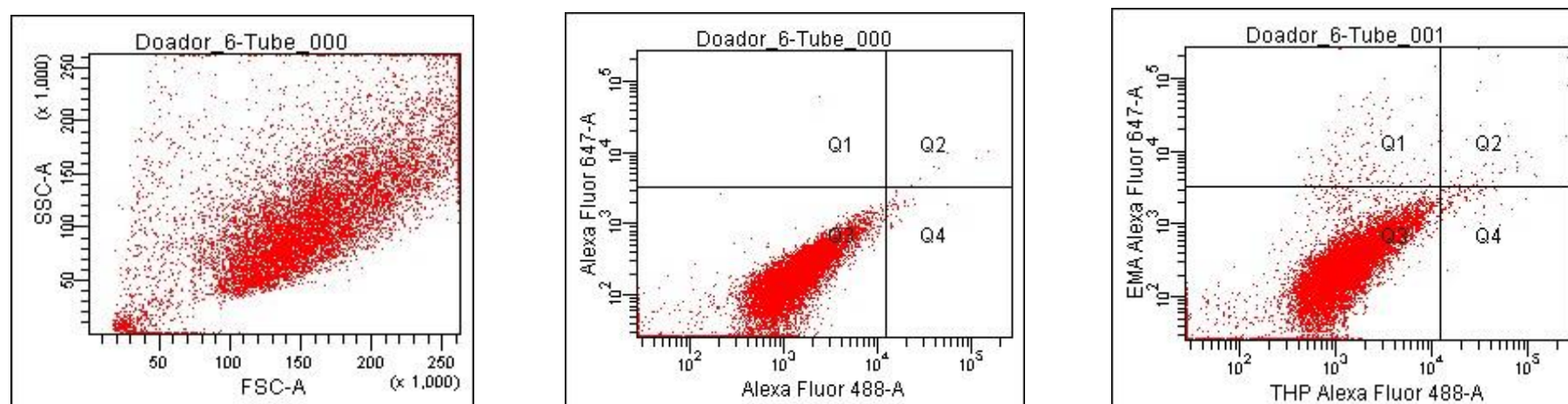
...continuação

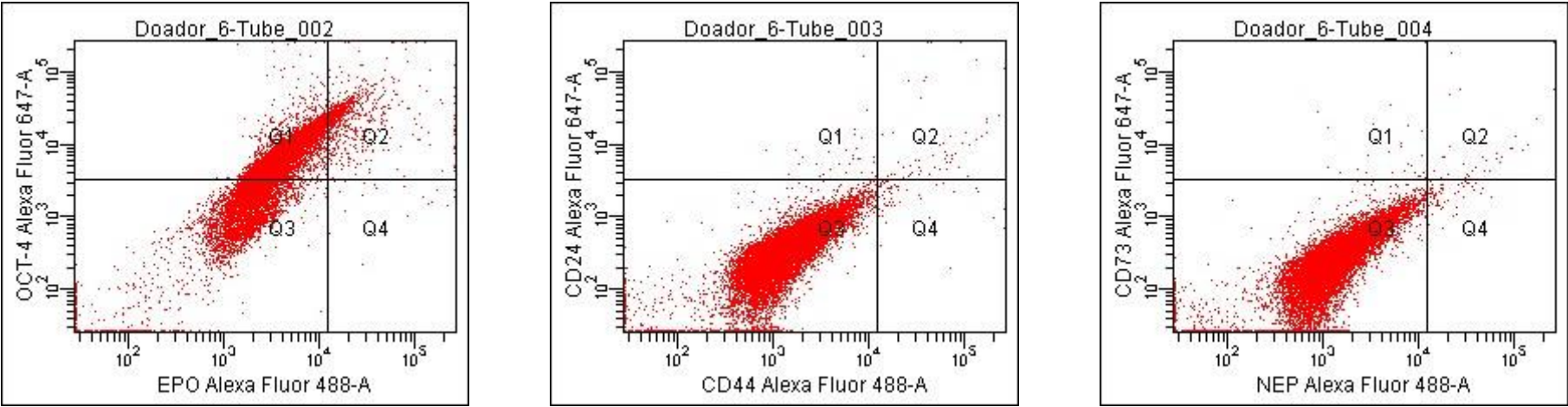
Cocaína (1)	37,5 (37,5 - 37,5)	94,0 (94,0 - 94,0)	30,9 (30,9 - 30,9)	26,7 (26,7 - 26,7)
Tabagismo (2)	2,3 (1,0 - 3,5)	97,5 (95,9 - 99,0)	19,0 (6,5 - 31,5)	0,7 (0,5 - 0,8)
Tabagismo + Etilismo (1)	19,1 (19,1 - 19,1)	74,1 (74,1 - 74,1)	1,0 (1,0 - 1,0)	0,6 (0,6 - 0,6)

* Comparações realizadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores entre parênteses após as categorias correspondem ao número de casos válidos.

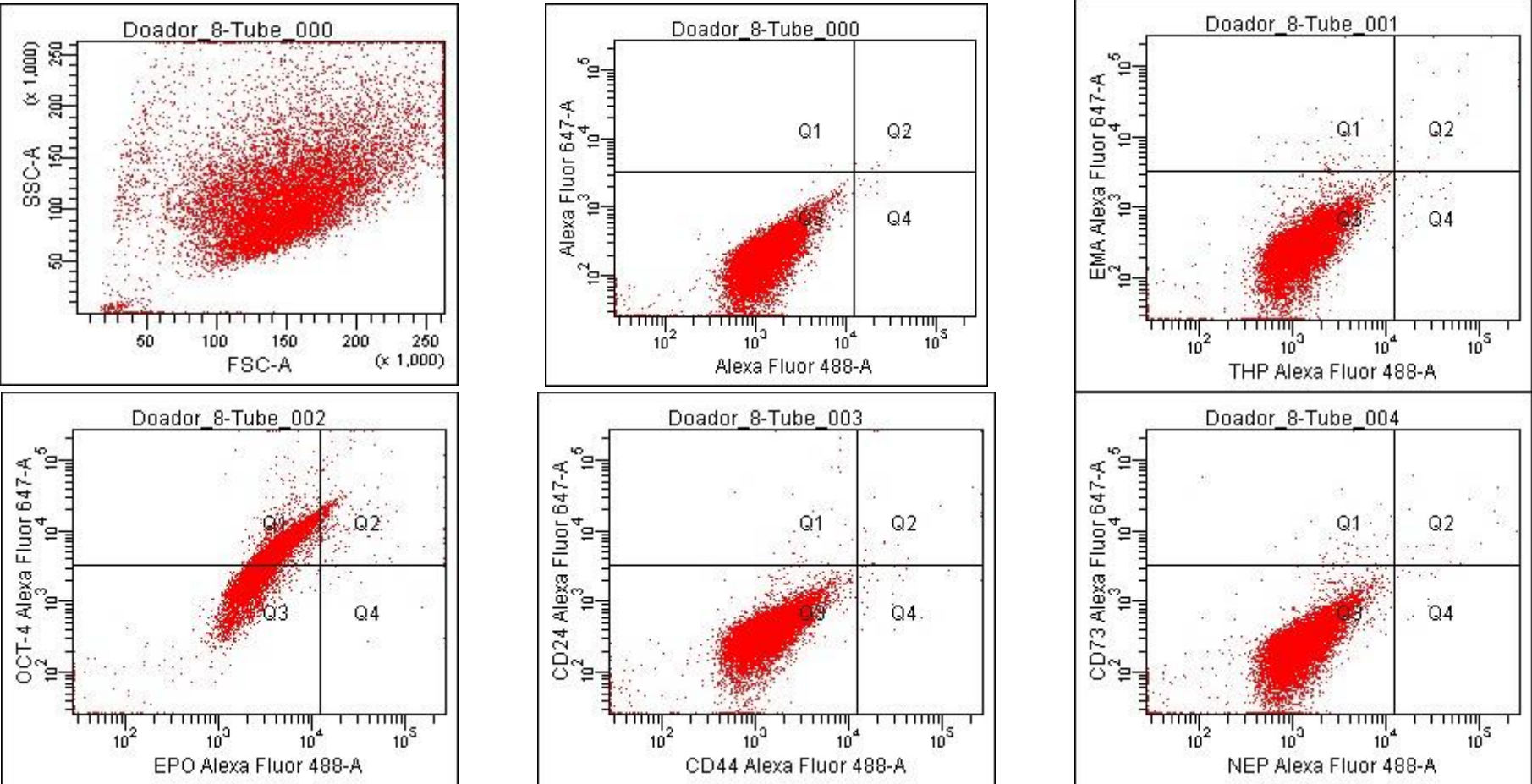
3.2 Células renais humanas adultas: citometria de fluxo

A análise da citometria de fluxo foi realizada no aparelho BD Fortessa e foram obtidos os seguintes resultados, demonstrando positividade de todos os achados específicos.

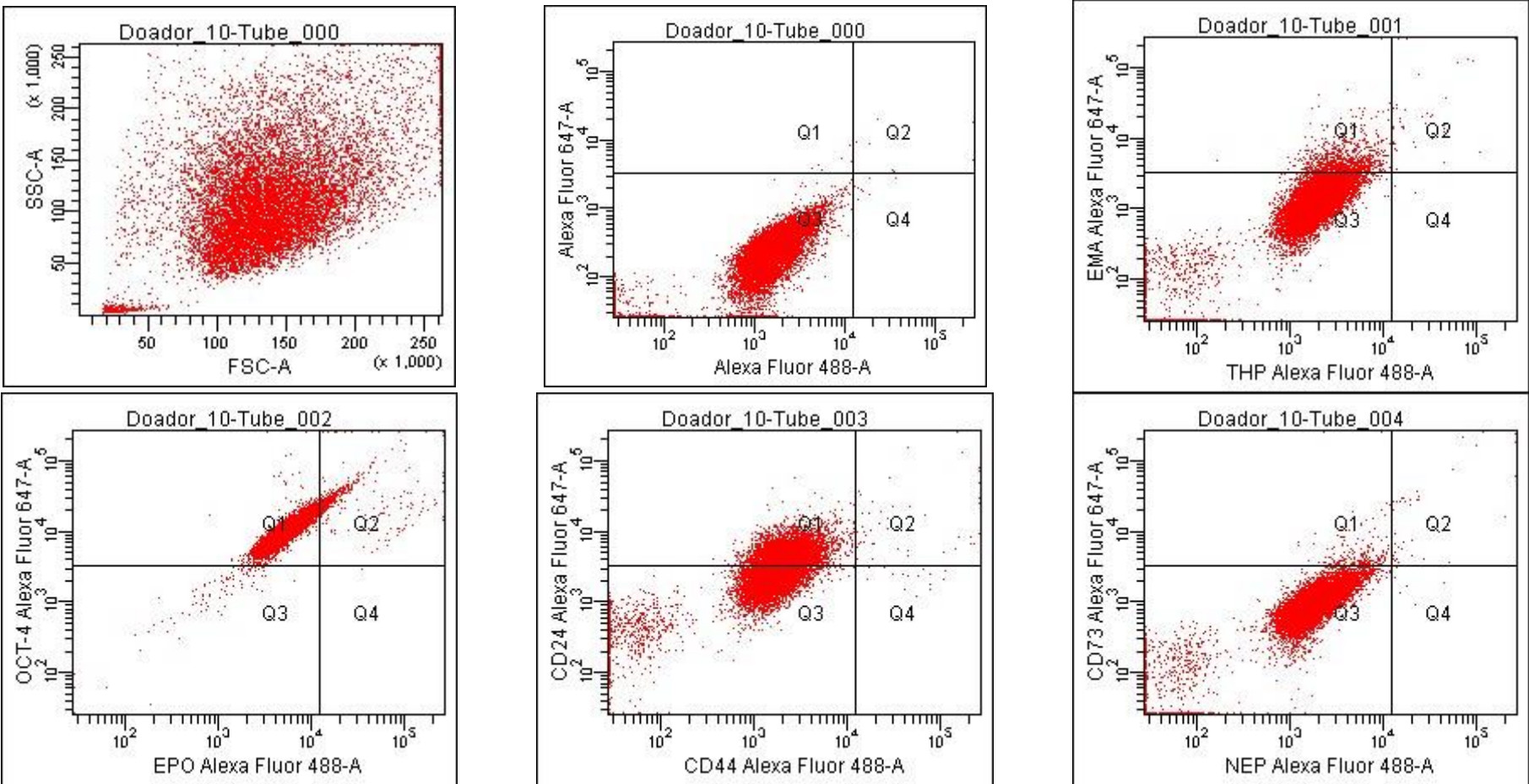
Doador 1**Doador 2****Doador 6**



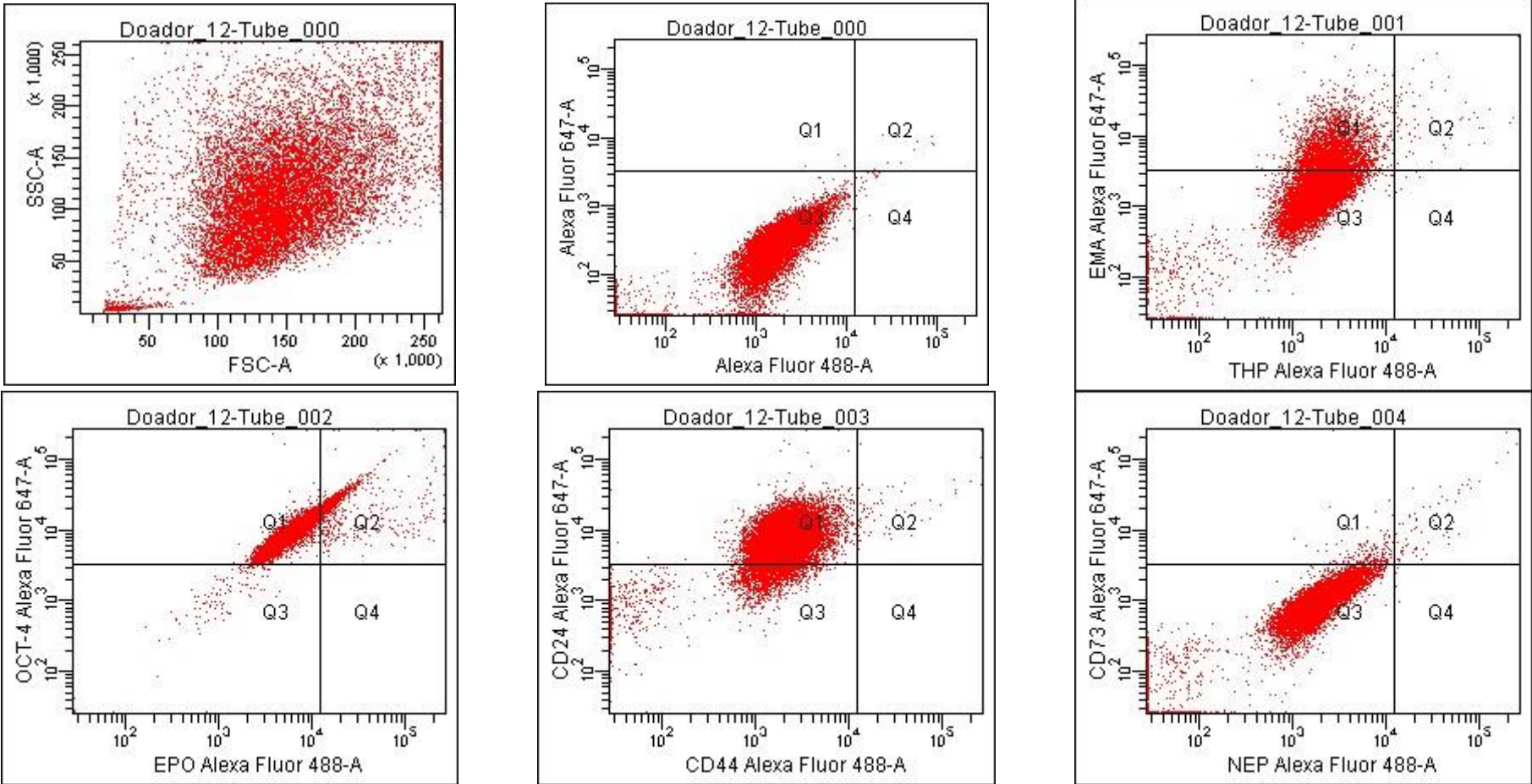
Doador 8



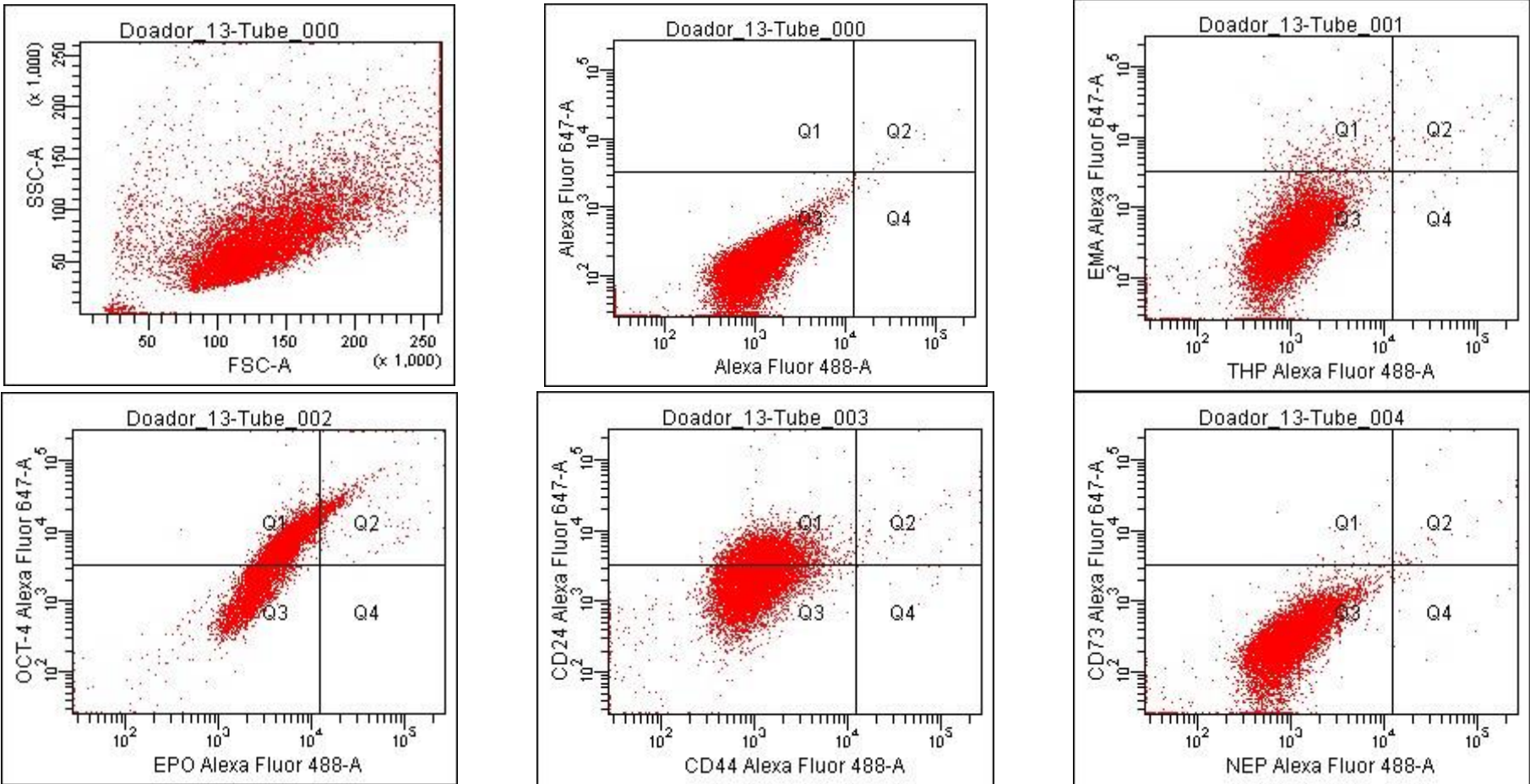
Doador 10



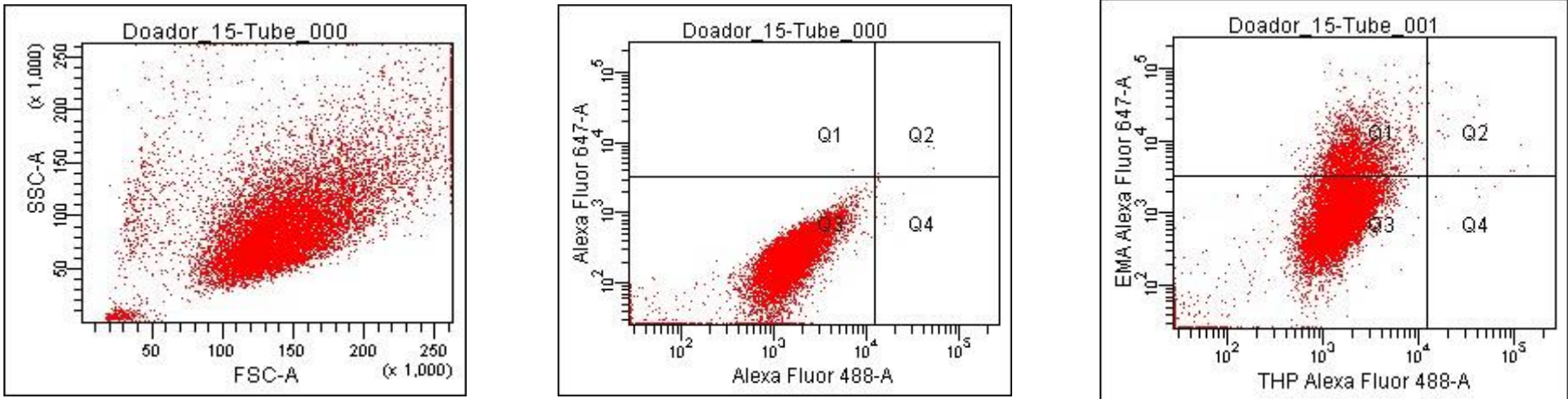
Doador 12

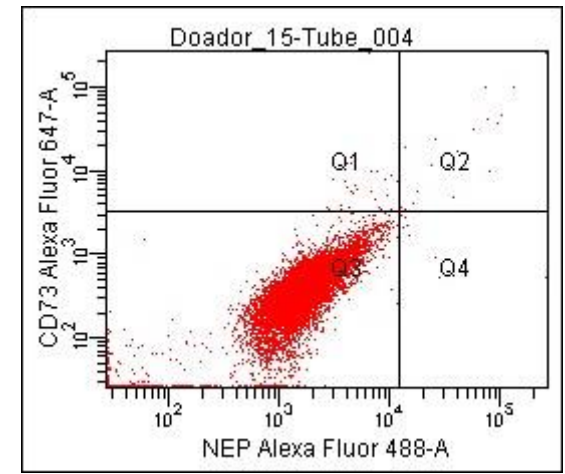
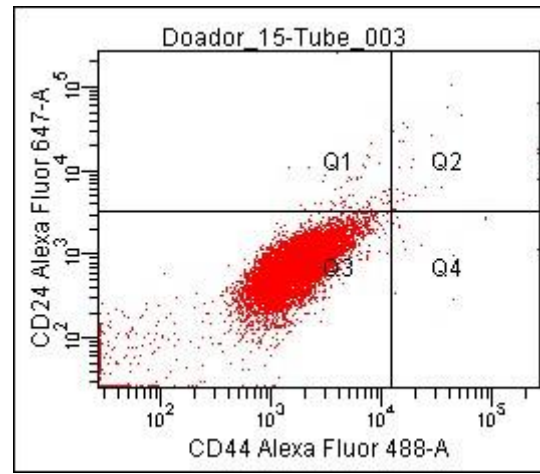
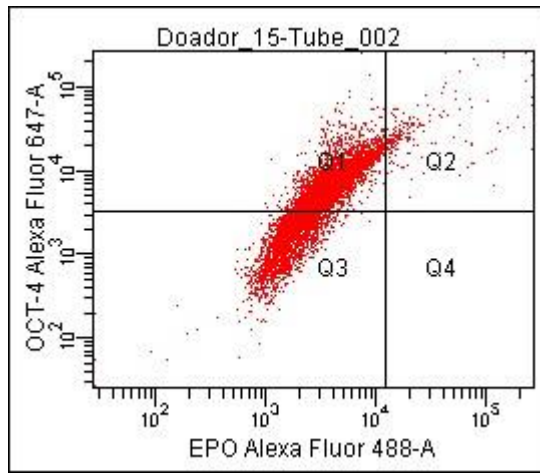


Doador 13

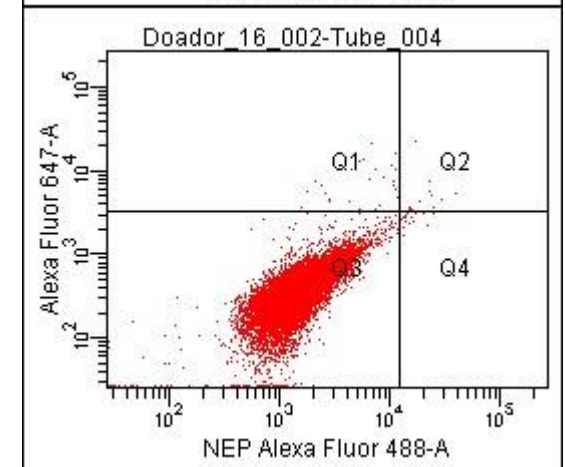
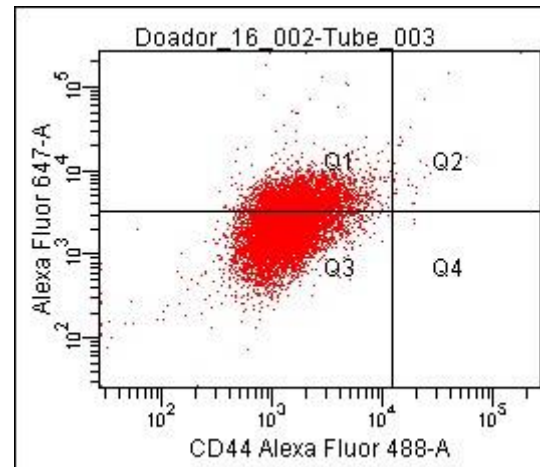
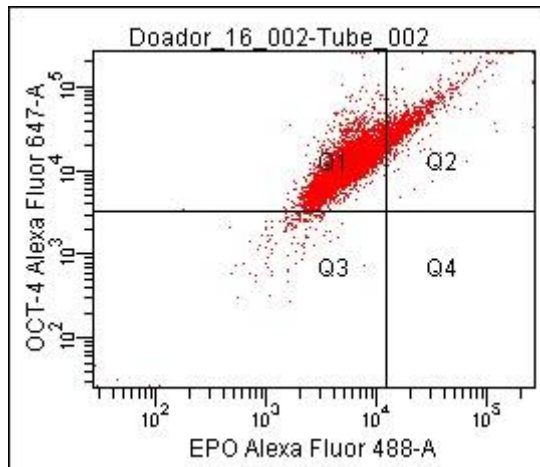
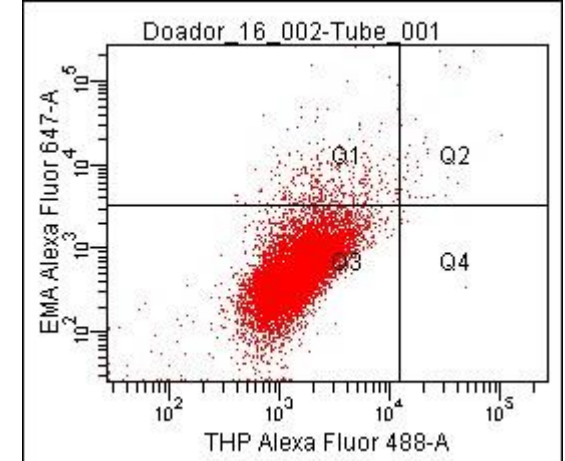
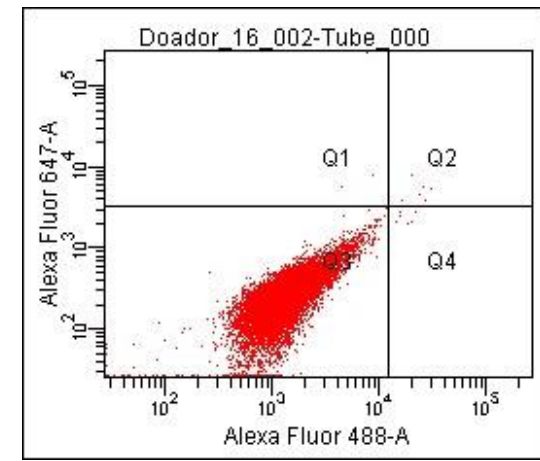
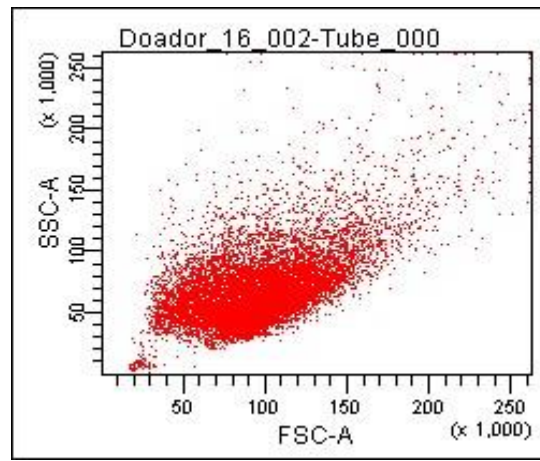


Doador 15

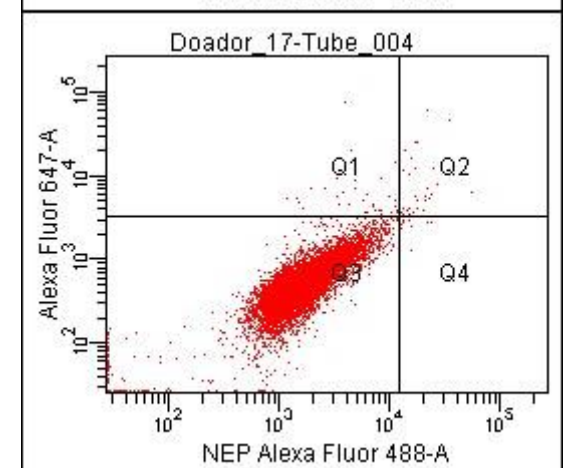
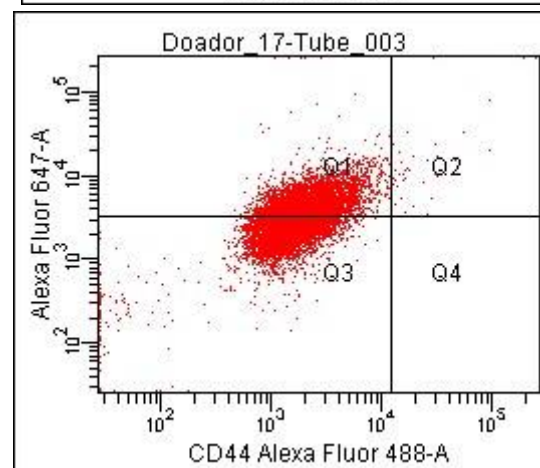
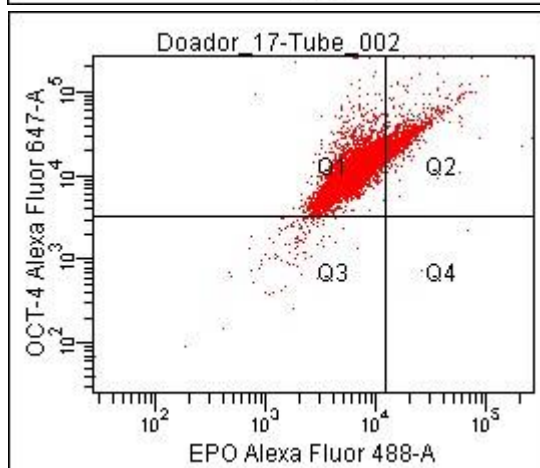
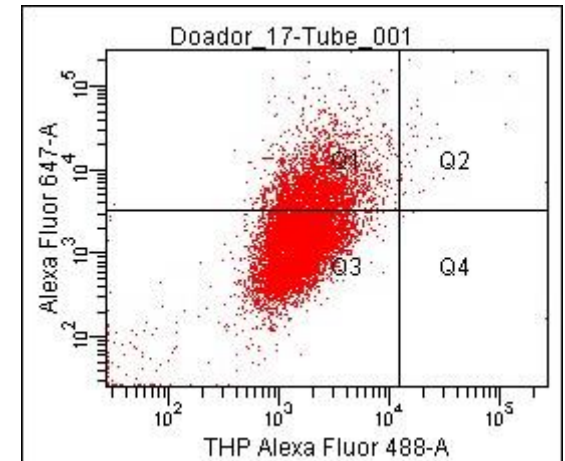
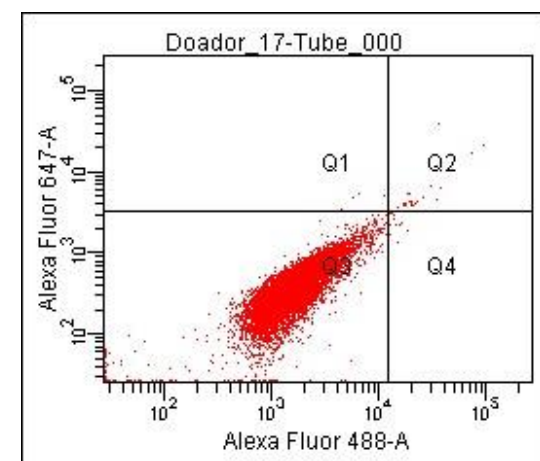
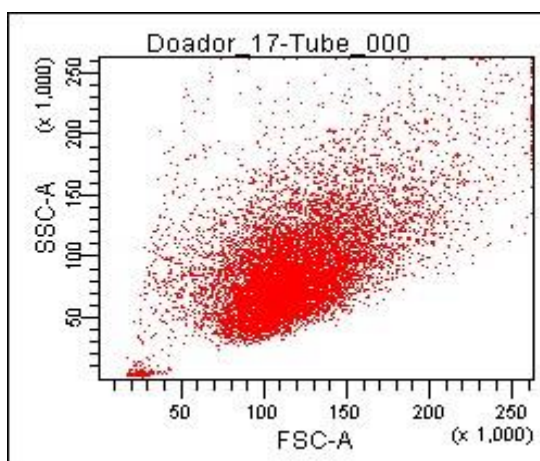




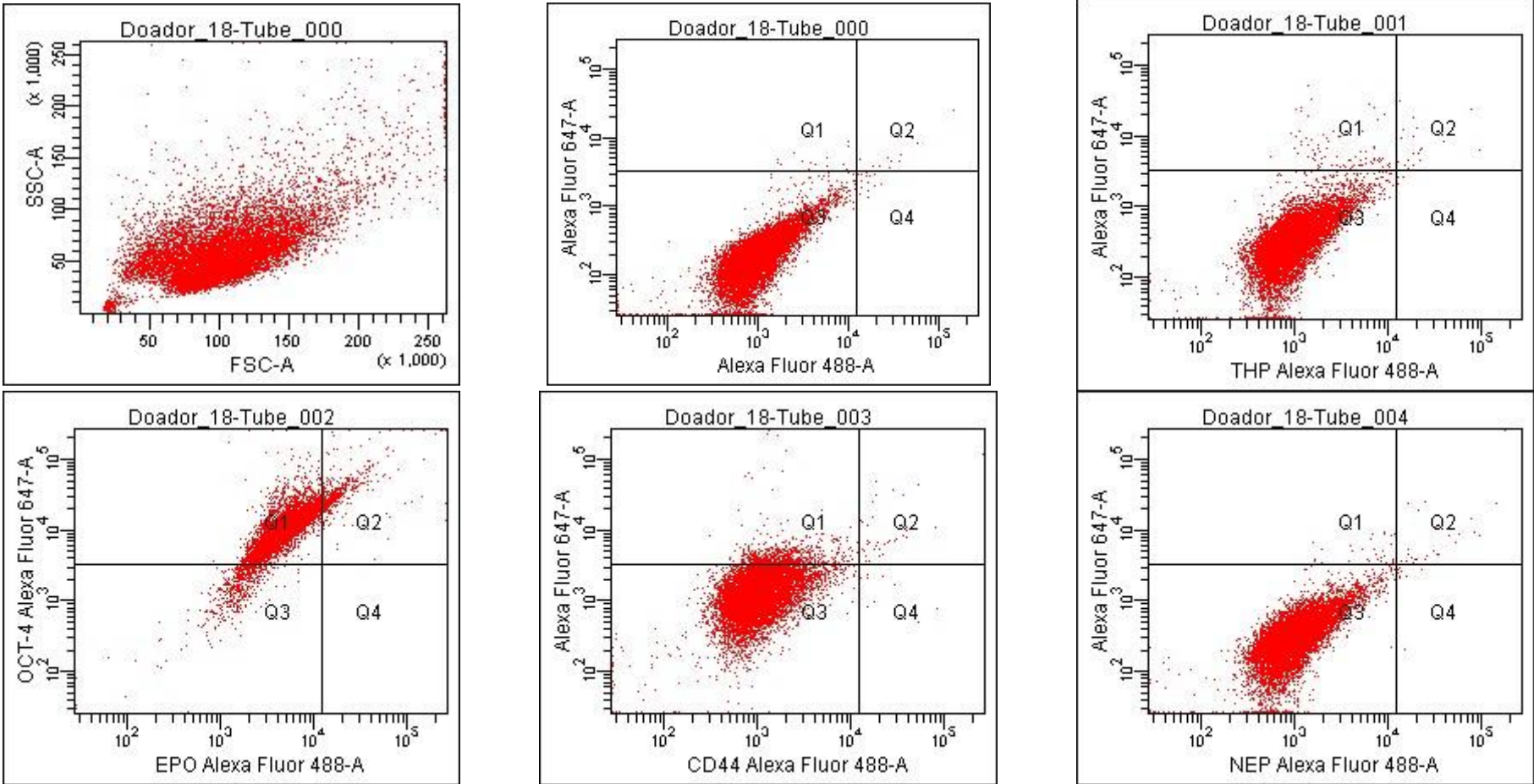
Doador 16



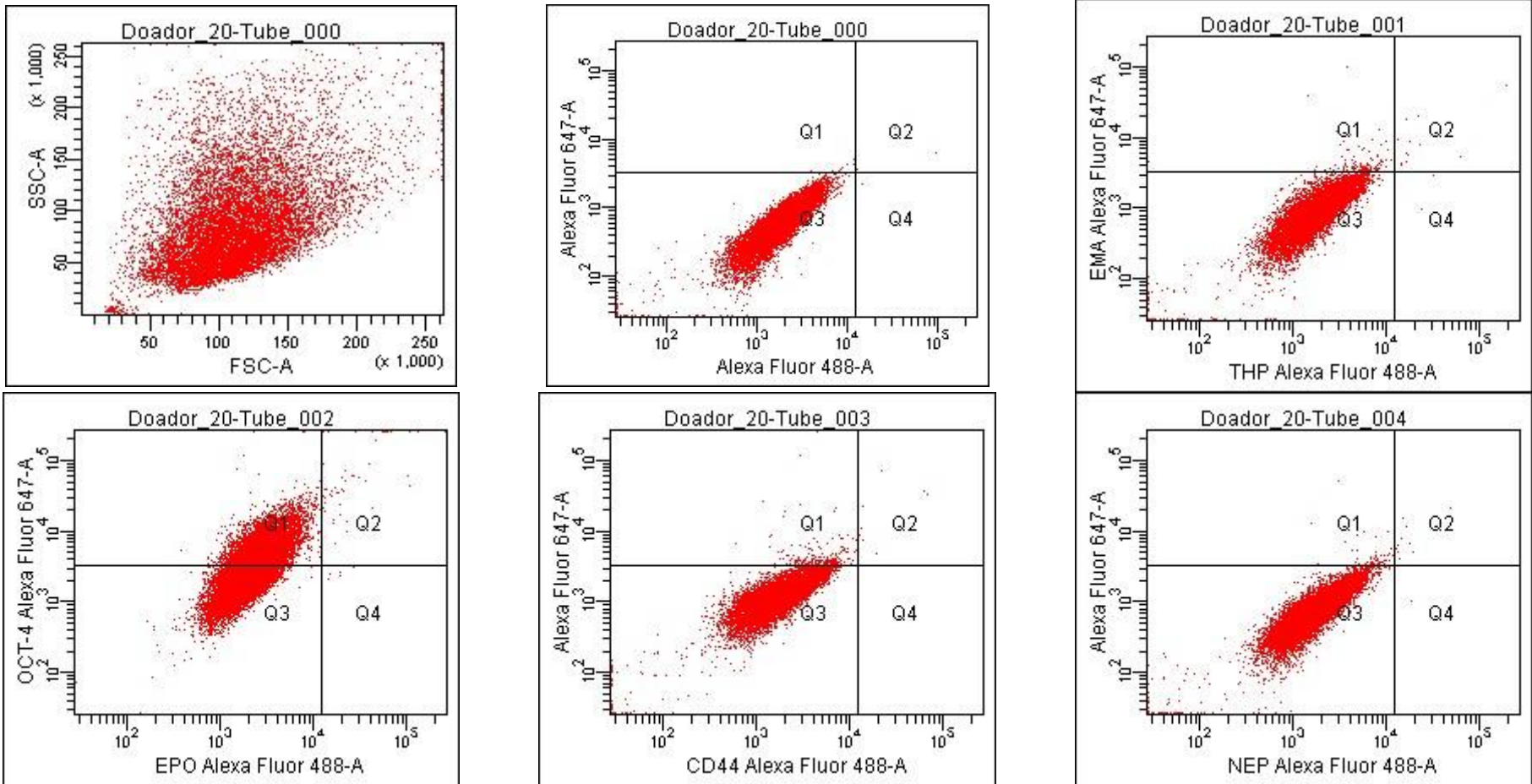
Doador 17



Doador 18



Doador 20



3.3 Descelularização

Rins submetidos ao biorreator customizado e tratados com SDS a 1% apresentaram remoção das células nativas após um período de 4 horas (Figura 2). Na figura 3 observamos o resultado após 24 horas da perfusão.

Para manter o processo de perfusão das soluções de lavagem através do rim porcino e consequentemente o descarte dessas soluções, foi utilizada uma bomba de perfusão que mantinha constante a perfusão do rim em 12mL/min com tempos variados de acordo com a solução de lavagem.

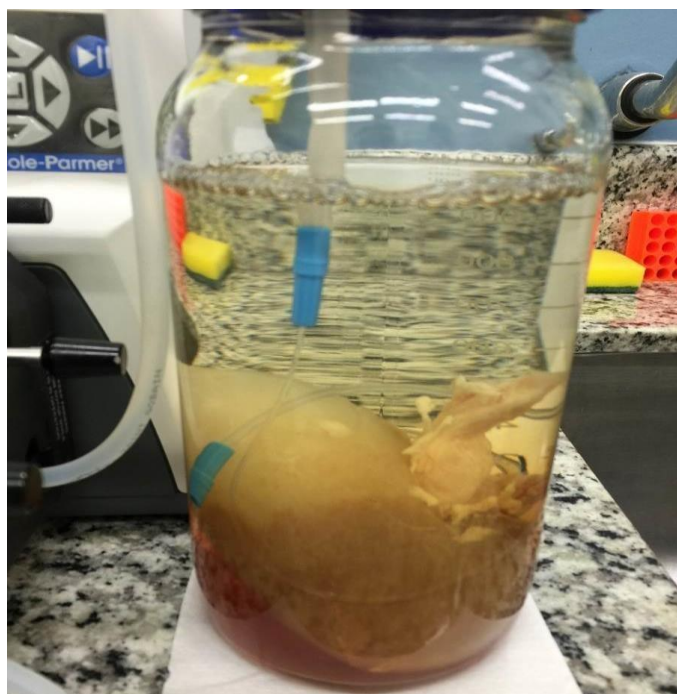


Figura 2. Descelularização dodecil sulfato de sódio – 4 horas depois

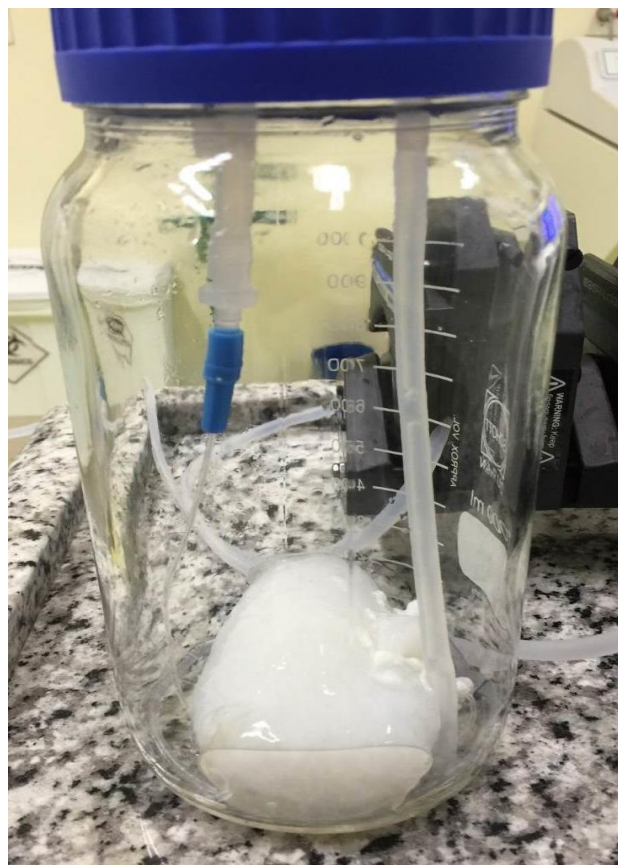


Figura 3. Descelularização – 24 horas depois

3.4 Análise de histologia

Após o processo de lavagem do rim porcino, a EMC foi submetida ao processo de histologia com a coloração de H&E que comprovou a ausência de células e as colorações de Sirius Red e Tricrômico de Masson que comprovaram a preservação da arquitetura da EMC.

Rim controle histologia

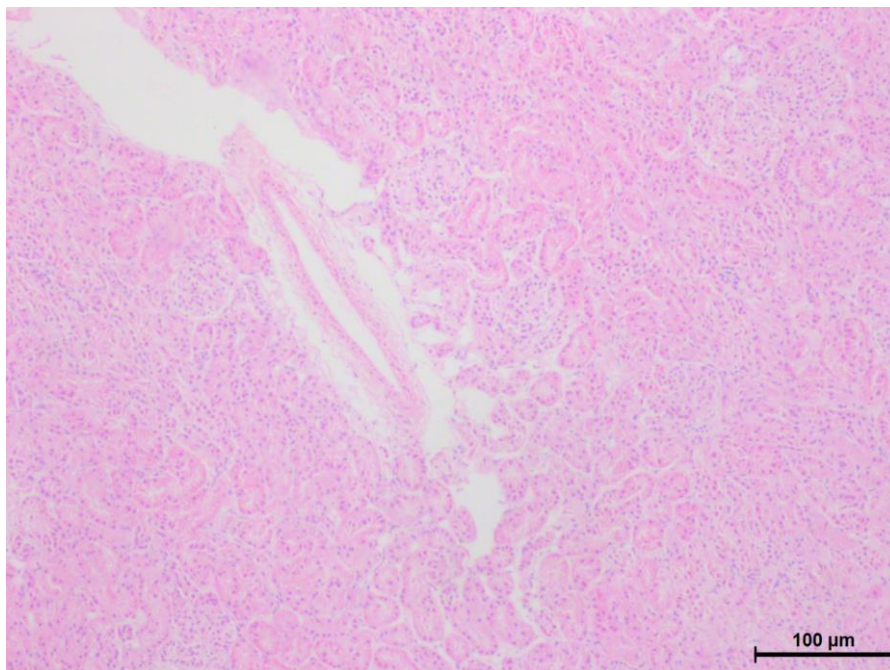


Figura 4. Rim controle corado com H&E

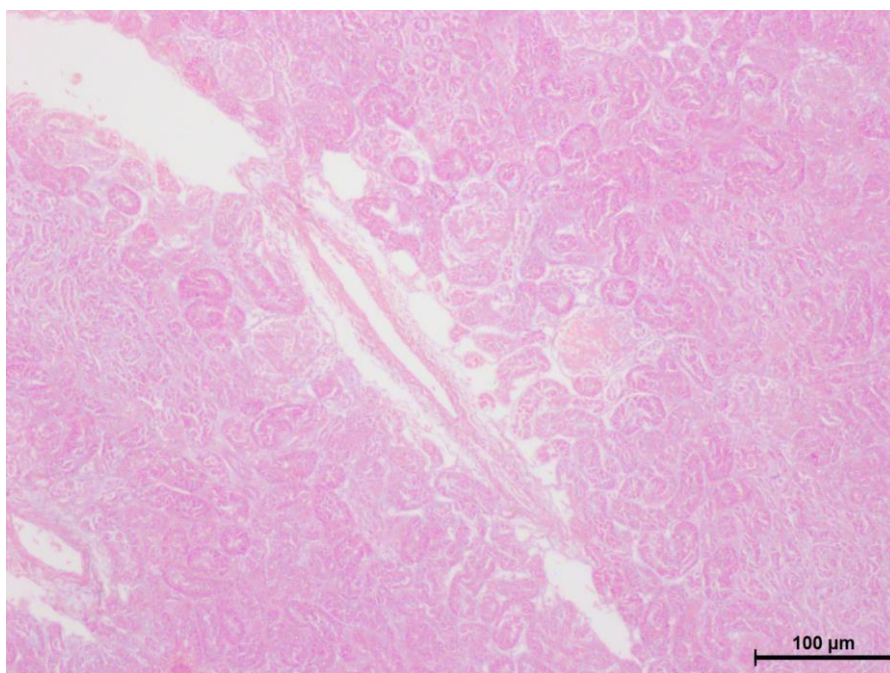


Figura 5. Rim controle corado com Tricrômico de Masson

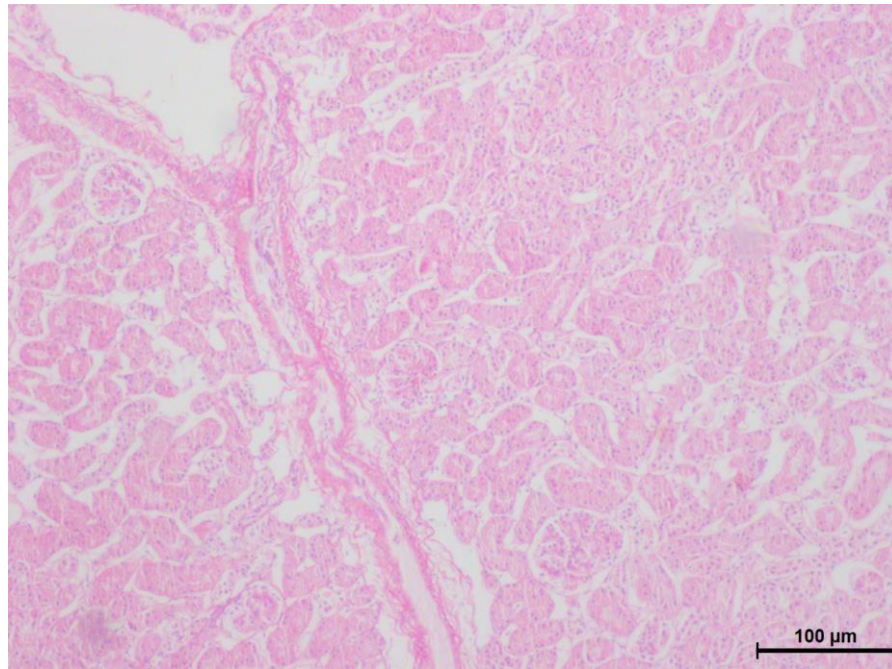


Figura 6. Rim controle corado com Sirius Red

Rim descelularizado histologia

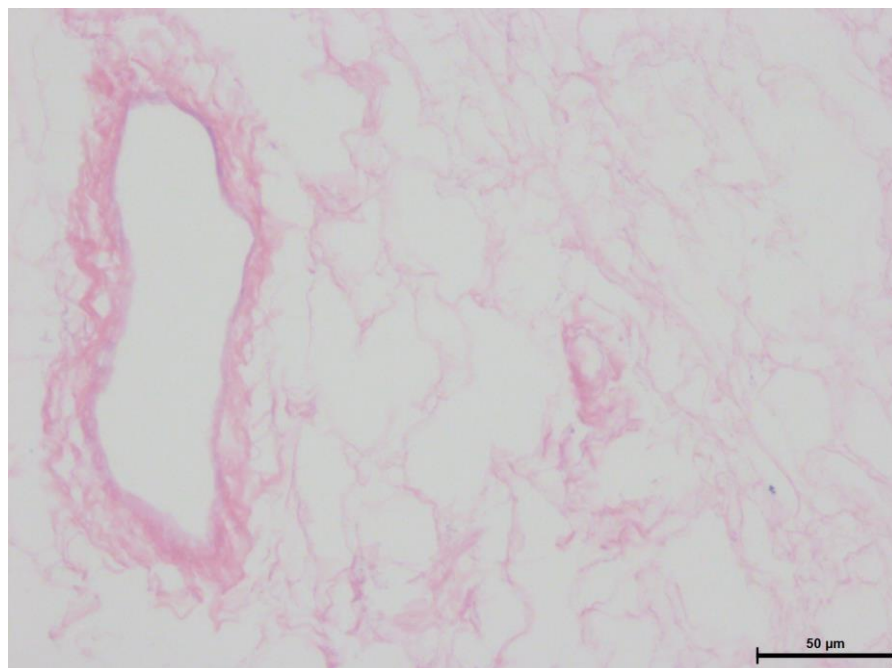


Figura 7. Rim descelularizado corado com H&E

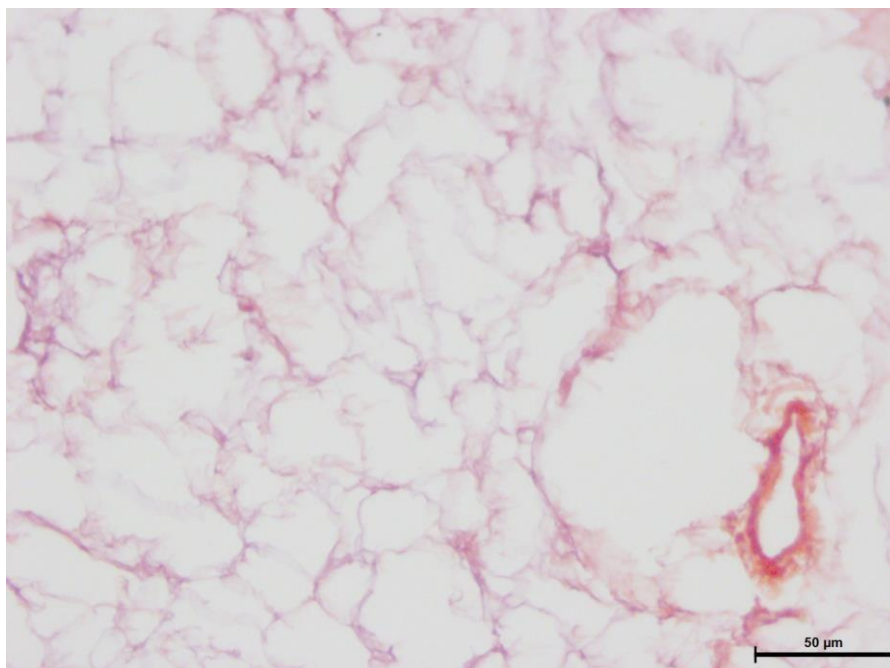


Figura 8. Rim descelularizado corado com Tricrômico de Masson

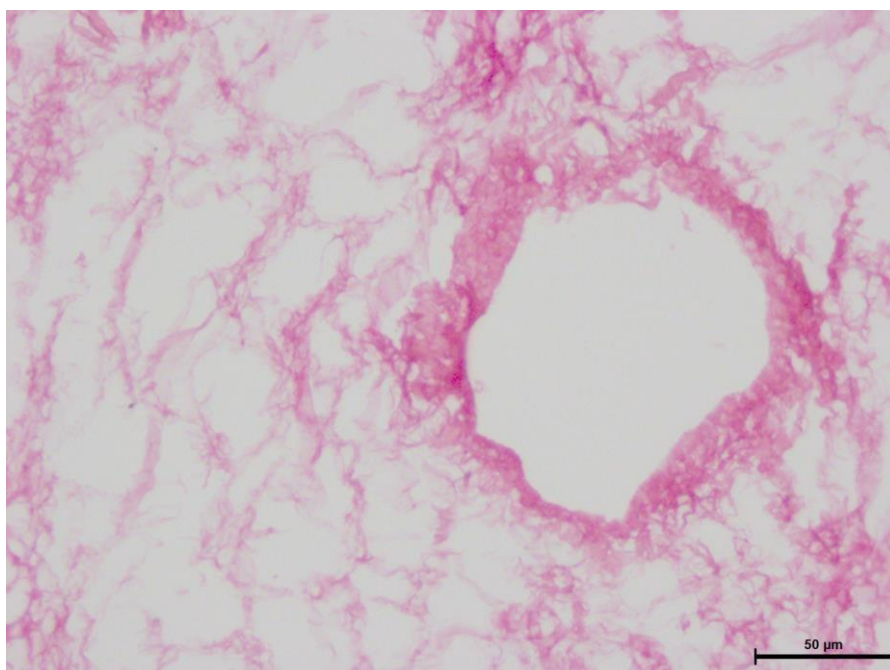


Figura 9. Rim descelularizado corado com Sirius Red

3.5 Análise da imunohistoquímica

Os ensaios de imunohistoquímica foram realizados para a última confirmação do processo de descelularização e demonstraram a ausência celular e a preservação das estruturas internas da EMC.

Rim controle imunohistoquímica

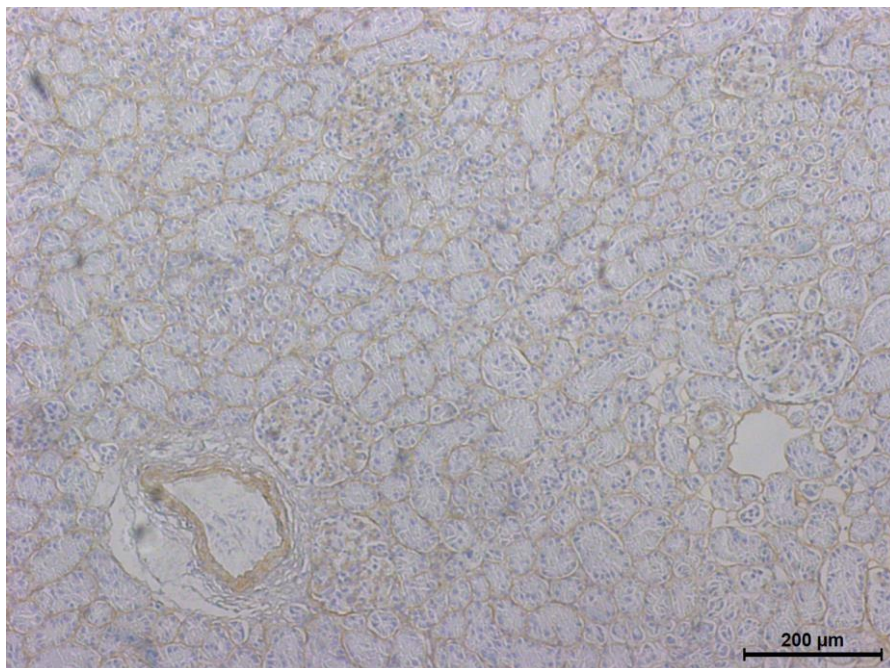


Figura 10. Rim controle marcado com Colágeno IV

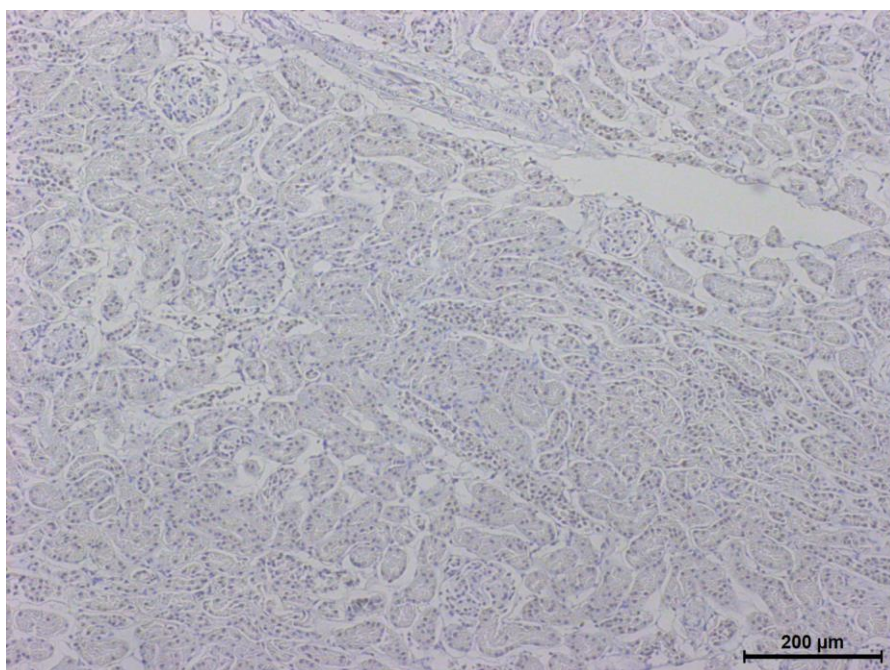


Figura 11. Rim controle marcado com Fibronectina

Rim descelularizado imunohistoquímica

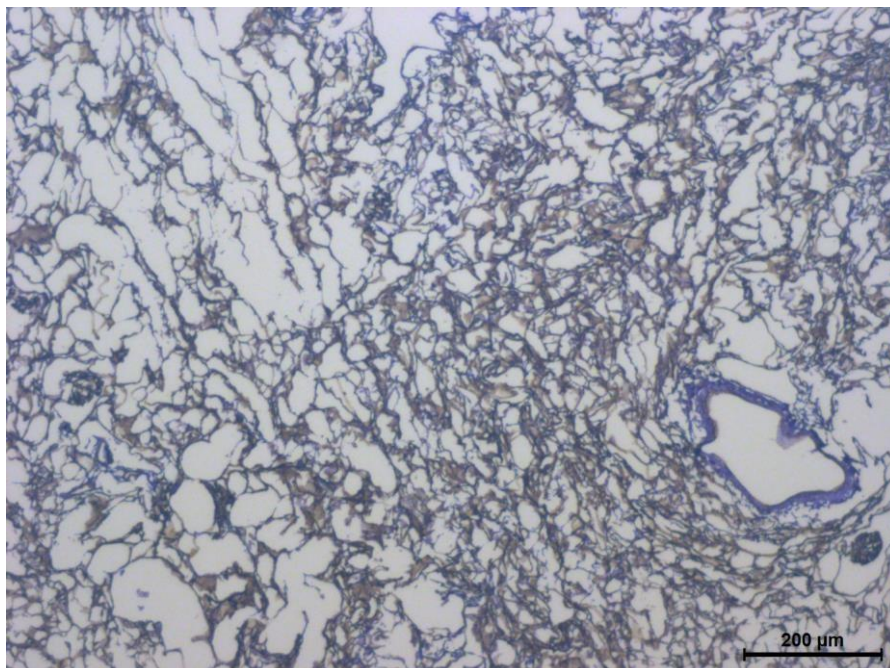


Figura 12. Rim descelularizado marcado com Colágeno IV

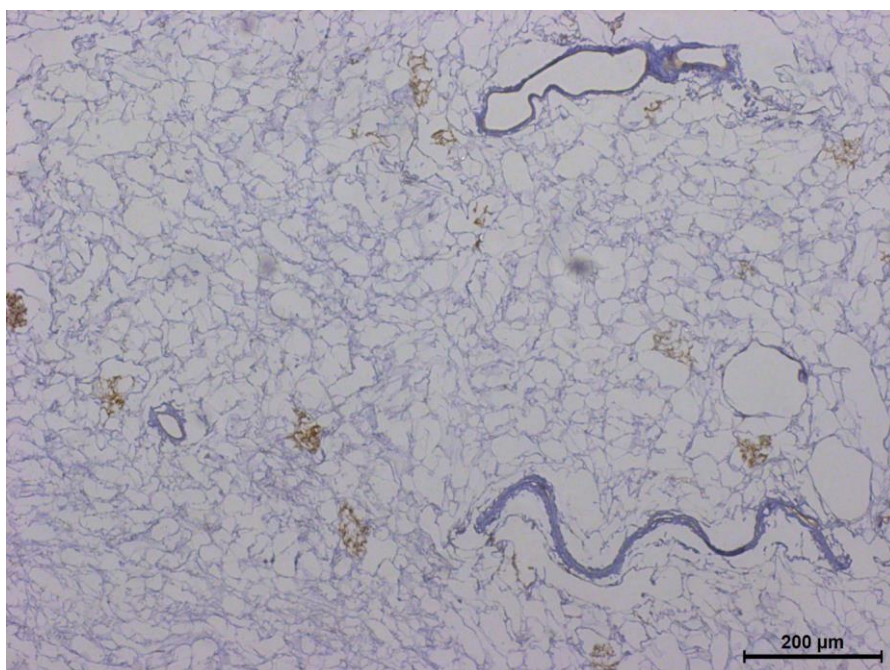


Figura 13. Rim descelularizado marcado com Fibronectina

Análise estatística da imunohistoquímica

Através da análise estatística comparando as proteínas colágeno tipo IV e fibronectina, não observamos diferença nas porcentagens das respectivas proteínas.

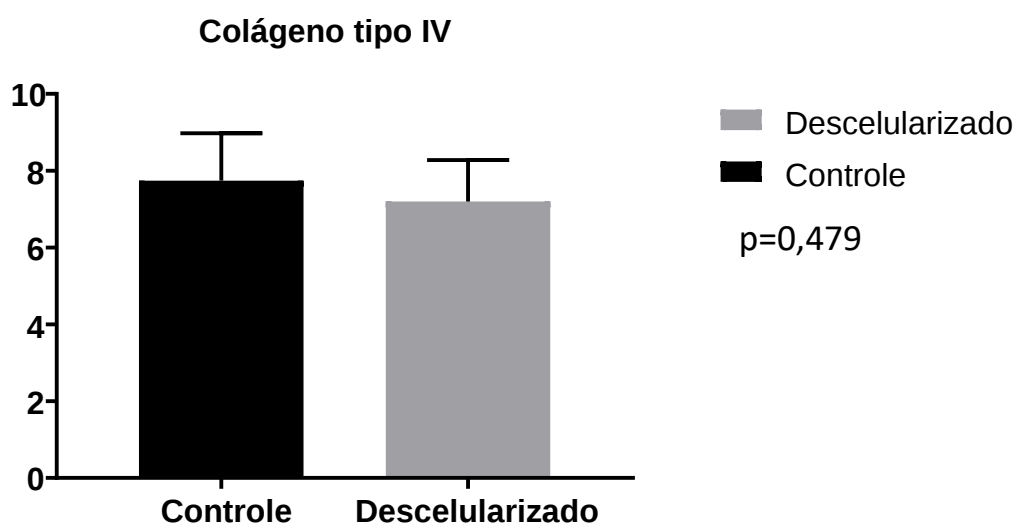


Figura 14. Análise estatística da imunohistoquímica comparando colágeno tipo IV do rim descelularizado com o rim controle

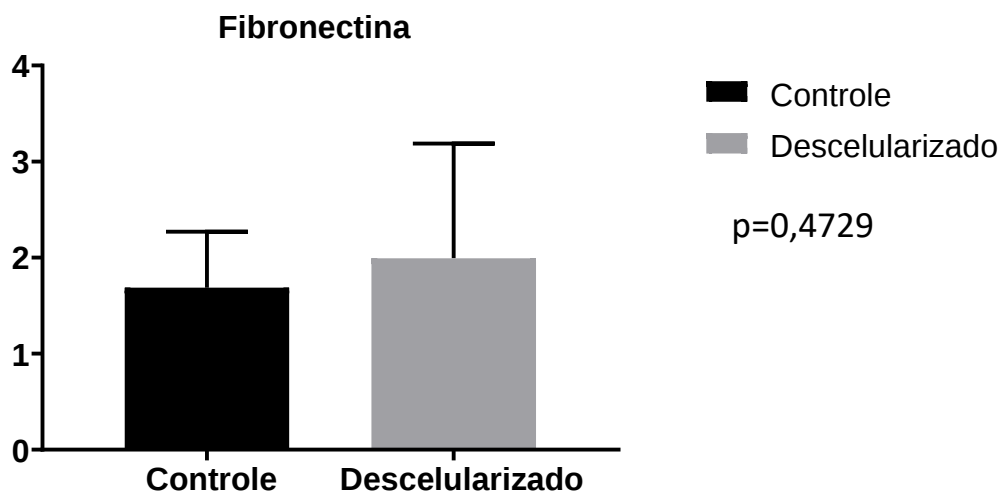


Figura 15. Análise estatística da imunohistoquímica comparando fibronectina do rim descelularizado com o rim controle

4 DISCUSSÃO

O rim foi o primeiro órgão sólido cuja função foi aproximada por uma máquina e um dispositivo sintético. Na verdade, terapia renal de substituição como hemodiálise ou diálise peritoneal, têm sido as únicas terapias de substituição de órgãos *ex vivo* bem-sucedidas a longa prazo e até o momento. O rim também foi o primeiro órgão transplantado com sucesso. Entretanto, a falta de disponibilidade de órgãos para transplante tem mantido o transplante renal com uma solução inviável na maioria dos casos de DRC.^(64,65)

O desenvolvimento de terapia com células epiteliais renais para substituir as funções endócrinas e imunológicas do rim, além da hemofiltração, promete agregar valor significativo aos atuais tratamentos na insuficiência renal.⁽⁶⁶⁾

Nesse estudo utilizamos culturas de células renais humanas adultas. Os rins utilizados para obtenção de células eram descartes do transplante renal. Desta forma, esses rins eram de qualidade inferior à necessária para que com o transplante renal houvesse recuperação das células e de suas funções no receptor. Frente ao obstáculo de obterem-se células renais humanas ideais, avaliamos características que predissessem o melhor doador para uma possível terapia celular.

Não foi observada associação significativa entre as variáveis investigadas e o não crescimento da cultura de células, mas há indícios de que a chance do não crescimento da cultura de células seja maior entre homens, entre doadores que tiveram parada cardiorrespiratória, que eram portadores de hipertensão arterial sistêmica e com valores maiores de tempo entre clampeamento e cultura, de creatinina inicial e diurese.

Analizamos a ineficiência do método em pacientes hipertensos. Tal fato é justificado pela complicação renal da hipertensão arterial sistêmica que leva a perda de função do órgão. A DRC é caracterizada por retenção de sódio e água, levando a aumentos do volume plasmático e do débito cardíaco. A hipertensão é perpetuada pelo desequilíbrio nos efeitos de várias substâncias vasoativas - ativação / supressão insuficiente de sistemas de vasoconstrição (renina-angiotensinaaldosterona, sistema simpático) e diminuição da produção de agentes vasodilatadores (NO, prostaglandinas). Na hipertensão a presença de calcificações e diminuição da elasticidade dos vasos

sistêmicos, leva a lesão renal crônica e conseqüentemente o não crescimento da cultura.⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾

Durante a parada cardiorrespiratória há ausência de chegada de sangue, uma vez que o coração não está bombeando, conseqüentemente ocorre isquemia renal, o que é a provável causa da incapacidade de crescimento de células renais humanas nas culturas.

É descrito no cenário do transplante renal que o tempo de isquemia fria do órgão, ou seja, o tempo do clampeamento da artéria renal para retirada do rim do doador e a ligação da artéria renal no receptor determina o tempo de recuperação da função renal no paciente receptor de transplante renal. O mecanismo de demora em recuperação destes transplantes é conseqüente à falta de perfusão, isquemia e morte celular. Neste estudo demonstramos com experimento *in vitro* a baixa taxa de replicação celular e a ineficiência em crescimento de culturas.

A diminuição da diurese e o aumento da creatinina sérica são marcadores clínicos e laboratoriais de injúria renal, refletindo na dificuldade de se obter culturas celulares destes rins. Embora tais fatos sejam descritos no transplante renal essa é a primeira descrição da incapacidade de proliferação celular *in vitro* em conseqüência de dados clínicos documentados.

Nas culturas obtidas com sucesso investigamos fatores clínico-laboratoriais que favorecem algum tipo celular em se proliferar *in vitro*. Observamos evidência de associação entre as medidas e o gênero, sendo as porções positivas para EMA + THP e EPO + Oct4 maiores entre homens e proporções positivas para NEP + CD73 maiores para mulheres.

Nos doadores onde houve a administração de drogas vasoativas e crescimento celular, uma vez que com a utilização desse tipo de drogas faz com que ocorra um aumento do fluxo de sangue para os rins, houve evidência de associação para crescimento de todos os tipos celulares renais e também para células dediferenciadas (EMA +THP, EPO + Oct4, CD24 + CD44 e NEP + CD73). O aparecimento dos marcadores para determinação da transição epitélio mesenquimal (EMT) foi observado entre os doadores onde houve o uso de drogas vasoativas sendo um indicativo da tentativa de reparação do rim lesionado.

Apesar da complexa estrutura do rim adulto, a regeneração de órgãos inteiros é um conceito excitante que está sendo desenvolvido dentro do campo da Medicina Regenerativa. A consideração de usar órgãos de animais descelularizados

para a engenharia de órgãos funcionais de tamanho humano foi aceita como uma potencial opção de tratamento futuro para a insuficiência de órgãos sólidos para transplante. Nos últimos anos, vários grupos tem demonstrado a viabilidade da descelularização de pequenos órgãos sólidos de animais, bem como a capacidade de rescelularizar estes órgãos descelularizados para recuperar a morfologia similar com o órgão original.⁽⁷⁰⁻⁷³⁾

Em um desses estudos, células-tronco embrionárias murinas proliferaram e diferenciaram-se quando semeadas em rins de rato inteiros descelularizados. As estruturas de matriz 3D de rins de rato foram submetidas a um protocolo de 5 dias de remoção celular progressiva.⁽⁷³⁾ Nossa metodologia de descelularização foi realizada em apenas 24 horas de perfusão com solução SDS a 1%.

Um trabalho subsequente relatou melhora da recelularização do rim de rato com células-tronco embrionárias murinas através da implantação de um protocolo alternativo. Ao invés de descelularizar com SDS ao longo de um percurso de 5 dias, um total de 17 horas mostrou ser bem sucedido, e a preservação da arquitetura 3D da matriz do rim foi demonstrada utilizando a tecnologia de tomografia microcomputadorizada. Após a semeadura através da artéria renal, as células-tronco embrionárias murinas foram detectadas em redes vasculares e glomerulares e tubulações.⁽⁷⁴⁾

Um estudo relacionado usou rins obtidos de ratos, porcos e humanos, descelularizados usando 1% de solução de SDS através de perfusão pela artéria renal. Como em ensaios anteriores, verificou-se que os *scaffolds* resultantes eram acelulares e possuíam a EMC intacta incluindo arranjo fisiológico e glicosaminoglicanos. Em seguida recelularizaram os *scaffolds* com células endoteliais venosas umbilicais humanas através da artéria renal e células de rins neonatos de rato através do ureter. A análise adicional feita desses *scaffolds* recelularizados mostrou que as células semeadas migraram para os seus fisiológicos nichos sendo as células endoteliais venosas umbilicais humanas reconstituindo vasos endoteliais e capilares enquanto que as células de rins neonatos de rato formando componentes tubulares. Além disso, as células de rins neonatos de rato derivaram estruturas tubulares que continham expressão de Na⁺/K⁺ - ATPase, comparando-os com epitélio tubular proximal, enquanto outras expressaram E-cadherin, lembrando assim, túbulos distais, ductos coletores e epitélio transicional na pelve renal.⁽⁷⁵⁾

Os órgãos porcos, podem ser uma forma vantajosa de xenotransplantes de todo o órgão, uma vez que os materiais biológicos porcos já foram utilizados clinicamente. São fáceis de obterem e possuem uma alta qualidade. A utilização de órgãos porcos como os rins na engenharia de tecidos, é uma atrativa abordagem, principalmente porque os órgãos se assemelham ao tamanho dos órgãos humanos e os *scaffolds* porcos podem apoiar a sobrevivência e manter a função das células humanas melhor do que os *scaffolds* de roedores, cachorros e macacos.⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾

Neste trabalho optamos por utilizar apenas SDS no processo de descelularização, pois de acordo com trabalhos realizados com alguns tipos específicos de detergentes e em nossa prévia experiência, o SDS mostrou-se mais eficaz na remoção das células renais.^(76,79)

Na análise visual do processo de descelularização dos rins porcos, observamos que após um período de 24 horas com perfusão de SDS 1% houve a remoção de todas as células.

Através da histologia dos rins porcos descelularizados, observamos que houve a preservação da arquitetura da EMC e das artérias renais nos rins porcos tratados com SDS em comparação ao rim controle, visto que a preservação dessas estruturas é importante para a acomodação das células em um processo de recelularização.

A análise imunohistoquímica dos rins descelularizados e controles mostraram que através do processo de descelularização com SDS, houve a preservação da EMC, quantificado através das proteínas fibronectina e colágeno tipo IV.

Com esses dados podemos fornecer um protocolo rápido de remoção celular para rins porcos. Novas abordagens para verificação de quantidades residuais de SDS devem ser avaliadas, uma vez que há a necessidade de se manter um ambiente isento de quaisquer vestígios tóxicos para a acomodação das células no processo de recelularização.

Os resultados encontrados são de importância para a pesquisa científica, uma vez que não existem trabalhos com registros de comparação entre as análises de citometria de fluxo e as células encontradas na cultura de células renais humanas adultas provenientes de rins descartados para transplante.

Esses dados nos proporcionam decidir qual a melhor maneira de obtermos determinado tipo celular analisando apenas as características demográficas dos doadores.

Como previsto, a aplicação de protocolos para células epiteliais provenientes de rins que não foram utilizados para transplante de órgãos, é uma ótima alternativa para obtenção de diferentes tipos celulares levando em conta como base, as informações disponíveis correlacionadas com a saúde geral do doador.

A aplicação de protocolos para a expansão de células renais adultas tem resolvido o problema da obtenção de células como o fator limitante da velocidade para a fabricação de terapias baseadas em células dirigidas a doenças renais e pode proporcionar um método para a fabricação de dispositivos autólogos a partir de biopsias de rins.

5 CONCLUSÕES

1. A obtenção de células renais humanas adultas a partir de doadores de ambos os sexos é possível. Células renais humanas adultas viáveis caracterizadas como células de túbulo proximal, túbulo distal, ducto coletor, fibroblasto produtor de eritropoietina, bem como a presença de células progenitoras. As culturas de células que não tiveram crescimento celular podem estar relacionadas: ao sexo masculino, entre doadores que sofreram parada cardiorrespiratória, portadores de hipertensão arterial sistêmica, com valores maiores entre o tempo entre o clampeamento e início da cultura, de creatinina inicial e diurese;

2. A análise clínico-laboratorial, evidenciou de associação para doadores que sofreram parada cardiorrespiratória presença de fibroblastos produtores de eritropoietina e células progenitoras. Doadores com hipertensão arterial sistêmica apresentaram células de túbulo distal, ducto coletor, fibroblasto produtor de eritropoietina, células progenitoras e outros fibroblastos. O uso de drogas vasoativas no doador associou-se com crescimento de todos os tipos celulares estudados;

3. A metodologia utilizada permite a remoção completa de células e preservação das estruturas extracelulares como a fibronectina e o colágeno tipo IV da matriz extracelular.

6 REFERÊNCIAS

1. Coresh J, Byrd-Holt D, Astor BC, Briggs JP, Eggers P W, Lacher DA, et al. Chronic kidney disease awareness, prevalence and trends among U.S. adults, 1999 to 2000. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(1):180-8.
2. Mezzano S, Aros C. [Chronic kidney disease: classification, mechanisms of progression and strategies for renoprotection]. *Rev Med Chil*. 2005;133(3):338-48. Spanish.
3. United States Renal Data System. 2013 USRDS annual data report: atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2014;63(1 Suppl):e1-e478.
4. International Society of Nephrology [Internet]. Brussels; c2017 [cited 2017 Jul 11]. Available from: <https://www.theisn.org/initiatives/ckd>
5. Sociedade Brasileira de Nefrologia 2015. Censo de Diálise SBN [Internet]. São Paulo; 2015. [citado 2017 Jul 20]. Disponível em: http://www.sbn.org.br/pdf/centso_2015-14-05.pdf
6. Benigni A, Morigi M, Remuzzi G. Kidney regeneration. *Lancet*. 2010;375(9722):1310-7.
7. Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos. Dados numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: janeiro/setembro – 2016. Registro Brasileiro de Transplantes. 2016;22(3):3-17.
8. KDOQI; National Kidney Foundation. KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for anemia in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2006;47(5 Suppl 3):S11-145.
9. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease. Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2005; 67(6):2089-100.
10. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(1):1-12.
11. Inker LA, Lambers Heerspink HJ, Mondal H, Schmid CH, Tighiouart H, Noubary F. GFR decline an alternative end point to kidney failure in clinical trials: a meta-analysis of treatment effects from 37 randomized trials. *Am J Kidney Dis*. 2014;64(6):848-59.
12. Fan L, Levey AS, Gudnason V, Eiriksdottir G, Andresdottir MB, Gudmundsdottir H, et al. Comparing GFR estimating equations using cystatin C and creatinine in elderly individuals. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(8):1982-9.
13. United States Renal Data System [Internet]. Ann Arbor; 2015 [cited 2017 Jul 11]. Available from: <https://www.usrds.org>
14. Nutritional anaemias. Report of a WHO scientific group. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1968;405:5-37.

15. Besarab A, Levin A. Defining a renal anemia management period. *Am J Kidney Dis.* 2000;36(6 Suppl 3):S13-23.
16. McClellan W, Aronoff SL, Bolton WK, Hood S, Lorber DL, Tang KL, et al. The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. *Curr Med Res Opin.* 2004;20(9):1501-10.
17. Ratcliffe PJ. Molecular biology of erythropoietin. *Kidney Int.* 1993;44(4):887-904.
18. Thomas R, Kanso A, Sedor JR. Chronic kidney disease and its complications. *Prim Care.* 2008;35(2):329-44.
19. Fink J, Blahut S, Reddy M, Light P. Use of erythropoietin before the initiation of dialysis and its impact on mortality. *Am J Kidney Dis.* 2001;37(2):348-55.
20. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, Ott S, Sprague S, Lameire N, Eknoyan G; Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Definition, evaluation and classification of renal osteodystrophy: a position statement from kidney disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006;69(11):1945-53.
21. Gal-Moscovici A, Sprague SM. Bone health in chronic kidney disease-mineral and bone disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2007;14(1):27-36.
22. Coresh J, Selvin E, Stevens LA. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA.* 2007;298(17):2038-47.
23. Foley R. N., Parfrey P. S., Sarnak M. J. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(5 Suppl 3):112-9.
24. Kundhal K, Lok CE. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract.* 2005;101(2):c47-52.
25. Whelton PK, Perneger TV, Brancati FL, Klag MJ. Epidemiology and prevention of blood pressure-related renal disease. *J Hypertens Suppl.* 1992;10(7):S77-84.
26. Levey AS. Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: where do we start? *Am J Kidney Dis.* 1998;32(5 Suppl 3):S5-13.
27. Perneger TV, Whelton PK, Klag MJ. History of hypertension in patients treated for endstage renal disease. *J Hypertens.* 1997;15(4):451-6.
28. Tonelli M, Keech A, Shepherd J, Sacks F, Tonkin A, Packard C, et al. Effect of pravastatin in people with diabetes and chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(12):3748-54.
29. Vora JP, Ibrahim HA, Bakris GL. Responding to the challenge of diabetic nephropathy: the historic evolution of detection, prevention and management. *J Hum Hypertens.* 2000;14(1011):667-85.
30. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(8):444-52.
31. Soldatos G, Cooper ME. Diabetic nephropathy: important pathophysiologic mechanisms. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;82 Suppl 1:S75-79.

32. Pino CJ, Yevzlin AS, Tumlin J, Humes HD. Cell-based strategies for the treatment of kidney dysfunction: a review. *Blood Purif.* 2012;34(2):117-23.
33. Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *Am J Soc Nephrol.* 2002;13(3):80616.
34. Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14 Suppl 1:S55-61.
35. van der Meer AD, van den Berg A. Organs-on-chips: breaking the in vitro impasse. *Integr Biol (Camb).* 2012;4(5):461-70.
36. Maeshima A, Nakasatomi M, Nojima Y. Regenerative medicine for the kidney: renotropic factors, renal stem/progenitor cells and stem cell therapy. *Biomed Res Int.* 2014;2014:595493.
37. Pino CJ, Humes HD. Stem cell technology for the treatment of acute and chronic renal failure. *Transl Res.* 2010;156(3):161-8.
38. Fissell WH, Fleischman AJ, Humes HD, Roy S. Development of continuous implantable renal replacement: past and future. *Transl Res.* 2007;150(6):327-36.
39. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci.* 2004;4(8):743-65.
40. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000;21(24):2529-43.
41. Gomes ME, Reis RL. Tissue engineering: key elements and some trends. *Macromol Biosci.* 2004;4(8):737-42.
42. Burdick JA, Vunjak-Novakovic G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(2):205-19.
43. Ruiz SA, Chen CS. Emergence of patterned stem cell differentiation within multicellular structures. *Stem Cells.* 2008;26(11):2921-7.
44. Lutolf MP, Gilbert PM, Blau HM. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature.* 2009;462(7272):433-41.
45. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene.* 2008;27(45):5904-12.
46. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(3):211-24.
47. Ingber DE. Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment? *Semin Cancer Biol.* 2008;18(5):356-64.
48. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell.* 2005;8(3):241-54.
49. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126(4):677-89.

50. Arnaoutova I, Kleinman HK. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat Protoc.* 2010;5(4):628-35.
51. Kim CH, Broxmeyer HE. In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: Stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood.* 1998;91(1):100-10.
52. Brower V. Human ES cells: can you build a business around them? *Nat Biotechnol.* 1999;17(2):139-42.
53. Wertz DC. Embryo and stem cell research in the United States: history and politics. *Gene Ther.* 2002;9(11):674-8.
54. Orive G, Hernández RM, Gascón AR. Cell encapsulation: promise and progress. *Nat Med.* 2003;9(1):104-7.
55. Avgoustiniatos ES, Colton CK. Effect of external oxygen mass transfer resistances on viability of immunoisolated tissue. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;831:145-67.
56. Montserrat N, Garreta E, Izpisua Belmonte JC. Regenerative strategies for kidney engineering. *FEBS.* 2016;283(18):3303-24.
57. Tapias LF, Ott HC. Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs. *Curr Opin Organ Transplant.* 2014;19(2):145-52.
58. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;32(12):3233-43.
59. He M, Callanan A. Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19(3):194-208.
60. Keane TJ, Swinehart I, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in-vivo relevance. *Methods.* 2015;84:25-34.
61. Fox IJ, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation. *J Hepatol.* 2004;40(6):878-86.
62. Nakayama KH, Lee CC, Batchelder CA, Tarantal AF. Tissue specificity of decellularized rhesus monkey kidney and lung scaffolds. *PLoS One.* 2013;8(5):e64134.
63. Yu YL, Shao YK, Ding YQ, Lin KZ, Chen B, Zhang HZ, et al. Decellularized kidney scaffold-mediated renal regeneration. *Biomaterials.* 2014;35(25):6822-8.
64. Patient mortality and survival. United States Renal Data System. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(2 Suppl 1):S69-80.
65. Humes HD, Szczypka MS. Advances in cell therapy for renal failure. *Transpl. Immunol.* 2004;12(3-4):219-27.
66. Guyette JP, Gilpin SE, Charest JM, Tapias LF, Ren X, Ott HC. Perfusion decellularization of whole organs. *Nat Protoc.* 2014;9(6):1451-68.

67. Neumann J, Ligtenberg G, Klein II, Koomans HA, Blankestijn PJ. Sympathetic hyperactivity in chronic kidney disease: pathogenesis, clinical relevance and treatment. *Kidney Int.* 2004;65(5):1568-76.
68. Passauer J, Pistroch F, Bössemaker E, Lässig G, Herbrig K, Gross P. Reduced agonist-induced endothelium-dependent vasodilation in uremia is attributable to an impairment of vascular nitric oxide. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(4):959-65.
69. Monhart V. Hypertension and chronic kidney diseases. *Cor Vasa.* 2013;55(4):E397-402.
70. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.* 2008;14(2):213-21.
71. Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, Rodriguez SR, Atala A, Soker S. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology.* 2011;53(2):604-17.
72. Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomidou L, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med.* 2010;16(8):927-31.
73. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, Terada N, Clapp WL, Adin C, et al. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(11):2338-47.
74. Bonandrini B, Figliuzzi M, Papadimitou E, Morigi M, Perico N, Casiraghi F, et al. Recellularization of well-preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2017;20(9-10):1486-98.
75. Song JJ, Guyette JP, Gilpin SE, Gonzalez G, Vacanti JP, Otto HC. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med.* 2013;19(5):646-51.
76. Wang Y, Bao J, Wu Q, Zhou Y, Li Y, Wu X, et al. Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts. *Xenotransplantation.* 2015;22(1):48-61.
77. Kim SS, Sundback CA, Kaihara S, Benvenuto MS, Kim BS, Mooney DJ, et al. Dynamic seeding and in vitro culture of hepatocytes in a flow perfusion system. *Tissue Eng.* 2000;6(1):39-44.
78. Westover AJ, Buffington DA, Humes HD. Enhanced propagation of adult renal epithelial progenitor cells to improve cell sourcing for tissue engineered therapeutic devices for renal diseases. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6(8):589-97.
79. Smith PL, Buffington DA, Humes HD. Kidney epithelial cells. *Methods Enzymol.* 2006;419:194-207.

Abstract

Purpose: The objective of the present study was to characterize human renal cells by evaluating the correlation of clinical laboratory factors and the viability of primary renal cultures. And to evaluate a new methodology of renal decellularization. **Methods:** Human kidney cells collected from different organs, which were not used for organ transplantation, were cultured and characterized by flow cytometry. Clinical-laboratory parameters were correlated with the cellular outcomes. The decellularization of porcine kidneys performed through the new protocol using 1% sodium Dodecyl sulfate for 24 hours. **Results:** Characterization of human renal cells by flow cytometry demonstrated the presence of progenitor cells, cells with loss of differentiation and renal cells from proximal tubules, distal tubule and collecting duct, fibroblasts, erythropoietin producing cells. Clinical-laboratory parameters suggest association of donor cardiorespiratory arrest (RC 6.5) and presence of donor hypertension (RC 6.0) with non-viability of cultures. Porcine kidneys were decellularized in 24 hours and the preservation of the extracellular matrix proved by histology and immunohistochemistry. **Conclusion:** A viable renal cell primary culture can be obtained. The new methodology for porcine kidney decellularization was successful, reducing the decellularization time to 24 hours.