



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA MECÂNICA

“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
EQUIPAMENTO DE DECELULARIZAÇÃO DE ORGÃO
INTEIRO PELO MÉTODO DE PERFUSÃO”

JONATHAS HANIEL CASTRO SILVA

Belo Horizonte, 01 de junho de 2016

JONATHAS HANIEL CASTRO SILVA

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
EQUIPAMENTO DE DECELULARIZAÇÃO DE ORGÃO
INTEIRO PELO MÉTODO DE PERFUSÃO”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Rudolf Huebner

DEMEC - UFMG

Co-orientadora: Profa. Dra. Betânia Maria Soares

Labbio - UFMG

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG
Ano 2016



Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica

Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - 31.270-901 - Belo Horizonte – MG

Tel.: +55 31 3499-5145 - Fax.: +55 31 3443-3783

www.demec.ufmg.br E-mail: cpgmec@demec.ufmg.br

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
EQUIPAMENTO DE DECELULARIZAÇÃO DE ORGÃO
INTEIRO PELO MÉTODO DE PERFUSÃO”**

JONATHAS HANIEL CASTRO SILVA

Dissertação defendida e aprovada em 01, de junho de 2016, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de "**Mestre em Engenharia Mecânica**", na área de concentração de "**Bioengenharia**".

Prof. Dr. Rudolf Huebner – DEMEC UFMG – Orientador

Profa. Dra. Betânia Maria Soares - Labbio UFMG – Co-orientadora

Prof. Dr. Estevam Barbosa de Las Casas – DEES UFMG – Examinador

Prof. Dr. Tulio Pinho Navarro – Faculdade de Medicina UFMG - Examinador

Profa. Dra. Rosana de Carvalho Cruz – Labbio UFMG – Orientador

Dedico à minha querida irmãzinha.

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço por sua bondade e fidelidade que me permitiram alcançar mais esse objetivo.

A toda minha família, especialmente meus pais, Luiz (*in memoriam*) e Adriana, e minha avó, Cleusa; eternos agradecimentos pelo suporte que me deram minha vida inteira e pelo esforço que me ajudaram na minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Marcos Pinotti (*in memoriam*) pela orientação, pela oportunidade de poder participar de seus projetos, e pelo grande aprendizado oferecido não só nas pesquisas, como também demonstrando como ser um excelente professor em sala de aula.

À Profa. Dra. Betânia Soares, também pela orientação e a infinita disponibilidade para auxiliar em todas etapas do desenvolvimento desse mestrado.

À Profa. Dra. Rosana Cruz, por suas ajudas e contribuições que sempre estiveram presentes desde o primeiro dia do projeto.

Ao Prof. Dr. Rudolf Huebner, por sua orientação na fase final do mestrado, e sua assistência no desenvolvimento dessa dissertação.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Estevam Barbosa de Las Casas e Prof. Dr. Tulio Pinho Navarro, por se disponibilizarem para colaborar na construção desse trabalho.

Aos integrantes desse projeto, Ana Paula Macedo Brandão, Isabela Poley, Dr. Marcos Vale, pelas ajudas e o trabalho em equipe realizado em todo projeto.

A todos integrantes do LabBio, pelas assistências e cooperação, além dos vários momentos de conversa e risadas proporcionados.

À CAPES e UFMG, pelo apoio financeiro e institucional.

Meus sinceros agradecimentos.

“Não façam nada por competição ou imodéstia; mas, com humildade, considerem os outros melhores que vocês mesmos. Cuidem dos interesses das outras pessoas, e não só dos seus.”

Filipenses 2:3-4.

SUMÁRIO

NOMECLATURA	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO.....	15
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Justificativa	18
1.2 Objetivos.....	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos	18
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	19
2.1 Protocolos de decelularização.....	19
2.1.1 Agentes químicos	19
2.1.2 Agentes biológicos	22
2.1.3 Agentes físicos.....	24
2.1.4 Métodos de aplicação dos agentes de decelularização	26
2.2 Perfusão retrógrada do coração: o método de Langendorff	28
2.2.1 Modos de perfusão	30
2.3 Trocador de calor	31
2.4 Controle proporcional integral derivativo	33
2.4.1 Proporcional	34
2.4.2 Derivativo	34
2.4.3 Integral.....	35

2.4.4	Ajuste dos valores das constantes.....	35
2.5	Microcontrolador	36
2.5.1	Estrutura de um Microcontrolador	36
2.5.2	Unidade de Memória	37
2.5.3	Unidade Central de Processamento (CPU).....	37
2.5.4	Unidade de Entrada/Saída (I/O)	38
2.6	Lei de <i>Starling</i> do coração.....	38
3	METODOLOGIA.....	41
3.1	Alterações na máquina de circulação extracorpórea (MCE)	41
3.1.1	Potenciômetro digital.....	41
3.1.2	Medidor de velocidade de rotação do rolete.....	43
3.1.3	Estimativa da vazão média da bomba de rolete.....	45
3.1.4	Circuito microcontrolado.....	46
3.1.5	Elaboração do firmware de controle de rotação.	46
3.2	Controle de temperatura	51
3.2.1	Banho térmico	51
3.2.2	Trocador de calor de serpentina.....	52
3.3	Circuito de circulação do perfusato.....	55
3.3.1	Câmara de decelularização	57
3.4	Testes experimentais	58
3.4.1	1º Teste piloto: decelularização por perfusão	59
3.4.2	2º Teste piloto: decelularização por perfusão com eletrodo.....	60
3.4.3	3º Teste piloto: adição do controle de temperatura, medição de pressão e método de canulação	61
3.4.4	Experimentos utilizando banho térmico	63
3.4.5	Experimentos utilizando trocador de calor de serpentina.....	63
3.4.6	Experimentos com a montagem final	64
3.4.7	Teste do balão.....	64
3.4.8	Microscopia ótica	65

4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
4.1	Alterações na máquina de circulação extracorpórea	67
4.2	Controle de temperatura	67
4.3	Circuito de perfusão	69
4.4	Testes experimentais	73
4.4.1	1º Teste piloto: decelularização por perfusão	73
4.4.2	2º Teste piloto: decelularização por perfusão com eletrodo	74
4.4.3	3º Teste piloto: Adição do controle de temperatura, medição de pressão e método de canulação	75
4.4.4	Experimentos utilizando banho térmico	77
4.4.5	Experimentos utilizando trocador de calor de serpentina.....	79
4.4.6	Experimentos com a montagem final	82
4.4.7	Teste do balão.....	84
4.4.8	Microscopia ótica	85
5	CONCLUSÕES.....	88
	ABSTRACT	90
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	ANEXO A.....	104
	Algoritmo, em C, usado no compilador CCS@:.....	104
	ANEXO B.....	109
	Resumo dos valores medidos no teste do balão.	109

NOMECLATURA

Letras Latinas

a	Raio interno da semiesfera [m]
A	Área de superfície [m ²]
b	Raio externo da semiesfera [m]
c_p	Calor específico [J/kg.K]
D_E	Diâmetro externo do tubo [m]
D_h	Diâmetro da helicoide [m]
D_I	Diâmetro interno [m]
h_i	Coefficiente de película interno de transferência de calor [W/m ² .K]
h_{io}	Coefficiente de película interno de transferência de calor corrigido para o diâmetro externo [W/m ² .K]
h_o	Coefficiente de película externo de transferência de calor [W/m ² .K]
k	Condutividade térmica [W/m.K]
Kd	Constante derivativa [adimensional]
Ki	Constante integral [adimensional]
Kp	Constante proporcional [adimensional]
Nu	Número de Nusselt [adimensional]
P_e	Pressão externa à semiesfera [Pa]
P_i	Pressão interna à semiesfera [Pa]
Pr	Número de Prandtl [adimensional]
q	Taxa de calor [W]
Re	Número de Reynolds [adimensional]
R_T	Resistência elétrica total [Ω]
U	Coefficiente global de troca térmica [W/m ² .K]
Vi	Densidade relativa [adimensional]

V_m Velocidade média na serpentina [m/s]

Letras Gregas

ΔT_m Diferença média de temperatura [°C]

μ Viscosidade dinâmica [kg/m.s]

π Número de pi ($\approx 3,1415$) [adimensional]

ρ Densidade [kg/m³]

σ Tensão normal média [N/m²]

σ_θ Tensão circunferencial média [N/m²]

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Gráfico do número de transplante realizados e a necessidade estimada no Brasil em 2015. FONTE: Associação brasileira de transplante de órgão (ABTO, 2015).....	16
FIGURA 2.1 Representação da circulação do perfusato pelo método de Langendorff.	29
FIGURA 2.2 Trocador de calor de serpentina. O trocador de calor fica imerso em um fluido com temperatura conhecida e controlada, e, dessa forma, troca calor com fluido passando dentro da serpentina. FONTE: (INCROPERA, 2011).	31
FIGURA 2.3 Exemplo de unidade de memória.	37
FIGURA 2.4 Equilíbrio de força na parede no envoltório de uma semiesfera com o raio interno a e o raio externo b . A tensão média na parede (σ) é resultante das ações da pressão interna (P_i) e externa (P_e) atuando nas respectivas paredes. FONTE: (FUNG, 2013).....	38
FIGURA 3.1 Circuito elétrico de cada relé no potenciômetro digital, com a posição de cada componente.	42
FIGURA 3.2 Esquema de ligações dos resistores nos relés do potenciômetro digital... ..	42
FIGURA 3.3 Potenciômetro digital instalado na MCE.....	43
FIGURA 3.4 Montagem do <i>encoder</i> óptico de disco.....	44
FIGURA 3.5 <i>Encoder</i> de disco montado na MCE.	44
FIGURA 3.6 Fluxograma do firmware de controle da rotação.	47
FIGURA 3.7 Decelularização utilizando o banho térmico. A decelularização ocorre em um béquer mergulhado na água aquecida à temperatura desejada, para realizar o controle da temperatura do experimento.	51
FIGURA 3.8 Cabeçote do banho termostático A100 da marca LAUDA.	52
FIGURA 3.9 Banho ultra termostático ECO RE 630G da LAUDA.	53
FIGURA 3.10 Resposta do trocador de calor, calculado para simular o funcionamento, no banho de 37,5 °C e recirculação de água inicialmente a 25 °C.....	55
FIGURA 3.11 Esquema completo do equipamento de decelularização.	55
FIGURA 3.12 Projeto da câmara de decelularização.....	57
FIGURA 3.13 Esquema de montagem para o 1º teste piloto.	60
FIGURA 3.14 Montagem dos eletrodos (indicados pelas setas).....	61
FIGURA 3.15 Esquema de montagem para 3º Teste piloto.....	62

FIGURA 3.16 Montagem para teste do balão. O balão (esquerda) foi inserido no ventrículo esquerdo, e a seringa (direita) foi responsável por injetar o volume controlado dentro o balão, à cada volume o valor da pressão interna medida pelo manômetro (acima) era anotado.	65
FIGURA 4.1 Trocador de calor de serpentina utilizado.....	68
FIGURA 4.2 Resposta do trocador de calor ao inserir perfusato à 24 °C.	68
FIGURA 4.3 Equipamento de decelularização durante processo de decelularização do coração de galinha: a) Câmara de decelularização b) Bomba peristáltica c) Trocador de calor de serpentina d) Reservatório de saída do perfusato e) Banho ultra termostático f) Reservatório de entrada de perfusato g) Medidor de temperatura h) Medidor de pressão.	70
FIGURA 4.4 Câmara de decelularização com adaptação para órgãos menores.	71
FIGURA 4.5 Foto tirada no primeiro instante da perfusão. Setas indicam a saída do perfusato junto com o sangue do átrio direito, através da abertura da veia cava. ...	72
FIGURA 4.6 Foto do coração no 1º teste piloto (escala em mm).	73
FIGURA 4.7 Foto do coração no 1º teste piloto (escala em mm).	74
FIGURA 4.8 Eletrodo em funcionamento no 2º teste piloto. Setas indicam os eletrodos.	75
FIGURA 4.9 Foto do coração no 1º teste piloto (escala em mm).	76
FIGURA 4.10 Fotos dos corações nos experimentos utilizando banho térmico (escala em mm).....	78
FIGURA 4.11 Fotos dos corações nos experimentos utilizando trocador de calor (escala em mm).....	80
FIGURA 4.12 Fotos do 3º experimento da segunda triplicata.	81
FIGURA 4.13 Fotos dos corações nos experimentos da montagem final (escala em mm).....	83
FIGURA 4.14 Resultados medidos no teste do balão para as montagens com banho térmico (azul), com trocador de calor de serpentina (vermelho), e montagem final (verde). A curva em preto mostra os resultados medidos para o controle, com corações de galinha sem o procedimento de decelularização. A curva em cinza mostra a pressão exercida apenas pelo látex do balão utilizados em todos os experimentos.....	84
FIGURA 4.15 Imagens da microscopia ótica com corante H&E (escala em 100µm)...	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	Valores medidos para vazão por rotação da bomba de rolete	45
TABELA 4.1	Massas dos corações nos experimentos utilizando banho térmico	77
TABELA 4.2	Massas dos corações nos experimentos utilizando trocador de calor de serpentina.....	79
TABELA 4.3	Massas dos corações nos experimentos da montagem final	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Comum
CPU	Unidade Central de Processamento
DEMEC	Departamento de Engenharia Mecânica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra cético
Epitopo Gal	Galactose- α - (1,3) –galactose
EUA	Estados Unidos da América
GAG	Glicosaminoglicanos sulfatados
H&E	Hematoxilina-Eosina
LCD	Display de cristal líquido
LED	Diodo emissor de luz
MCE	Máquina de circulação extracorpórea
MEC	Matriz extracelular
NA	Normal aberto
NF	Normal fechado
NTIRE	Eletroporação irreversível não térmica
PBS	Tampão fosfato-salino
PID	Proporcional, integral e derivativo
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PPGMEC	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TBP	Fosfato de tributilo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

Uma dificuldade crítica da engenharia de tecidos é a criação de estruturas que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de um tecido tridimensional complexo ou mesmo de órgãos inteiros. Uma solução poderia ser utilizar a própria matriz extracelular do órgão, realizando a sua decelularização. Neste processo, ocorre a lise e remoção dos conteúdos celulares, criando um arcabouço bioartificial. Este estudo descreve um método para desenvolver, e validar, um equipamento para a realização da decelularização de órgão inteiro, utilizando o método de perfusão para transportar através do órgão o fluido de decelularização, o que permite a criação, *in vitro*, de um arcabouço acelular, que mantém a arquitetura tridimensional do órgão. O equipamento foi concebido para satisfazer diversos protocolos existentes, e pode modificar de forma controlada a pressão e o fluxo de perfusão, a temperatura de cada uma das etapas e o procedimento de canulação do órgão. O dispositivo foi testado com corações de galinha, e foi eficiente na execução do protocolo de decelularização usando o método de perfusão. O trabalho mostra toda a evolução do projeto e desenvolvimento, mostrando as melhorias e seus resultados. Para verificar a qualidade do tecido resultante do processo, os corações decelularizados foram avaliados quanto a sua estabilidade mecânica, e análises microscópicas e macroscópicas. Ao final, foi desenvolvido um equipamento capaz de realizar a remoção do conteúdo celular em corações e utilizar diferentes protocolos encontrados na literatura. Algumas alterações podem ser desenvolvidas para melhorar a eficiência do equipamento, e para decelularizar outros órgãos. Espera-se que o equipamento possa ajudar no estudo de caracterização e na melhoria do processo de remoção de células, além de permitir futuras adaptações para o processo de repovoamento e uso em heterogêneos tipos de órgãos.

Palavras Chave: Decelularização, Bioengenharia, Biomateriais, Decelularização de Órgão Inteiro, Processo de Perfusão.

1 INTRODUÇÃO

O transplante de órgão é uma solução definitiva nos casos de falhas e perdas funcionais do órgão do doente. Entretanto, a dificuldade de encontrar doadores tem aumentado a quantidade de mortes na fila de espera por um transplante. A FIGURA 1.1 mostra a quantidade de transplante realizada, comparada com a necessidade estimada de órgão no ano de 2015 (ABTO, 2015). Somando esses valores, a quantidade de pacientes que ainda estão esperando pelo órgão, é possível entender a seriedade desse problema. Ainda entre os pacientes que recebem um órgão para transplante, existe o risco de rejeição crônica, e os problemas relacionados com terapias imunossupressoras. Alguns avanços foram feitos na engenharia de tecidos, como em vasos sanguíneos (SHIN'OKA; IMAI; IKADA, 2001) e traqueia (MACCHIARINI et al., 2008), apesar de serem tecidos que não necessitam de uma rede vascular conectada à circulação principal, no momento do transplante. Órgãos inteiros como pulmão, rim, ou coração, selecionado para esse trabalho, precisam dessa rede vascular para realizar a distribuição interna de nutrientes e manutenção do pleno funcionamento.

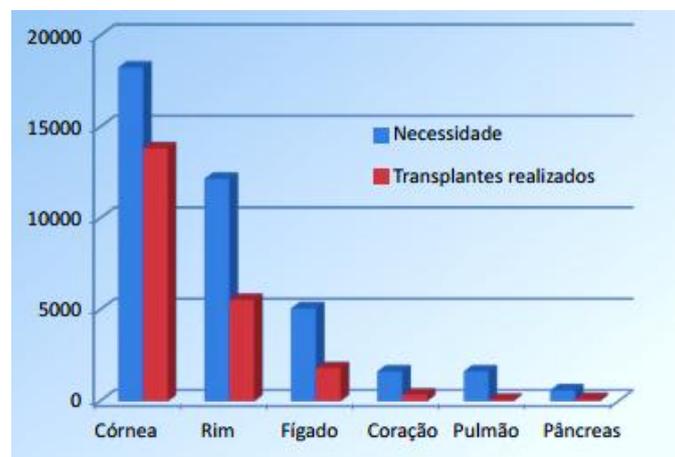


FIGURA 1.1 Gráfico do número de transplante realizados e a necessidade estimada no Brasil em 2015. FONTE: Associação brasileira de transplante de órgão (ABTO, 2015).

Os arcabouços são estruturas que provêm suporte para crescimento e manutenção de novas células. São compostos de matriz extracelular (MEC) e têm ampla variedade de aplicações na medicina reconstrutiva e regenerativa (BADYLAK; FREYTES; GILBERT, 2009). Atualmente, são amplamente utilizados em aplicações clínicas como em feridas (MOSTOW et al., 2005), reconstrução do pericárdio (BOYD et al., 2010), e válvulas cardíacas (DASI et al., 2009). A decelularização de órgão inteiros pode gerar

arcabouços acelulares que retêm a composição, a forma, e integridade mecânica do tecido ou órgão específico. Vários métodos têm sido criados para remover células de tecidos e órgão inteiro (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006), incluindo métodos físicos, químicos e enzimáticos.

A criação do arcabouço de órgão inteiro a partir da decelularização tem aplicação ampla na medicina regenerativa. A preservação das redes vasculares intactas e outras arquiteturas essenciais do órgão (por exemplo, válvulas cardíacas, rede glomerular e vias aéreas) fornece uma base ideal para a recelularização ou repovoamento celular. Os arcabouços resultantes podem ser utilizados em modelo de cultura *ex vivo* para criar um ambiente natural do órgão para modelagem de doenças (MISHRA et al., 2012), e para investigar a relação célula-MEC em tecidos saudáveis e doentes (NELSON; BISSELL, 2006). A MEC pode transmitir informações importantes para as células de repovoamento por meio dos fatores de crescimento retidos ou sugestões para nichos específicos.

Além disso, muitos estudos são conduzidos com o objetivo de desenvolver tecnologia para regeneração funcional de órgão inteiro decelularizado, utilizando células específicas, alcançando um órgão bioartificial regenerado funcional e disponível para transplante. Nesse sentido, já existem também estudos realizados com pulmões e rins de ratos que foram regenerados e transplantados (UYGUN et al., 2010; SONG et al., 2013). Os componentes bioquímicos que constituem a MEC são altamente conservados entre espécies, e os antigênicos de Gal-epítipo associado à matriz não provocam rejeição em transplante de órgão xenogênico, quando o doador e o receptor são de espécies diferentes, ou dificultam a recelularização (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011).

Porém, muito ainda deve ser feito para melhorar e facilitar completamente o desenvolvimento de protocolos de decelularização que forneçam o arcabouço desejado para a aplicação, e desenvolver a tecnologia necessária para criação de um órgão bioartificial plenamente funcional que possa ser transplantado, de forma segura, na espécie humana. Inclusive, desenvolver e melhorar o protocolo de decelularização e avaliar a MEC resultante do processo. O protocolo de decelularização ideal seria aquele que preservasse a composição, propriedades fisiológicas, integridade mecânica da

matriz extracelular e a estrutura vascular, além de, seletivamente, eliminar antígenos alogênicos (obtidos de um doador da mesma espécie) e xenogênicos tão bem quanto conteúdo celular e nuclear (MOMTAHAN et al., 2014).

1.1 Justificativa

Dentre os desafios da decelularização está a criação de um equipamento capaz de permitir a remoção completa dos *debris* celulares, cobrindo todas as regiões do órgão, utilizando a perfusão, e sem afetar a capacidade estrutural da MEC. Tal equipamento foi desenvolvido e validado no presente estudo. Existem, na literatura, diferentes métodos que permitem a decelularização do coração. Para o método de perfusão, existem ainda várias opções de diferentes protocolos publicados, não sendo muito claro quais desses apresentaram melhores resultados. Por isso, esse equipamento foi desenvolvido com objetivo de possibilitar a realização da maioria desses diferentes protocolos.

Uma vez desenvolvido, esse equipamento tem grande potencial para facilitar e promover o aperfeiçoamento das pesquisas e da utilização de biomateriais resultantes da decelularização, em diversas aplicações, além da possibilidade do seu uso para estudos de recelularização.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver um equipamento para realizar decelularização do coração pelo método de perfusão.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Projetar e desenvolver um controle de rotação digital para a bomba de rolete,
2. Projetar e desenvolver um sistema para controle de temperatura,
3. Projetar e montar o circuito de perfusão,
4. Projetar e desenvolver uma câmara de decelularização,
5. Realizar testes e validar o equipamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Protocolos de decelularização

Os protocolos de decelularização mais robustos e eficazes, geralmente, são uma combinação de ações física, químicas e enzimáticas. Protocolos mais complexos começam com a lise da membrana celular, utilizando tratamentos físicos ou soluções iônicas, seguido de separação dos componentes celulares da MEC, usando tratamentos enzimáticos. Posteriormente, é procedida a solubilização de componentes celulares citoplasmáticos e nucleares usando detergentes, e finalmente, a remoção de detritos celulares do tecido. Prosseguindo com a decelularização, todos os produtos químicos residuais devem ser removidos para evitar uma resposta adversa entre o tecido decelularizado e esse produto. A eficácia destes procedimentos pode ser beneficiada com o uso concomitante de métodos mecânicos.

A escolha dos agentes mais eficazes para a decelularização de cada tecido ou órgão vai depender de muitos fatores, incluindo o tipo de células do tecido, a densidade, teor de lipídios e a espessura. É importante ter em mente que cada agente de decelularização irá causar uma reação na MEC e provocar certo grau de danos à sua estrutura. Minimização desses efeitos indesejáveis é o objetivo de decelularização. O texto abaixo irá fornecer uma visão geral dos agentes normalmente utilizados e seus efeitos nos componentes celulares e extracelulares do tecido.

2.1.1 Agentes químicos

2.1.1.1 Detergentes

Detergentes iônicos, não iônicos, zwitteriônicos solubilizam as membranas celulares e desassociam as proteínas do DNA, portanto, são eficazes na remoção de material celular do tecido (COX; EMILI, 2006; GIUSTI et al., 2009). No entanto, esses agentes também desassociam as proteínas na MCE. A remoção dessas proteínas pelos detergentes aumenta com o tempo de exposição (DU et al., 2010). Utilizar uma combinação de detergentes aumenta a perda de proteína da MEC (ALHAMDANI et al., 2010), mas permite a sua completa remoção após a decelularização (CEBOTARI et al., 2010).

Triton X-100 pode remover efetivamente os resíduos celulares de tecidos mais espessos, como válvulas cardíacas, onde métodos enzimáticos e osmóticos são insuficientes, reduzindo a resposta imunológica adversa *in vivo*, porém com perdas de proteínas da MEC (MEYER et al., 2006). Pesquisas indicam que o dodecilsulfato de sódio (SDS) é mais eficaz do que o Triton X-100 para remover núcleos de tecidos e órgãos mais densos, preservando as características mecânicas do tecido (NAKAYAMA et al., 2010; LUMPKINS; PIERRE; MCFETRIDGE, 2008). A adição do SDS em um protocolo de decelularização pode ser o principal fator para aumentar a remoção de células (YANG et al., 2010), mas tem a desvantagem associada às perturbações estruturais (OTT et al., 2010; KASIMIR et al., 2003) e de eliminação do fator de crescimento (REING et al., 2010). Assim, SDS é normalmente mais eficaz para a remoção de resíduos de células de tecido em comparação com outros detergentes, mas também é mais prejudicial para a MEC (DU et al., 2010; KASIMIR et al., 2003; FUNAMOTO et al., 2010).

Para retiradas de lipídios do tecido, detergentes não iônicos, como o Triton X-100, são mais eficazes do que os detergentes iônicos, como o SDS (CEBOTARI et al., 2010; FEIL et al., 2006). Os detergentes zwitteriônicos, compostos químicos eletricamente neutros, são mais eficazes para a remoção de células de tecidos finos, tais como o pulmão (PETERSEN et al., 2010), e podem ser ineficazes em tecidos mais espessos, mesmo quando utilizados em combinação com SDS (GUI et al., 2009).

Cuidados devem ser tomados para limpar resíduos químicos da MEC, após a decelularização, particularmente nos detergentes como SDS, que penetram nos tecidos espessos ou densos. A presença, ainda que reduzida, desses agentes podem inibir ou até mesmo anular as propriedades benéficas de utilização da MEC como arcabouço acelular (FEIL et al., 2006). Mesmo os tecidos finos requerem múltiplas (mais de seis) lavagens para remover completamente os detergentes (CEBOTARI et al., 2010).

2.1.1.2 Ácidos e bases

Ácidos e bases podem causar ou catalisar a degradação hidrolítica de moléculas orgânicas. O ácido peracético é um agente de desinfecção comum que funciona como um agente de decelularização pela remoção de ácidos nucleicos residuais, com efeito mínimo sobre a composição e estrutura da MEC (GILBERT et al., 2008; HODDE et al.,

2007). O ácido acético danifica e remove colágeno, reduzindo também a resistência estrutural da MEC (DONG et al., 2009), mas não afeta os glicosaminoglicanos sulfatados (GAG).

As bases são raramente utilizadas exceto para remover pelos da derme durante as fases iniciais da decelularização. Elas são capazes de eliminar os fatores de crescimento da matriz, e causam reduções mais significativas das propriedades mecânicas da MEC, quando comparadas aos agentes químicos e enzimáticos (REING et al., 2010).

2.1.1.3 Soluções hipotônica e hipertônica

Soluções hipertônicas têm capacidade de desassociar as proteínas do DNA. As soluções hipotônicas causam a lise celular por efeitos osmóticos simples, com alterações mínimas nas matrizes moleculares (XU; CHAN; TIRUNAGARI, 2007). Para aumentar os efeitos osmóticos, é comum o tecido ser imerso alternadamente em soluções hipotônicas e hipertônicas em ciclos. Essas soluções ainda podem lavar o tecido, após a lise celular.

2.1.1.4 Álcoois

Álcoois, como glicerol, agem no tecido por desidratação e lise de células (PRASERTSUNG et al., 2008). O isopropanol, etanol e metanol são eficazes na remoção de lipídeos dos tecidos (FLYNN, 2010; BROWN et al., 2011). Cuidados devem ser tomados com tratamento de tecidos com etanol ou metanol, devido à sua capacidade de precipitar proteínas (JAMUR; OLIVER, 2010), sua utilização como fixadores em histologia e a possibilidade de causarem danos estruturais à MEC (COLE, 1984).

2.1.1.5 Outros solventes

A acetona também pode ser utilizada para remover lipídeos durante a decelularização (LUMPKINS; PIERRE; MCFETRIDGE, 2008; MONTOYA; MCFETRIDGE, 2009). Mas, assim como os álcoois, o seu uso deve ser limitado pela sua capacidade de agir como fixador de tecido (JAMUR; OLIVER, 2010) e danificar a estrutura da MEC

(COLE, 1984), especialmente quando as propriedades mecânicas da MEC forem de grande importância na aplicação.

O fosfato de tributilo (TBP) é um solvente orgânico com propriedades viricidas (HOROWITZ et al., 1992). Para a decelularização de tecidos muito densos como tendões, o TBP se mostra mais eficaz do que os detergentes, com efeitos variados na retenção de componentes e propriedades mecânicas da MEC (DEEKEN et al., 2011; CARTMELL; DUNN, 2000).

2.1.2 Agentes biológicos

2.1.2.1 Enzimas

As enzimas mais comumente usadas para a decelularização são nuclease, tripsina, colagenase, lipase, dispase, termolisina e α -galactosidase. Elas podem proporcionar alto grau de especificidade em respeito à remoção de resíduos de células ou componentes indesejáveis da MEC. Porém, isso também torna o processo de remoção completa de células com enzimas mais complicado, além de que o resíduo de enzimas pode prejudicar a recelularização e provocar respostas adversas imunitárias (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

As nucleases quebram as sequências de ácidos nucleicos e podem ajudar na remoção de nucleotídeos após a lise celular (PETERSEN et al., 2010; YANG et al., 2010; FUNAMOTO et al., 2010). Dentre esses, os mais eficientes são as endonucleases, que quebram a sequência de DNA no meio, preparando melhor os fragmentos para remoção (PETERSEN et al., 2010).

A tripsina é uma protease muito utilizada como agente de decelularização enzimático. Porém, as proteínas da MEC, como o colágeno, têm resistência limitada a ação da tripsina (WALDROP et al., 1979), por isso devem ser utilizadas com precaução. Em comparação com os detergentes, ela danifica mais a elastina e o colágeno além de ser mais lento para remover as células, mas preserva melhor o GAG (KASIMIR et al., 2003; GRAUSS et al., 2005; YANG et al., 2009). A remoção celular por tripsina costuma ser mais longa, porém ela pode ser usada para irromper a estrutura do tecido e facilitar a penetração dos agentes subsequentes, podendo ser desejado ou até necessário

a utilização de tripsina nos estágios iniciais do protocolo de decelularização (YANG et al., 2010).

A colagenase pode ser utilizada apenas quando a preservação da estrutura e a retenção máxima de colágeno não são fatores críticos para a aplicação desejada da MEC resultante. A lipase pode ser usada para ajudar na remoção de lipídeos, mas normalmente é insuficiente para a remoção completa quando utilizada sozinha (BROWN et al., 2011; FLYNN, 2010).

Após a retirada de lipídeos da derme, uma comparação direta entre decelularização com tripsina e dispase mostrou resultados superiores da dispase junto com maiores perturbações na MEC (PRASERTSUNG et al., 2008). O mesmo estudo mostrou também maior infiltração celular no tecido tratado com dispase, após quatro semanas de implantação subcutânea. Utilizar enzimas, como dispase ou termolisina, como agentes únicos de decelularização só é eficaz para remoção de células na superfície de um tecido, e ainda pode ser necessária abrasão mecânica para remover as células desse tecido (HOPKINSON et al., 2008).

Tecidos decelularizados xenogênicos podem ser tratados com α -galactosidase para reduzir a resposta imunológica ao antígeno galactose- α - (1,3) -galactose (epitopo Gal), que são componentes de glicolipídeos e glicoproteínas que podem ativar a resposta imunológica e o processo de rejeição (XU et al., 2008; BADYLAK; GILBERT, 2008).

2.1.2.2 Agentes não enzimáticos

O ácido etilenodiamino tetra cético (EDTA) e o ácido tetra cético de etilenoglicol (EGTA) são agentes de quelação que ajudam a dissociar as células de proteínas da MEC com retirada de íons de metal (GAILIT; RUOSLAHTI, 1988; KLEBE, 1974). É provável que agentes quelantes sejam capazes de destruir a interação proteína-proteína pelo mesmo mecanismo. Eles não são capazes de remover as células sozinhas, nem mesmo com ajuda de agitação mecânica (HOPKINSON et al., 2008), portanto são mais utilizados em combinação com enzimas ou detergentes (MEYER et al., 2006; YANG et al., 2010; FUNAMOTO et al., 2010), sendo desconhecida sua eficácia em combinação com soluções hiper ou hipotônicas (MEYER et al., 2006; YANG et al., 2010).

Alguns trabalhos também utilizam a ação de agentes citotóxicos para melhorar o protocolo de decelularização. Gillies et al. (2010) mostrou que o uso de *latruculin B* em tecidos densos, foi superior a utilização de DNase ou detergentes, tanto na remoção do DNA quanto na conservação da GAG, mostrando a conservação das propriedades mecânicas da MEC.

Inibidores de protease, como Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF), aprotinina e leupeptina, são usados para evitar danos indesejáveis a MEC, causadas pela liberação de proteases intracelulares durante a lise celular (MEYER et al., 2006; COURTMAN et al., 1994). Antibióticos, como penicilina, estreptomicina, anfotericina B e azida de sódio, podem ser utilizados para minimizar a contaminação microbiana durante a decelularização (OTT et al., 2008; UYGUN et al., 2010).

2.1.3 Agentes físicos

2.1.3.1 Pressão e força

As células na superfície de um tecido ou órgão (ex: bexiga urinária, intestino delgado, pele) podem ser removidas por abrasão mecânica em combinação com enzimas, solução hipertônica ou agente quelantes, os quais facilitam a dissociação das células da sua membrana basal próxima. No entanto, a estrutura e integridade dessa superfície são invariavelmente danificadas por qualquer aplicação direta da força mecânica (HOPKINSON et al., 2008).

A pressão hidrostática melhora a eficiência e diminui o tempo necessário para remoção celular com detergentes ou enzimas, em vasos sanguíneos e tecidos da córnea, embora permita a formação de cristais (FUNAMOTO et al., 2010; SASAKI et al., 2009). O aumento da temperatura associado à pressão, durante o processo de decelularização, impede a formação desses cristais, mas pode danificar a MEC devido ao aumento de entropia associado.

2.1.3.2 Temperatura

Técnicas de congelamento e descongelamento podem realizar a lise celular com eficiência dentro de tecido e órgão, mas os *debris* celulares resultantes devem ser

removidos em uma ação subsequente. Um único ciclo de congelamento e descongelamento diminui as respostas imunológicas, como a infiltração de leucócitos na MEC, em órgãos vasculares (LEHR et al., 2011). Múltiplos ciclos podem ser utilizados, durante a decelularização, e não há um aumento de forma significativa da perda de proteínas do tecido (PATEL et al., 2008; CORTIELLA et al., 2010). O congelamento produz alterações estruturais na MEC (PRASERTSUNG et al., 2008; HOPKINSON et al., 2008), e deve ser usado apenas quando esses efeitos sobre o resultado final são aceitáveis. Cada tipo de tecido irá responder de forma diferente ao congelamento e aquecimento, em tecidos robustos as alterações nas propriedades mecânicas da MEC são mínimas (ELDER; KIM; ATHANASIOU, 2010; JACKSON et al., 1988).

2.1.3.3 Eletroporação irreversível não térmica

Eletroporação irreversível não térmica (NTIRE) tem sido investigada como uma abordagem para a decelularização tecidual. Impulsos elétricos muito curtos são aplicados no tecido desestabilizando o potencial elétrico da membrana celular, causando a formação de microporos nas células desse tecido (LEE, 2006). A presença desses microporos conduz à perda da homeostase e à morte celular. Quando NTIRE foi aplicado em artérias carótidas de rato, *in vivo*, mostrou que os restos celulares foram lentamente removidos do tecido ao longo de dias, criando um tecido acelular em aproximadamente três dias (PHILLIPS; MAOR; RUBINSKY, 2010). Selecionando os parâmetros adequados para reduzir a produção de calor, a integridade e morfologia da MEC parecem ser mantidas, o que permite futura recelularização.

O NTIRE tem algumas limitações. As sondas são pequenas e limitam o tamanho do tecido que pode ser decelularizado. Além disso, pelo mecanismo de remoção celular, o processo de decelularização tem que ocorrer *in vivo*, o que limita significativamente as aplicações possíveis. No entanto, um estudo investigou o uso *in vitro* deste método combinando com perfusão vascular para decelularizar fígado suíno. Os resultados mostraram que a perfusão facilita a remoção de detritos celulares resultantes da eletroporação, mas, também, mostrou a distribuição geométrica limitada desse processo (SANO et al., 2010). A remoção celular é, portanto, outro limitante desse método, sendo que a presença de restos celulares, como DNA, irá causar uma resposta imunológica indesejável no hospedeiro.

2.1.4 Métodos de aplicação dos agentes de decelularização

A aplicação dos agentes de decelularização depende de fatores como as características do tecido (espessura e densidade), os agentes a serem utilizados, e aplicação clínica ou experimental final do tecido decelularizado. Antes do processo, o excesso de tecido adiposo pode ser removido para facilitar a remoção das células (FREYTES; STONER; BADYLAK, 2008; YANG et al., 2010). Forças diretas também podem ser aplicadas ao tecido para auxiliar a decelularização (SELLARO et al., 2009; BROWN et al., 2011). Em tecidos muito finos, como intestino e pericárdio, as técnicas de que utilizam o congelamento e descongelamento são mais comuns, com remoção mecânica de camadas indesejadas e rápida exposição a detergentes ou ácidos, que são facilmente removidos por uma lavagem posterior. Tecidos mais espessos, como a pele, exigem uma exposição mais ampla e provavelmente mais longa aos agentes bioquímicos. Tecidos e órgãos gordurosos, como pâncreas e cérebro, requerem adição de solventes lipídicos. A complexidade e duração do protocolo de decelularização são, normalmente, proporcionais ao grau de conservação e qualidade desejado para a MEC resultante, especialmente em tecidos compostos e órgãos completos.

2.1.4.1 Imersão e agitação

A diferença na duração de protocolos de decelularização entre perfusão e agitação comprova a eficiência obtida pela perfusão da rede vascular do tecido como método de decelularização, quando possível. No entanto, não são todos os tecidos que permitem um acesso simples e completo a sua vasculatura (HENDERSON et al., 2010), exigindo outras estratégias. Portanto, a imersão em agentes de decelularização é a abordagem mais comum, e esse método pode ser melhorado com a presença de agitação desse fluido com os agentes. Diversos protocolos têm sido descritos para uma ampla variedade de tecidos: válvulas cardíacas, vaso sanguíneo, tendão, nervo periférico, medula espinhal, cartilagem, traqueia, derme, bexiga urinária, dentre outros. A sua duração é determinada pela espessura do tecido, a densidade, o agente utilizado e a intensidade da agitação (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Alguns tecidos finos, como a bexiga urinária, podem ser decelularizados após um período relativamente curto de exposição ao ácido peracético, com agitação. Para esses

tecidos ou pequenos pedaços de outros tecidos, a remoção de DNA e a perda de constituintes da MEC são em função da velocidade de agitação (YANG et al., 2010; FREYTES; STONER; BADYLAK, 2008). Os tecidos mais densos (derme, tendão e traqueia) exigem prolongados protocolos de agitação, durando dias e até meses para completar a decelularização. Essa longa exposição e a combinação comum de detergentes, soluções enzimáticas e álcoois, aumentam também os danos causados a MEC, causando perda de capacidade estrutural e de receber novas células (CARTMELL; DUNN, 2000; ELDER; KIM; ATHANASIOU, 2010; XU et al., 2008).

2.1.4.2 Gradiente de pressão

Induzir gradiente de pressão no tecido, durante a decelularização, pode ser usado para complementar o tratamento enzimático, melhorando a preservação da ultraestrutura, estrutura detalhada de um espécime biológico (PRASERTSUNG et al., 2008). Uma pequena pressão transmural em tecidos ociosos pode forçar a difusão através do tecido mais denso e dirigir os resíduos celulares para fora da MEC. Estudos mostram resultados e comparações da utilização desse recurso (MONTROYA; MCFETRIDGE, 2009; PRASERTSUNG et al., 2008). Em geral, o uso de gradiente de pressão acelera o processo de decelularização e degrada o colágeno em menor grau do que o método de agitação.

2.1.4.3 Fluido supercrítico

O dióxido de carbono supercrítico, em uma temperatura e pressão acima do seu ponto crítico, é capaz de remover *debris* celulares quando transmitido pelo tecido com velocidade controlada, similar à secagem supercrítica. A utilização de apenas quinze minutos desse método causa uma eliminação qualitativa de DNA do tecido (SAWADA et al., 2008). O estudo observou uma redução de 80% de fosfolípidos. Os autores, porém, verificaram que o aumento do tempo de exposição não gerou novas reduções. As vantagens da decelularização com gases supercríticos incluem o uso de uma substância inerte para remoção das células e a alteração mínima das propriedades mecânicas da MEC (SAWADA et al., 2008).

2.1.4.4 Perfusão de órgão inteiro

Perfusão retrograda ou anterógrada tem sido bastante utilizada para decelularização de órgão inteiro, preservando grande parte da arquitetura tridimensional da MEC. Esta técnica utiliza as redes vasculares existentes nos órgãos, minimizando a distância de difusão de agentes químicos para a célula. Por isso, o método de perfusão é particularmente eficiente em fornecer os agentes de decelularização para todas as regiões do tecido.

O método de perfusão já foi testado com eficiência para decelularizar coração e gerar o arcabouço tridimensional com a geometria preservada do órgão nativo, conservando inclusive a rede vascular do tecido (OTT et al., 2008). Estudos sugerem que o tempo de perfusão necessário para o processo pode ser reduzido pelo aumento da pressão de perfusão. O aumento da pressão realiza a dilatação dos vasos diminuindo a distância de difusão para as células, e o aumento do fluxo, facilitando a remoção celular. Não houve evidências de que o aumento da pressão ou do fluxo tenha efeito deletério sobre as estruturas vasculares, sendo o estado final da MEC semelhante ao quando realizado em pressões inferiores (WAINWRIGHT et al., 2009).

Vários órgãos foram decelularizados com a utilização do método de perfusão: pulmão (PETERSEN et al., 2010; OTT et al., 2010; CORTIELLA et al., 2010), fígado (SHUPE et al., 2010; UYGUN et al., 2010), rim (ROSS et al., 2009; BAPTISTA et al., 2009). Cada órgão possui alguma particularidade para preparação e execução do método. O ponto crucial da perfusão é utilizar, da melhor forma, a rede vascular original do órgão para distribuir, com eficiência e rapidez, os agentes de decelularização em regiões de difícil acesso. Além de utilizar do cisalhamento mecânico causado pelo fluxo para auxiliar na remoção dos *debris* celulares.

2.2 Perfusão retrógrada do coração: o método de Langendorff

Conforme a descrição original de Langendorff (1895), a perfusão retrógrada é uma metodologia fundamentalmente inalterada, até os dias de hoje, sendo o coração perfundido pela canulação da aorta. O perfusato flui retrogradamente até a aorta, diferentemente do fluxo fisiológico normal, e a válvula aórtica é então fechada sobre

pressão. Com uma coluna de perfusato no interior da aorta, a vasculatura arterial coronária é preenchida pelos dois óstios coronários (esquerdo e direito) em suas respectivas cavidades na raiz da aorta. O perfusato, em seguida, passa pelo leito vascular, e seguem pelas veias coronárias para o seio coronário, localizado sobre o folheto septal da válvula tricúspide, na parede posterior do átrio direito (FIGURA 2.1). Seguindo a drenagem livre no átrio direito para fora do coração, sucedendo, portanto, toda a perfusão sem qualquer enchimento de fluido das câmaras ventriculares, as quais permanecem “secas”.

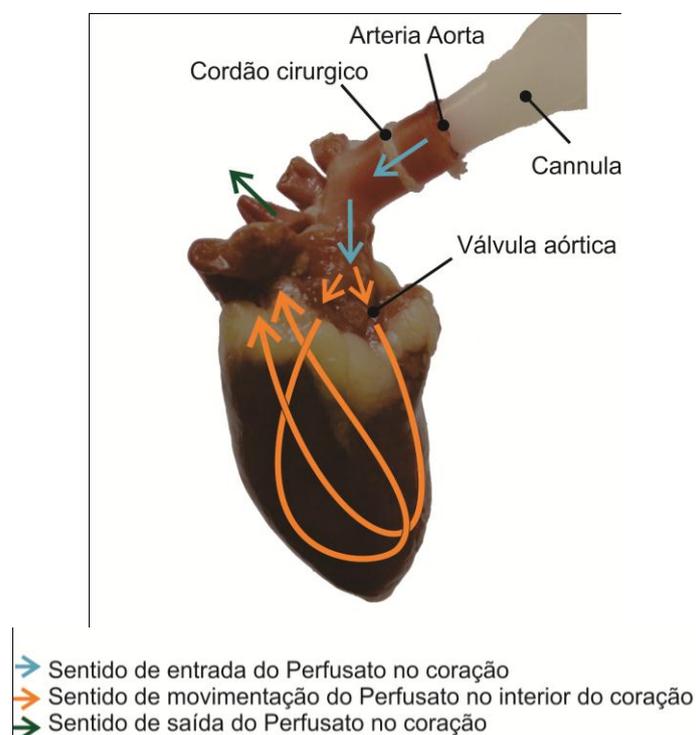


FIGURA 2.1 Representação da circulação do perfusato pelo método de Langendorff.

Na descrição original do método, o órgão foi perfundido à pressão constante. Esse modo de perfusão permanece comum, porém existe a opção de perfusão de fluxo constante. Ambos os modos podem oferecer vantagens, dependendo do protocolo executado. As grandes vantagens da preparação de Langendorff são razões para longevidade do método: a simplicidade, o baixo custo, a reprodutibilidade e a capacidade de utilizar a técnica para estudo do órgão isolado de outros sistemas que podem confundir medições fisiológicas.

Outra vantagem significativa do método de Langendorff é sua ampla aplicabilidade entre espécies. O método pode ser realizado em ampla gama de espécies de mamífero e aves, desde animais pequenos como rato, coelho e galinha até animais maiores como cão, porco, primatas, e, inclusive, o coração humano (BELL; MOCANU; YELLON, 2011; ROBERT; MIHAELA; DEREK, 2011). Dessa forma, esse método, flexível e simples, foi muito importante para estudos da fisiologia do miocárdio, e amplamente adotado para diversas pesquisas.

2.2.1 Modos de perfusão

Existem dois principais modos de se controlar a perfusão retrógrada para o coração: o controle de pressão constante ou de vazão constante. O primeiro pode ser alcançado facilmente, e com baixo custo, mantendo a pressão hidrostática constante. Que pode ser alcançada pelo peso de uma coluna do fluido posicionando o reservatório a uma distância conhecida sobre a cânula de perfusão (GUYETTE et al., 2014). Essa é a solução mais simples, mas certamente não é a única solução para alcançar a pressão constante. Ela também pode ser obtida e conservada adicionando um transdutor de pressão no sistema. Esse transdutor deverá ser utilizado como alimentador negativo de um sistema de controle da pressão, utilizando, por exemplo, uma bomba peristáltica como atuador. Essa configuração é preferível quando se tem disponibilidade limitável ou pelos altos preços do fluido de decelularização. Porém, o modo de pressão constante não é o mais apontado para realizar a remoção das células, ele é muito utilizado quando se faz a perfusão retrograda de Langendorff para estudar a auto regularização do tônus coronariano e para estudos de isquemia miocárdica (ROBERT; MIHAELA; DEREK, 2011).

Para decelularização, principalmente de órgãos maiores, o modo de fluxo constante se torna mais atrativo por ser mais simples e não necessitar de um sistema de controle. É utilizada apenas uma bomba calibrada em sua rotação para fornecer o fluxo constante. As bombas de deslocamento positivo de roletes são uma das mais usadas para perfusão, tanto de órgão como em pacientes, principalmente por serem simples e não haver contato direto entre as partes da bomba e o fluido. Outras vantagens são a precisão em relação à vazão, durabilidade, versatilidade, a inexistência de contaminação (pois o

fluido permanece dentro da mangueira em todo circuito de bombeamento), e a capacidade de fornecer o fluxo contínuo com pouca vibração.

2.3 Trocador de calor

Trocadores de calor de tubo em formatos espiral, ou serpentina, consistem em uma ou mais serpentinas (de tubos circulares) dispostas em uma carcaça. Nesses trocadores de calor uma grande superfície pode ser acomodada em um pequeno espaço utilizando as serpentinas (FIGURA 2.2).

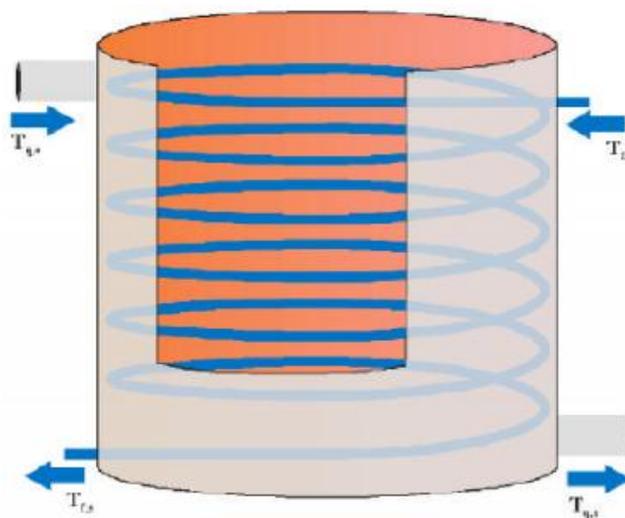


FIGURA 2.2 Trocador de calor de serpentina. O trocador de calor fica imerso em um fluido com temperatura conhecida e controlada, e, dessa forma, troca calor com fluido passando dentro da serpentina. FONTE: (INCROPERA, 2011).

A taxa de calor (q [W]) transferido pelo trocador pode ser determinada pela Lei do resfriamento de Newton (EQUAÇÃO 2.1).

$$q = U A \Delta T_m \quad (2.1)$$

onde A é a área de superfície da troca de calor [m^2], ΔT_m é a diferença média de temperatura entre os fluidos internos e externos ao tubo [$^{\circ}C$], e U é o coeficiente global de troca térmica [$W/m^2.K$] (INCROPERA, 2011).

O coeficiente de troca global por sua vez depende de diversos fatores como a capacidade de troca de calor dos fluidos e a resistência oferecida pela parede. O valor de U pode ser calculado pela EQUAÇÃO (2.2).

$$h_0 = \frac{U \times h_{i0}}{h_{i0} - U} \quad (2.2)$$

sendo, h_{i0} o coeficiente de película interno de transferência de calor corrigido para o diâmetro externo [$W/m^2.K$]; h_o o coeficiente de película externo de transferência de calor [$kcal/h.m^2.°C$]. O coeficiente de película interno pode ser estimado pela EQUAÇÃO (2.3) (LOPES et al., 2013).

$$h_i = 1429 \times (1 + 0,0146 T_{qm}) \frac{V_m^{0,8}}{D_i^{0,2}} \quad (2.3)$$

Em que, h_i é o coeficiente de película interno de transferência de calor [$W/m^2.K$]; T_{qm} , a temperatura média do fluido quente ($°C$); V_m , a velocidade média na serpentina (m/s); D_i , o diâmetro interno da tubulação (m).

O coeficiente de película interno de transferência de calor deve ser corrigido para a área externa da tubulação da serpentina, usando a relação entre os diâmetros interno e externo. Para serpentinas helicoidais, é recomendado que o h_o seja multiplicado por um fator de correção conforme a EQUAÇÃO (2.4) (GEANKOPLIS, 2009).

$$f = \left(1 + 3,5 \frac{D_E}{D_h}\right) \quad (2.4)$$

sendo, f , o fator de correção; D_h , o diâmetro da helicoide (m).

O coeficiente de película externo (h_o) é calculado por meio da equação de Sieder-Tate (COUPER; PENNEY; FAIR, 2005), conforme ilustra a EQUAÇÃO (2.5), entretanto, é necessário determinar os expoentes a , b e c e a constante K para a construção do modelo semi empírico.

$$Nu = K (Re)^a (Pr)^b (Vi)^c \quad (2.5)$$

sendo, Nu, o número de Nusselt; Re, o número de Reynolds; Pr, o número de Prandtl; V_i , a correlação entre densidades; K, a constante de proporcionalidade; a, b e c, os expoentes. A equação de Sieder-Tate pode ser escrita como (EQUAÇÃO 2.6):

$$\frac{h_o D_t}{k_f} = K \left(\frac{D_{imp}^2 N \rho_f}{\mu_f} \right)^a \left(\frac{c_{pf} \mu_f}{k_f} \right)^b \left(\frac{\mu_f}{\mu_w} \right)^c \quad (2.6)$$

sendo, D_t o diâmetro interno do tanque [m]; k_f a condutividade térmica do fluido frio [W/m.K]; D_{imp} o diâmetro do impelidor [m]; N a rotação do impelidor [rps]; ρ_f a densidade do fluido frio [kg/m³]; μ_f a viscosidade dinâmica do fluido frio [kg/m.s]; c_{pf} o calor específico do fluido frio [J/kg.K]; μ_w a viscosidade dinâmica do fluido frio na temperatura da parede [Kg/m.s].

Para serpentinas helicoidais, pode ser adotado o valor 0,37 para o expoente b, e o expoente c deve ser calculado pela EQUAÇÃO (2.7) (COKER, 2007; COUPER; PENNEY; FAIR, 2005).

$$c = \frac{0,714}{\mu_m^{0,21}} \quad (2.7)$$

sendo, μ_m a viscosidade dinâmica média do fluido frio no ensaio [cP].

De Maerteleire (1978), usando serpentina helicoidal e impelidor axial, estabeleceu os valores dos coeficientes b e c como 0,295 e 0,192 respectivamente e obteve 0,534 para o coeficiente a e 1,3791 para a constante K.

2.4 Controle proporcional integral derivativo

Os controladores Proporcional, Integral e Derivativo (PID) são controladores com *feedback* muito utilizados em automação industrial. Esses controladores calculam um erro entre o valor medido na saída e o valor desejado no processo (OGATA, 2003). Assim, o controlador tenta diminuir o erro que foi gerado pela saída, ajustando suas entradas.

A expressão do PID é dada pela EQUAÇÃO (2.8)

$$u(t) = MV(t) = K_p e(t) + K_i \int_0^t e(\tau) d\tau + K_d \frac{d}{dt} e(t) \quad (2.8)$$

onde:

- $u(t)$ é a saída em relação ao tempo
- $e(t)$ é o erro em relação ao tempo
- K_p , K_i , e K_d são respectivamente as constantes proporcional, integral e derivativa

2.4.1 Proporcional

O controlador proporcional consiste essencialmente num amplificador com ganho ajustável. Uma característica importante dessa ação de controle é a existência de um erro residual permanente sempre que ocorre uma alteração da entrada. O erro residual, que depende do valor de K_p e da entrada, pode ser reduzido com o aumento da constante proporcional. Quanto maior a constante K_p , maior será o ganho do erro e mais instável será o sistema. Mas se a constante K_p for muito pequena, menor será o seu tempo de resposta (OGATA, 2003).

2.4.2 Derivativo

O fato do sinal de controle ser proporcional à taxa de variação do erro implica que a ação derivativa nunca possa ser usada sozinha, uma vez que só responde a regime transiente. A adição da ação derivativa e a proporcional resultam num controlador altamente sensível, uma vez que aquele primeiro, ao responder a uma taxa de variação do erro, permite correções antes do erro aumentar. A função derivativa retarda a taxa de variação de saída do controlador. Essa função diminui o *overshoot* da função anterior e melhora a estabilidade do controlador. Por outro lado, a função derivativa causa um retardo na resposta e é muito suscetível à ruídos. Isto acontece porque essa função amplifica o ruído e caso o ruído e o ganho K_d sejam muito grandes, podem causar instabilidade no controlador (OGATA, 2003).

2.4.3 Integral

A componente integral, ao adicionar um polo na origem da função de transferência do controlador, elimina o erro em regime estacionário, independente do sistema a ser controlado. Mas, se por um lado a ação integral elimina o erro estacionário, por outro, aumenta o tempo de estabelecimento e piora a estabilidade relativa, o que, usualmente, é indesejável. Como consequência, a ação proporcional deve ser reduzida sempre que esteja em combinação com a ação integral (OGATA, 2003).

A função integral soma todos os erros instantâneos e a somatória é multiplicada pela constante K_i . A função integral do controlador PID acelera o movimento do processo até o ponto desejado e elimina o erro que ocorre na função anterior. Como a função soma dados instantâneos, o resultado do processo pode ultrapassar o ponto desejado, ocorrendo o *overshoot*.

2.4.4 Ajuste dos valores das constantes

O controle normalmente é otimizado quando se utiliza as três variáveis do controlador PID, os valores ideais para as constantes variam de acordo com a planta que deve ser controlada. Os valores podem ser estimados matematicamente, porém, em vários casos, é inviável obter a função de transferência matemática da planta, por sua complexidade. Nesses casos, o mais comum é realizar o ajuste dos valores das constantes por tentativa e erro, como no método de Ziegler-Nichols (OGATA, 2003).

Uma vez que um engenheiro entende o significado de cada parâmetro de ganho, o método de tentativa e erro torna-se relativamente fácil. Neste método, os termos K_i e K_d têm seus valores definidos inicialmente em zero e o ganho proporcional é aumentado até a saída do *loop* começar a oscilar. Quando se aumenta o ganho proporcional, o sistema torna-se mais rápido, mas deve-se tomar cuidado para não o tornar instável. Uma vez que K_p foi definido para obter uma resposta rápida desejada, o termo integral é aumentado a fim de parar as oscilações. O termo integral reduz o erro de estado estacionário, mas aumenta o *overshoot*. Certo valor de *overshoot* é sempre necessário para um sistema rápido de modo que possa responder às mudanças imediatamente. O termo integral é novamente ajustado para atingir um mínimo erro em regime

permanente. Uma vez que o K_p e K_i foram definidos para que o sistema de controle seja rápido com regime permanente constante e com erro mínimo, o termo derivativo é aumentado até que o *loop* seja aceitavelmente rápido em relação ao seu ponto de referência. Aumentar o termo da derivada diminui o overshoot, aumentando o ganho, mantendo a estabilidade e ainda fazendo com que o sistema seja altamente sensível ao ruído. Muitas vezes, os engenheiros necessitam fazer a compensação de uma característica de um sistema de controle para melhorar outro, e assim atender às suas necessidades.

2.5 Microcontrolador

A tecnologia encontrada nos microcontroladores atuais tem seus primórdios no desenvolvimento dos circuitos integrados. Esta tecnologia permite armazenar centenas de milhares de transistores dentro do encapsulamento de um único chip. Esta característica passou a ser pré-requisito no projeto de microprocessadores. Os primeiros computadores foram construídos utilizando um microprocessador central com dispositivos periféricos ligados a ele, tais como memória, barramento de dados, temporizadores, entre outros.

Com o crescimento do nível de integração, foi possível o aparecimento de circuitos integrados que continham, num único chip, o microprocessador já com seus periféricos. Isto significou um microcomputador dentro de um único chip, que mais tarde passou a ser designado como microcontrolador (MICROCHIP, 2003).

2.5.1 Estrutura de um Microcontrolador

Como citado anteriormente, o microcontrolador possui em seu encapsulamento um microprocessador e seus periféricos. Ele não tem a mesma característica dos circuitos integrados comerciais, que já saem de fábrica prontos para funcionar. No microcontrolador é necessário um projeto de gerenciamento de sua estrutura, para o seu perfeito funcionamento (MICROCHIP, 2003). Esta estrutura é composta pelo próprio hardware e um programa de gerenciamento (software).

2.5.2 Unidade de Memória

É a parte do microcontrolador com a função de armazenamento dos dados. Cada dado possui um nome e um endereço. Desta forma, para acessar o conteúdo de um dado, basta saber o seu endereço (FIGURA 2.3).

Com o acesso a um endereço de memória, podem ser realizadas duas operações. A de leitura (*read*), que significa ver o conteúdo dos dados, e a de escrita (*write*) que significa em inserir ou alterar um conteúdo dos dados. A designação da operação a ser feita em cada endereço é determinada pelo programa.

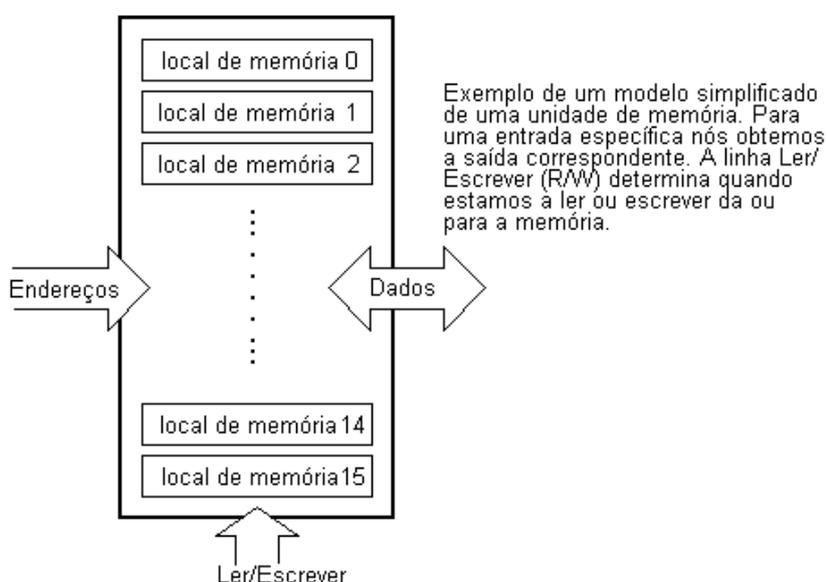


FIGURA 2.3 Exemplo de unidade de memória.

FONTE: (MICROCHIP, 2003) adaptado.

2.5.3 Unidade Central de Processamento (CPU)

É o microprocessador propriamente dito. Ela possui três locais de memória denominadas registradores que possibilitam a capacidade de somar, subtrair, multiplicar e dividir seus conteúdos de um local de memória para outro. Os registradores são, portanto, locais de memória cujo objetivo é o de executar operações matemáticas ou quaisquer outras operações com dados, quaisquer que sejam o local onde se encontrem.

Barramentos são os caminhos físicos de troca de dados entre os periféricos e a unidade central de processamento. São compostos por um grupo de 8, 16 ou mais fios. Existem

dois tipos de barramento: barramento de dados e de endereço. O barramento de dados serve para transmitir endereços da CPU para a memória e o seu número de linhas depende da quantidade de memória que pretendemos endereçar. O barramento de endereço serve para ligar todos os blocos dentro do microcontrolador e o seu número de linhas depende do tamanho da palavra de dados, no caso do PIC18f4550 é igual a oito (MICROCHIP, 2003).

2.5.4 Unidade de Entrada/Saída (I/O)

É a unidade que faz a comunicação como o mundo exterior, ou seja, ela controla o trânsito de dados entre o barramento e os pinos de ligação do microcontrolador. Estas ligações são denominadas portas. Existem três tipos de portas: de entrada, de saída e de entrada e saída. Uma porta funciona como um endereço de memória, podendo-se fazer nela as mesmas operações de leitura, escrita ou ambos (MICROCHIP, 2003).

2.6 *Lei de Starling do coração*

Assumindo que o ventrículo esquerdo possa ser aproximado por um envoltório semiesférico com espessura conhecida (FIGURA 2.4), com o raio interno a e o raio externo b conhecidos. P_i é a pressão que atua no interior da semiesfera (normalmente a pressão sanguínea) e P_e a pressão externa (pressão do pericárdio), ambas assumidas como uniformes.

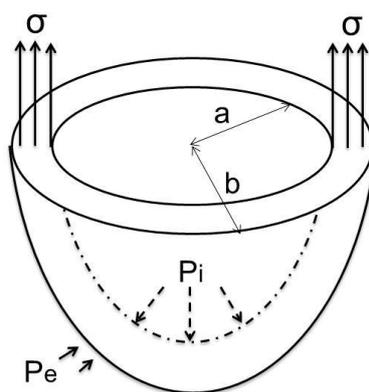


FIGURA 2.4 Equilíbrio de força na parede no envoltório de uma semiesfera com o raio interno a e o raio externo b . A tensão média na parede (σ) é resultante das ações da pressão interna (P_i) e externa (P_e) atuando nas respectivas paredes. FONTE: (FUNG, 2013).

Considerando o equilíbrio de forças na direção vertical, a força agindo para baixo é igual P_i vezes a área projetada πa^2 , as forças agindo para cima são $P_e \pi b^2$ e o produto da tensão média na parede σ e a área onde ela age, $\pi (b^2 - a^2)$. Em uma situação de equilíbrio, a EQUAÇÃO (2.9) mostra o equilíbrio das forças (FUNG, 2013).

$$\sigma(b^2 - a^2) = P_i a^2 - P_e b^2 \quad (2.9)$$

Conseqüentemente, a tensão circunferencial média na parede do coração é dada pela EQUAÇÃO (2.10).

$$\sigma_\theta = \frac{P_i a^2 - P_e b^2}{b^2 - a^2} \quad (2.10)$$

A maior tensão é obtida quando P_i é igual a pressão máxima sistólica. A pressão externa P_e , normalmente, é próxima da pressão pleural, que é menor do que a pressão atmosférica (negativa). Mas pode ficar positiva em casos de doenças, como o acúmulo de fluido no pericárdio. O material da parede do coração é considerado incompressível, portanto o volume da parede do coração, $\frac{2}{3}\pi(b^3 - a^3)$, permanece constante. Dessa forma, b depende de a , e, como podemos ver na EQUAÇÃO (2.10), a tensão máxima agindo sobre a parede é diretamente proporcional a $P_i a^2$. Então, quanto maior pressão sistólica ou o tamanho do coração, maior a é a tensão circunferencial (FUNG, 2013).

Logo, podemos deduzir que um crescimento anormal do coração e o aumento da pressão irão aumentar a tensão na parede do órgão, podendo levar à hipertrofia do órgão. Igualmente, a pressão sistólica é determinada pela tensão da parede, que acontece devida a contração muscular. As tensões de tração máxima, que podem ser geradas por uma contração isométrica dos músculos cardíacos, variam com o comprimento dos sarcômeros. O número de sarcômeros no coração é fixo e seus comprimentos são proporcionais ao raio do coração. Logo, se o raio do coração aumenta, a tensão muscular irá aumentar, como também, a pressão sistólica (FUNG, 2013). Esse fenômeno é conhecido como lei de *Starling* do coração.

Usando a mesma aproximação, podemos também encontrar uma relação para o valor da tensão circunferencial máxima $\sigma_{\theta,máx}$ dada pela EQUAÇÃO (2.11), considerando a pressão externa (P_e) nula, e distribuição de tensão encontrada por Lamé (1852).

$$\sigma_{\theta,máx} = \frac{P_i}{2} \frac{2a^3 + b^3}{b^3 - a^3} \quad (2.11)$$

3 METODOLOGIA

Nessa seção serão descritos todos os diversos dispositivos presentes no equipamento e também a metodologia dos testes experimentais utilizados para avaliar a funcionalidade do equipamento.

3.1 Alterações na máquina de circulação extracorpórea (MCE)

Para a bomba de rolete foi utilizado um Equipamento Cardiovascular (5M6002; Travenol Laboratories; EUA) utilizado em hospitais para realizar circulação extracorpórea, cedida pelo Dr. Marcos Vale. Foram realizadas modificações para adequar o funcionamento e realizar o processo de decelularização. Dentre as modificações estão a inclusão de um medidor de rotação, a alteração do controle de velocidade de potenciômetro analógico operado manualmente para um potenciômetro digital que pode ser acionado por um microcontrolador, e a adição do microcontrolador para monitorar e controlar o funcionamento de toda a bomba de rolete.

Com o objetivo de oferecer uma interface homem máquina, foram adicionados também um visor LCD e botões, para respectivamente, apresentar os valores estimados de velocidade de rotação e a vazão oferecida pela bomba de rolete, e controlar a sua rotação.

3.1.1 Potenciômetro digital

Para permitir que a rotação da máquina de circulação extracorpórea (MCE) pudesse ser gerida por um dispositivo microcontrolado, por meio de uma comunicação digital, o potenciômetro analógico manual original da MCE foi substituído por um potenciômetro digital desenvolvido no laboratório utilizando componentes eletrônicos simples.

O esquema eletrônico do potenciômetro digital foi montado utilizando uma série de resistores ligados a relés que permitem adicionar ou remover determinado resistor do circuito por onde passa a corrente.

Para cada relé, o seguinte circuito foi criado (FIGURA 3.1).

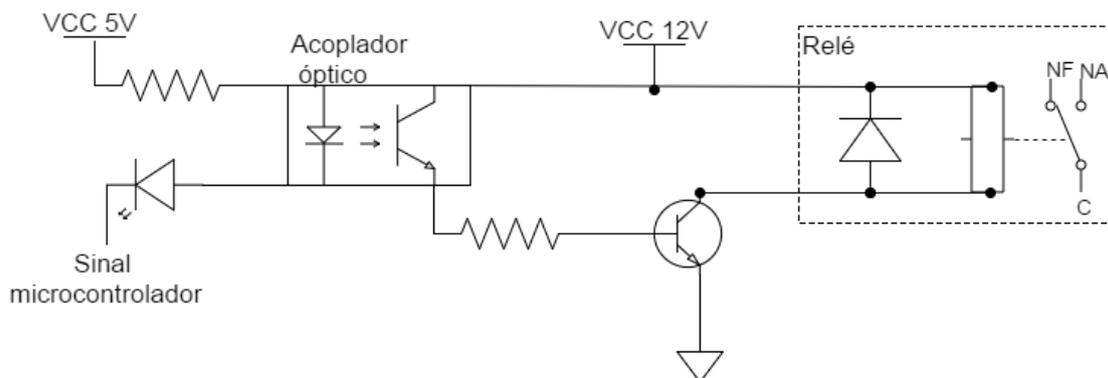


FIGURA 3.1 Circuito elétrico de cada relé no potenciômetro digital, com a posição de cada componente.

O circuito é composto por fontes de energia de 5 e 12 volts um relé e resistores, além de um acoplador óptico que protege o microcontrolador de altas correntes que podem ser causadas pela bobina do relé. Dessa forma, o sinal do microcontrolador é capaz de acionar o relé e definir se a chave estará ligada no normal fechado (NF) ou no normal aberto (NA).

As resistências foram conectadas ligando o NF de um relé com o comum (C) do seguinte, e um jumper de resistência desprezível ligando o NA com o C do relé seguinte, em cada um dos relés (FIGURA 3.2).

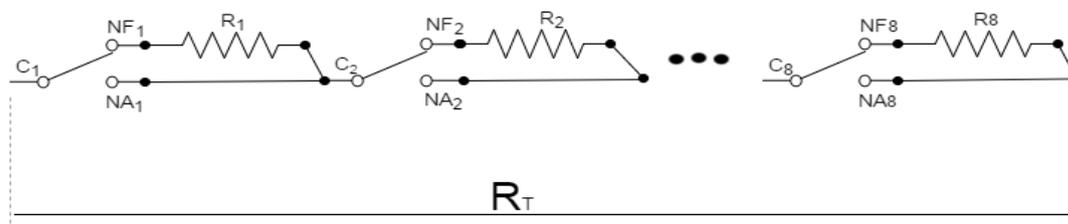


FIGURA 3.2 Esquema de ligações dos resistores nos relés do potenciômetro digital.

Dessa forma, quando o relé está na posição de normalmente fechado (NF) a corrente passa pelo resistor antes de chegar ao relé seguinte. Quando o relé é acionado passa para a posição de normalmente aberto (NA), em que a corrente vai diretamente para o relé seguinte passando por uma resistência desprezível do jumper.

Portanto, alterando os relés que estão ativos é possível alterar o valor da resistência total (R_T) do potenciômetro digital. Essa alteração no valor foi configurada para funcionar semelhante à lógica de contagem binária, tendo então um byte ou oito bits

(cada relé responsável por um bit). Isso significa que existem 256 possibilidades de combinações entre esses relés, para seguirem a ordem crescente, como uma contagem binária. O valor de cada resistor deverá possuir dobro de Ohms do resistor anterior e o primeiro resistor deverá ser 255 vezes menor do que o valor para R_T desejado. Para aplicação na MCE, o valor do R_T tem que ser próximo ao do potenciômetro original que é de 110 k Ω . A FIGURA 3.3 mostra o protótipo montado instalado na MCE.

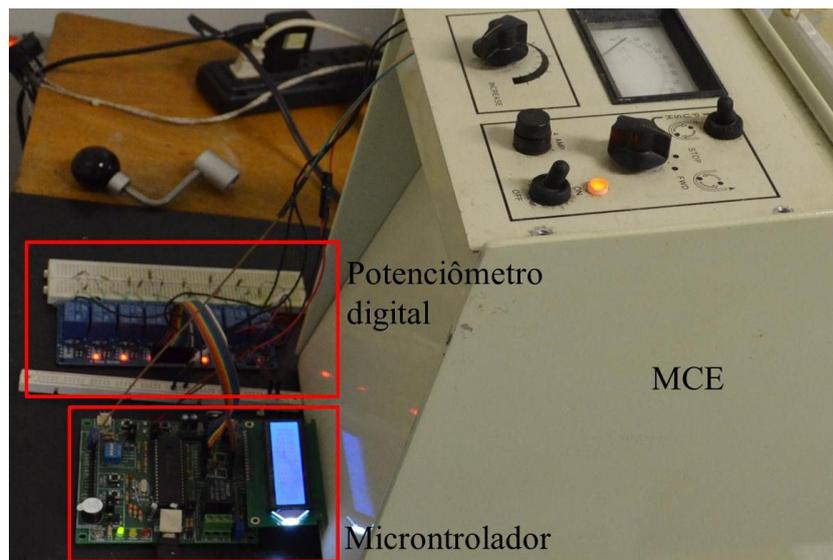


FIGURA 3.3 Potenciômetro digital instalado na MCE.

Para completar o funcionamento do potenciômetro digital, esse deve ser acionado por meio de uma comunicação paralela, que realiza o controle de cada relé diretamente e individualmente. Para esse fim, foi usado um microcontrolador PIC18F4550, que também foi usado para medir e controlar rotação da bomba de rolete atuando pelo acionamento do potenciômetro digital.

3.1.2 Medidor de velocidade de rotação do rolete

Para realizar a medição da velocidade de rotação no rolete, foi construído um *encoder* de disco, composto por emissor e receptor de infravermelho, montado juntamente com um disco que possui diversos furos igualmente espaçados entre si, conforme FIGURA 3.4.

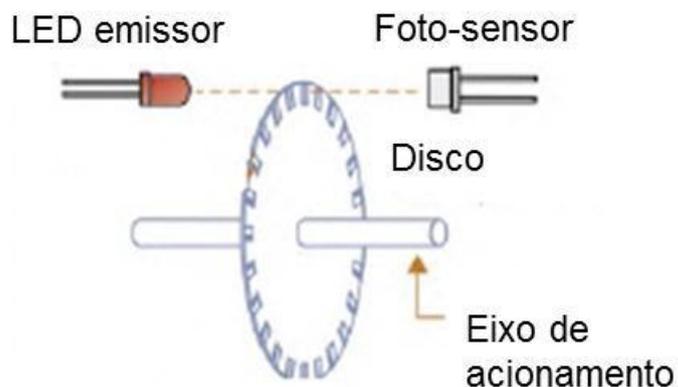


FIGURA 3.4 Montagem do *encoder* óptico de disco.

FONTE: Site www.mecatronicaatual.com.br/educacao/1272-como-funcionam-os-encoders (acessado 19/10/2015).

O disco com 36 furos (um furo a cada 10 graus) é diretamente ligado ao eixo de rotação e posicionado entre o emissor e o receptor de infravermelho (SG23FF; Kodenshi Korea; Coreia do Sul), dessa forma, cada vez que o infravermelho emitido passa por um furo do disco, o receptor envia um sinal de pulso. Esse pulso quando recebido pelo microcontrolador (PIC18F4550; Microchip; EUA), e juntamente com cálculos do seu *timer* interno possibilita medir com precisão a rotação do disco, por meio da medição de pulsos por unidade de tempo, posteriormente, transformado em rotações por minuto (RPM). A FIGURA 3.5 mostra a montagem do *encoder* de disco no interior da MCE.



FIGURA 3.5 *Encoder* de disco montado na MCE.

3.1.3 Estimativa da vazão média da bomba de rolete

Para realizar a estimativa de vazão da bomba de rolete foi realizado um experimento simples que consiste em medir a quantidade de água bombeada por poucos giros do rolete. Nesse experimento, foram utilizados três diâmetros de tubos de silicone semelhante aos que podem ser usados para a decelularização. Os diâmetros escolhidos foram de $\frac{3}{8}$ ", $\frac{1}{4}$ " e $\frac{1}{2}$ ". Para medir o volume deslocado pela bomba, foi usada uma proveta graduada com resolução de 5 mL.

Para evitar influência da oclusão, para cada diâmetro de tubo foi realizada a calibragem da oclusão conforme recomendado pelo fabricante. A temperatura da sala foi controlada em 24°C, durante todo experimento, e o reservatório foi mantido na mesma altura dos roletes. Os valores medidos em mililitros para cada tubo estão apresentados na TABELA 3.1.

TABELA 3.1 Valores medidos para vazão por rotação da bomba de rolete

Tubo	1 rotação	5 rotações	10 rotações	Média por rotação
1/2"	40 ± 5 mL	200 ± 5 mL	405 ± 5 mL	40 ± 3 mL
3/8"	30 ± 5 mL	125 ± 5 mL	250 ± 5 mL	27 ± 3 mL
1/4"	15 ± 5 mL	65 ± 5 mL	125 ± 5 mL	13 ± 3 mL

A bomba de rolete usada possui um batente em formato semicircular com diâmetro de 143 mm. Os valores da média obtidos nesse experimento foram usados para apresentar uma estimativa da vazão na bomba a ser apresentada no visor do controlador, multiplicando o valor da vazão médio pela rotação medida, obtendo ao final a vazão em mL/min.

Além das incertezas já citadas acima, ainda influenciaram no volume de líquido bombeado a viscosidade do fluido, os diâmetros interno e externo da mangueira, as perdas de carga maiores e menores no circuito de perfusão, entre outros, que dificultam a precisão da medição da vazão por métodos indiretos. Como o processo de decelularização, testado nesse trabalho, não é muito sensível a pequenas variações na

vazão, os valores apresentados pelo microcontrolados foram parâmetros aceitáveis utilizados para estimar e avaliar a rotação que foi usada durante cada etapa do processo de decelularização.

3.1.4 Circuito microcontrolado

Para conseguir medir velocidade de rotação e implementar um controlador para essa velocidade, acionando corretamente o potenciômetro digital ligado à MCE, foi utilizado um circuito microcontrolado com o PIC18F4550 responsável pelos processamentos dos dados, leituras do sensor e acionamentos do atuador.

O circuito é bastante simples e composto apenas pelo microcontrolador, uma interface homem máquina (quatro botões e visor LCD), ligado ao *encoder* de disco e ao potenciômetro digital. Pela facilidade do circuito já impresso na placa com entradas e saídas fornecidas, bem como alimentação de energia, e a facilidade para gravar o firmware usando o acessório de USB, foi utilizado o kit didático E-P18 (FIGURA 3.3) fornecido pela SEMPRA TECNOLOGIA®.

3.1.5 Elaboração do firmware de controle de rotação.

Para controlar a rotação da MCE uma rotina programada foi gravada no microcontrolador. O código do algoritmo foi criado utilizando linguagem C, e compilado com o software CCS®. A FIGURA 3.6 mostra o fluxograma do algoritmo criado. Este código está detalhado no Anexo A.

Com esse algoritmo, esperou-se realizar todo o controle da rotação dos roletes, realizando leitura da velocidade de rotação, calculando um ajuste PID e atuando por meio do potenciômetro digital. Para isso, foram utilizados todos os acessórios montados e criados, que foram citados anteriormente, como o *encoder* de disco e o potenciômetro digital.

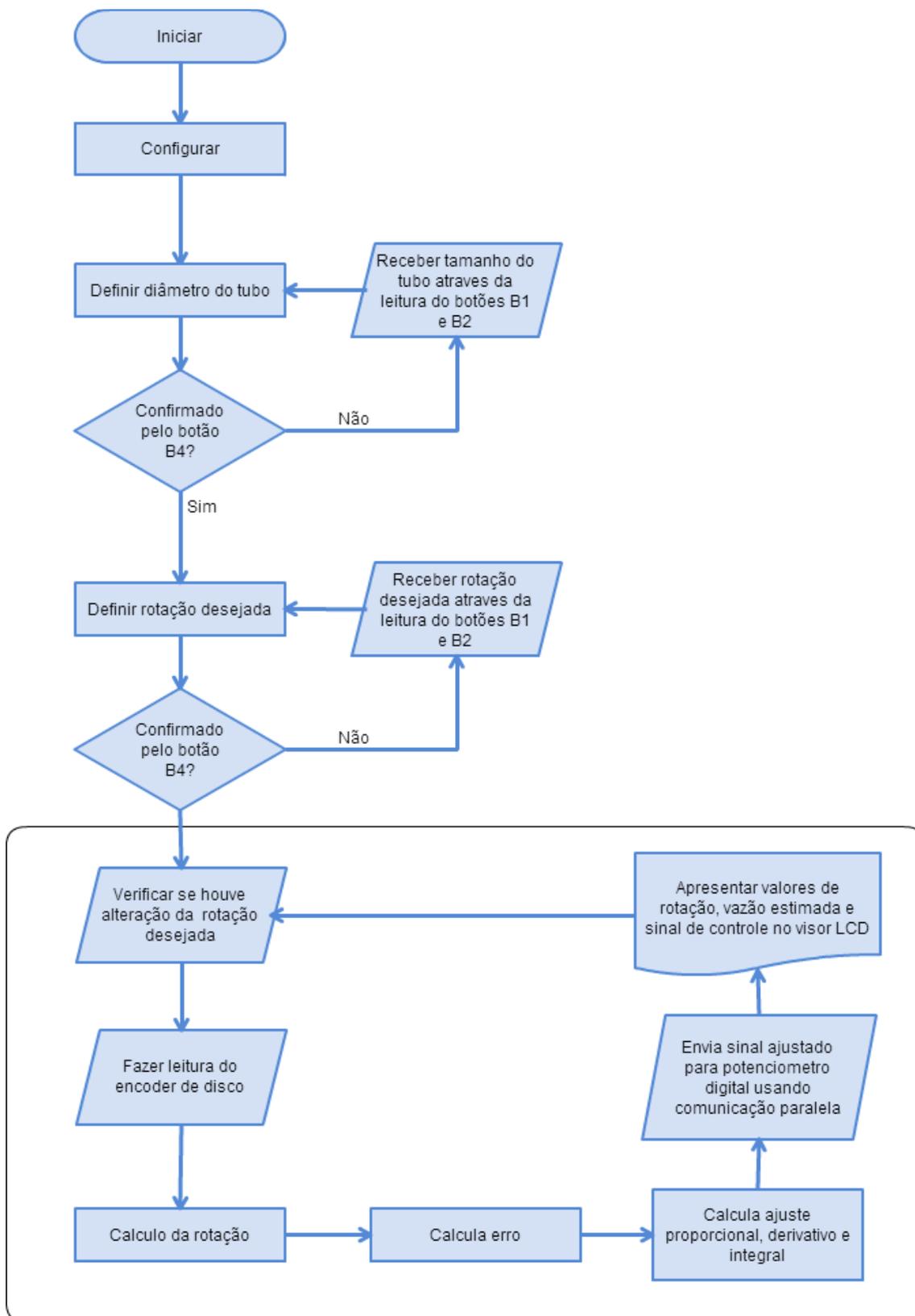


FIGURA 3.6 Fluxograma do firmware de controle da rotação.

3.1.5.1 Configurações

As configurações do microcontrolador definiram os parâmetros de configurações para correto funcionamento dos periféricos, possibilitado definir os pinos a serem usados como entrada ou saídas e preparar o visor de LCD para receber os dados a serem apresentados.

- *Timer 0*

O *Timer 0* foi o periférico responsável por contar quantos pulsos de sinal digital foram enviados pelo sensor infravermelho do *encoder*, ou seja, contar a quantidade de giros dados pelo eixo dos roletes, lembrando que cada pulso indica o giro de 10° no eixo da bomba de roletes. Na configuração, fica definido qual pino receberá os pulsos, e que a contagem deve ocorrer cada vez que o sinal passe de positivo para negativo.

- *Timer 1*

O *timer 1* foi definido para contar o tempo, para termos o valor do tempo entre cada medição, e assim, conseguir informar os números de rotações por unidade de tempo. Isso foi possível porque o microcontrolador está conectado a um cristal, ou *clock* externo, que envia sinais de altíssima precisão com frequência de 48 MHz (um sinal a cada 20,8 ns). Como se trata de medições muito maiores que a resolução em ns, um *prescaler* é adicionado para aumentar a resolução desse contador. Ao final, o *timer 1* foi configurado para ter a resolução de 1,0 μ s e recomeçar a contagem a cada 5,4 ms. A cada recomeço, uma interrupção é gerada para contar os estouros em outra variável, permitindo contar tempos maiores, da grandeza de minutos.

3.1.5.2 Rotina principal

Após definidos o diâmetro do tubo instalados nos roletes e a velocidade de rotação desejada para o eixo dos roletes, o algoritmo vai para rotina principal, que é executada repetidamente enquanto o dispositivo estiver ligado.

- Leitura e cálculo da velocidade de rotação

Para tornar as leituras mais estáveis e diminuir os erros por ruídos, a velocidade de rotação só foi tomada após certo deslocamento angular do eixo, que é diretamente proporcional à velocidade da rotação do mesmo. Assim, para grandes velocidades de rotação, há necessidade de maiores números de pulsos e maior giro a cada medição da velocidade; igualmente, para pequenas velocidades de rotação um número menor de pulsos significa menores giros a cada nova medição da velocidade de rotação do eixo.

$$N^{\circ} \text{ de pulsos} \geq 18 \times \frac{\text{rotação}}{30} \quad (3.1)$$

No algoritmo, a EQUAÇÃO 3.1 foi introduzida com essa função. O número 18 corresponde a meio giro do eixo, ou 180°, que são 18 pulsos. Nesse caso, para uma rotação prévia de 30 RPM, seria feita uma nova leitura da rotação a cada meio giro do eixo. Se a velocidade for o dobro (60 RPM), seriam realizadas novas medidas apenas a cada giro completo do eixo. Se a rotação anterior fosse de 15 RPM, seriam esperados apenas 9 pulsos, correspondente a um quarto de volta, para realizar nova leitura da velocidade de rotação.

Isso é recomendado para estabilizar as medições e para que elas sejam realizadas em unidade de tempo iguais (aproximadamente uma medição por segundo). Assim, ocorre uma diminuição da influência de ruídos e conseqüentemente a redução de erros aleatórios.

Uma vez que a quantidade mínima de pulsos seja alcançada, é calculada a velocidade de rotação para armazenar o valor final em RPM. A EQUAÇÃO 3.2 está presente no algoritmo gravado no microcontrolador para essa função.

$$\text{Rotação} = \frac{N^{\circ} \text{ de pulsos}}{36} \times \frac{60}{\text{tempo medido (s)}} \quad (3.2)$$

O número de pulsos dividido por 36 indica quantos giros completos foram realizados, e o tempo para a contagem desses pulsos em segundos, dividido por 60, representa o tempo em minutos. Dividindo o primeiro pelo segundo, temos a velocidade de rotação

em RPM. O valor final da velocidade é muito confiável sendo o erro máximo possível causado pelo *timer* do microcontrolador menor do que 0,5 μ s.

- Controlador PID

Com o valor da rotação atual do eixo dos roletes, é possível comparar esse valor com o valor desejado (*setpoint*) e tomar as decisões necessárias para corrigir a velocidade de rotação da MCE. Para isso foi projetado um controlador PID objetivando calcular o valor do erro e tomar três ações simultâneas, chamadas ação proporcional, derivativa e integral.

O controlador PID é relativamente fácil de implementar em sistemas digitais, a grande dificuldade fica por conta dos ajustes de parâmetros, conhecido como sintonia do controlador, em que, independentemente do método utilizado para valores iniciais dos ganhos proporcional, derivativo e integral, é recomendado realizar um ajuste fino em prática para otimizar a resposta do controlador.

- Ajuste da rotação e apresentação dos valores no visor LCD

Ao final do cálculo do ajuste PID, o microcontrolador enviou um sinal digital por comunicação paralela para o potenciômetro digital, esse sinal comutou os relés do potenciômetro digital aumentando ou diminuindo a resistência total (R_T). Essa alteração na resistência, por sua vez, causou uma mudança direta na velocidade de rotação do motor da MCE, aumentando ou diminuindo a corrente fornecida para esse motor.

Após a alteração do sinal, o próximo passo da rotina foi imprimir no visor de LCD conectado ao microcontrolador. Foram informados o valor da rotação desejada, da rotação medida, a vazão estimada e o valor do sinal enviado para o potenciômetro digital.

Após todos esses passos, a rotina retoma na posição inicial, que consiste em verificar se os botões foram acionados, o que altera a velocidade de rotação desejada. Para então, com ou sem alterações, medir novamente a velocidade de rotação do eixo dos roletes e prosseguir com algoritmo até que o microcontrolador seja desligado ou reiniciado.

3.2 Controle de temperatura

Durante o desenvolvimento do equipamento, foram utilizadas duas configurações com o objetivo de controlar a temperatura do experimento (utilizando banho térmico e trocador de calor de serpentina).

3.2.1 Banho térmico

Essa montagem foi realizada para controlar a temperatura do experimento em 37°C e verificar a importância desse controle por meio de experimentos pilotos de decelularização. A montagem consistiu em colocar o béquer, onde ocorre a decelularização, dentro de um banho térmico de água com temperatura controlada. Assim, pela troca de calor entre a água do banho e o fluido de decelularização, foi possível controlar a temperatura de todo experimento. A FIGURA 3.7 mostra a montagem do béquer dentro do banho térmico.

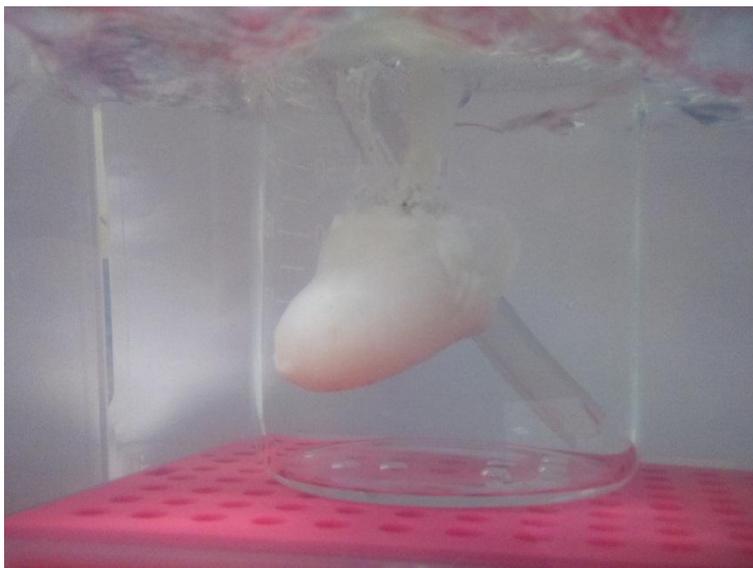


FIGURA 3.7 Decelularização utilizando o banho térmico. A decelularização ocorre em um béquer mergulhado na água aquecida à temperatura desejada, para realizar o controle da temperatura do experimento.

Para aquecer o banho térmico, foi utilizado o cabeçote de banho termostático (A100; LAUDA; Alemanha; FIGURA 3.8), que possui um controle analógico de temperatura com resolução de aproximadamente 0,3 °C (LAUDA, 1998) e capacidade de controlar temperaturas de 5°C acima da temperatura ambiente até 90°C. Para

melhorar o desempenho, o fluido que iria ser trocado foi mantido preaquecido à temperatura de 37 °C.



FIGURA 3.8 Cabeçote do banho termostático A100 da marca LAUDA.
FONTE (LAUDA, 1998)

Por causa da perda de calor para o ambiente, a temperatura dentro da câmara foi sempre ligeiramente menor do que a temperatura controlada da água (± 1 °C). Mas como a temperatura ambiente era controlada por ar condicionado (24 ± 1 °C), foi necessário apenas ajustar a temperatura da água para um valor ligeiramente maior para alcançar a temperatura desejada (37°C) dentro da câmara de decelularização.

Diversas vezes durante o experimento com essa montagem, a temperatura foi medida diretamente na câmara de decelularização, utilizando o termômetro digital (TM879; Equitem; Brasil), o que permite afirmar que o sistema garantiu o controle de temperatura em 37 ± 1 °C.

3.2.2 Trocador de calor de serpentina

Nessa montagem, foi utilizado o banho ultra termostático (ECO RE 630G; LAUDA; Alemanha; FIGURA 3.9), que é capaz de controlar a temperatura do fluido interno do aparelho em temperaturas de -30 °C a 200 °C. O equipamento utiliza um controlador PID com estabilidade de 0,02 K (LAUDA, 2005).



FIGURA 3.9 Banho ultra termostático ECO RE 630G da LAUDA.
 FONTE (LAUDA, 2005)

Para aquecer o fluido de decelularização foi criado um trocador de calor de tubo em formato de serpentina. O trocador de calor ficou mergulhado no banho e, dessa forma, trocou calor entre o fluido do banho e o perfusato que circula dentro dos tubos.

A serpentina foi projetada em aço inox para suportar a corrosão causada por diferentes tipos de fluido de decelularização, e possui as seguintes dimensões:

$$D_E = 10,0 \text{ mm} \quad H_T = 93,75 \text{ mm} \quad N = 3,75 \left(3 \text{ voltas e } \frac{3}{4} \text{ de volta} \right)$$

$$e = 2 \text{ mm} \quad C_T = 1,27 \text{ m} \quad A_S = 0,040 \text{ m}^2$$

sendo, D_E o diâmetro externo do tubo; H_T a altura total do helicoide; N o número de voltas; e a espessura da parede do tubo; C_T o comprimento total do tubo capaz de trocar calor; A_S a área total da superfície externa do tubo capaz de trocar calor.

Foram considerados os experimentos de decelularização baseados no protocolo descrito por Weymann et al. (2011) como base para o projeto do trocador de calor, em que a temperatura desejada é de $37,5 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e a vazão média do fluido de decelularização aproximadamente 9 mL/s. O valor do coeficiente de troca global (U) foi calculado pela EQUAÇÃO (1.2), para isso obtém-se o valor de h_i da EQUAÇÃO (2.3).

$$h_i = 1429 \times (1 + 0,0146 \times 37,5)^{\frac{0,318^{0,8}}{0,06^{0,2}}}; \quad h_i = 1552,65 \frac{W}{m^2 K}$$

que corrigido pelo fator f da EQUAÇÃO (2.4), resulta em:

$$h_{io} = 2096,07 \frac{W}{m^2 K}$$

O valor de h_o pode ser calculado pela EQUAÇÃO (2.6), usando os valores dos coeficientes e da constante conforme proposto por Maerteleire (1978), conforme EQUAÇÃO 3.3.

$$h_o = 1,3791 \left(\frac{D_{imp}^2 N \rho_f}{\mu_f} \right)^{0,534} \left(\frac{c_{pf} \mu_f}{k_f} \right)^{0,295} \left(\frac{\mu_f}{\mu_w} \right)^{0,192} \frac{k_f}{D_t} \quad (3.3)$$

$$h_o = 55,70 \frac{W}{m^2 K}$$

Finalmente substituindo esses valores na EQUAÇÃO (2.2), temos o coeficiente de troca global.

$$U = 54,25 \frac{W}{m^2 K}$$

Para uma temperatura ambiente de 25 °C e temperatura do banho de 37,5 °C, usando a EQUAÇÃO (2.1) e a lei de conservação de energia do fluido interno ao tubo, pode-se calcular que o fluido recirculando inicialmente à temperatura ambiente no trocador de calor com vazão de 9 mL/s deve responder conforme FIGURA 3.10.

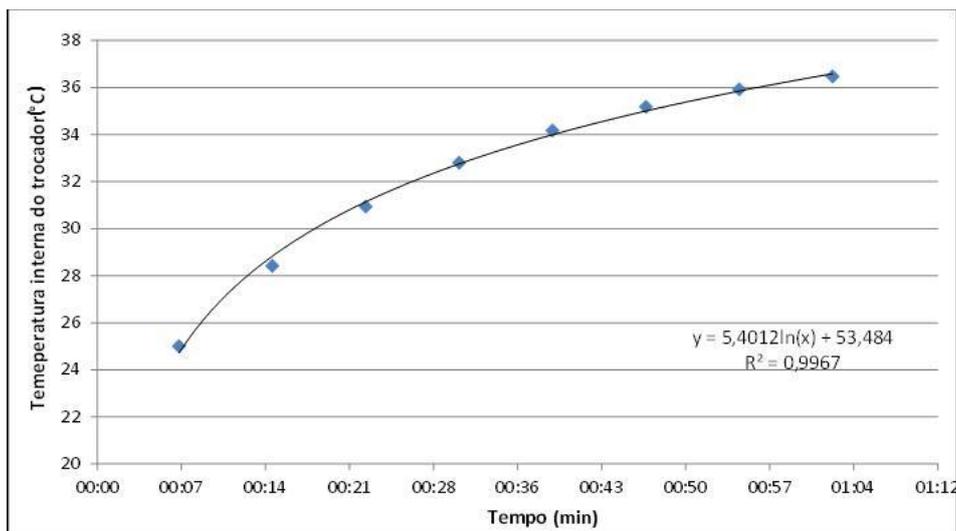


FIGURA 3.10 Resposta do trocador de calor, calculado para simular o funcionamento, no banho de 37,5 °C e recirculação de água inicialmente a 25 °C.

3.3 Circuito de circulação do perfusato

O perfusato deve ser bombeado para o órgão passando por dentro de um circuito fechado que ligue todos os equipamentos usados no processo de decelularização. A FIGURA 3.11 mostra a montagem final do circuito e também é um esboço completo de todo equipamento desenvolvido.

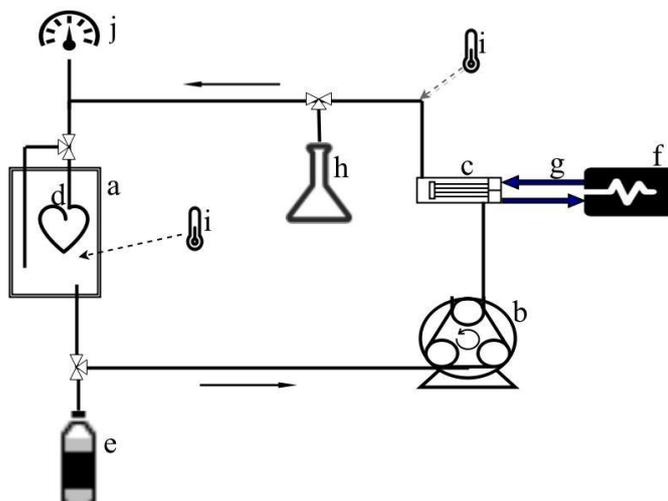


FIGURA 3.11 Esquema completo do equipamento de decelularização.

LEGENDA: a) Câmara de decelularização b) Bomba peristáltica c) Trocador de calor d) Coração canulado pela aorta e) Reservatório de entrada do perfusato f) Banho termostático g) Água à temperatura controlada h) Reservatório para retirada do perfusato i) Sensor de temperatura j) Sensor de pressão

Dessa forma, o perfusato armazenado dentro da câmara de decelularização (FIGURA 3.11 a) foi conduzido por tubos até a bomba peristáltica (FIGURA 3.11 b), de onde foi bombeado para o coração (canulado pela aorta; FIGURA 3.11 d), passando pelo trocador de calor de serpentina imerso no banho termostático (FIGURA 3.11 c, f, g).

Além disso, o circuito possui ainda dois reservatórios (FIGURA 3.11 e, h) que foram conectados ao circuito apenas nos momentos de troca do perfusato, por meio de chaves seletoras de fluxo de três vias. O reservatório de entrada e retirada do perfusato tornou o procedimento de troca mais confiável e diminuiu a manipulação direta no órgão, durante o processo de decelularização.

Foram previstos dois pontos para tomada de temperatura (FIGURA 3.11 i), sendo a primeira na saída do trocador de calor e a segunda dentro da câmara de decelularização, permitindo medir e avaliar as alterações de temperatura durante o processo. Outro ponto importante foi a montagem da medição da pressão manométrica logo antes do perfusato entrar no coração (FIGURA 3.11 j), que é um parâmetro necessário para determinar e controlar a vazão desejada.

No circuito, antes do coração, existe uma chave seletora de fluxo de três vias responsável por permitir a circulação do perfusato passando pela câmara de decelularização, porém sem passar pelo coração. Essa foi a maneira mais rápida de desconectar o coração do circuito principal de perfusão. Isso é importante, principalmente, durante as trocas do perfusato, onde a presença de bolhas é comum devido ao esvaziamento seguido pelo enchimento do circuito. Nesses momentos, a chave é selecionada para direcionar o fluxo, sem passar pelo coração, até que as bolhas sejam separadas pela própria câmara de decelularização.

Os tubos utilizados foram fabricados em silicone (Cardioplegia; NIPRO; EUA) com diâmetro nominal de 1/4 polegadas ou 6,35 mm, para a montagem, conforme a FIGURA 3.11; foram utilizados aproximadamente 2 metros de tubo.

Na MCE, em contato com os roletes, foram utilizados tubos mais maleáveis, fabricados especificamente para terem vida útil mais longa quando utilizados com bombas

peristálticas. Esse tubo possui o diâmetro maior (3/8 polegadas ou 9,52 mm) que permite maior vazão com rotações menores.

3.3.1 Câmara de decelularização

Para fixar o órgão imerso no fluido de decelularização, uma câmara de decelularização foi projetada em acrílico, com formato de prisma reto, com dimensões de 200 mm de altura e base hexagonal de 92 mm cada lado (aproximadamente 4,4 litros). Ela foi devidamente fechada e pode acomodar diversos órgãos, dentre eles um coração humano.

A câmara de decelularização também funciona como uma armadilha para bolhas por retirar o perfusato para circulação na parte inferior, e sendo preenchida por cima. A FIGURA 3.12 mostra detalhes do projeto da câmara realizado usando software Solidworks 2009®.

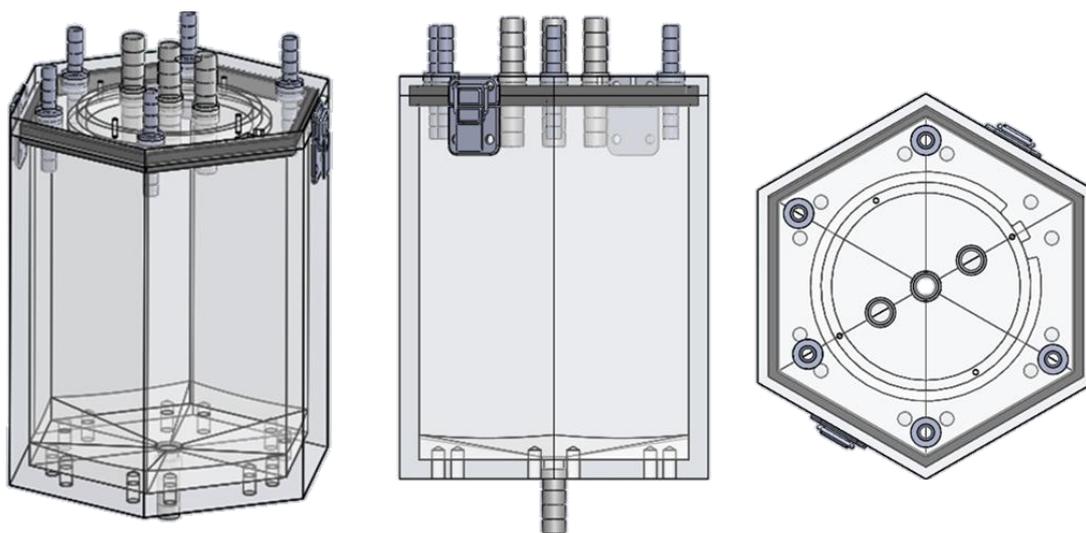


FIGURA 3.12 Projeto da câmara de decelularização.

Para realizar a decelularização de órgão menores, como o coração de galinha utilizado nesse trabalho, o projeto previu uma pequena estrutura na tampa para fixar outro reservatório, permitindo economizar na quantidade de perfusato utilizado por experimento.

3.4 Testes experimentais

Para testar o equipamento e também para definir as necessidades do processo de decelularização, foram realizados vários testes experimentais ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Esses ensaios consistiram na tentativa de realizar a decelularização do órgão inteiro, utilizando diferentes configurações do equipamento. Para isso foram, inicialmente, realizados vários experimentos pilotos em que a continuidade do desenvolvimento dependia dos resultados ou das percepções identificadas por estes testes.

O órgão escolhido para realizar os testes foi o coração de galinha. Dentre as razões para escolha dessa espécie foram a praticidade logística e ética de se obter o órgão em granjas credenciadas, a facilidade de adaptação, além de possibilitar economia do perfusato por ser um órgão pequeno.

Os corações de galinha foram obtidos frescos, logo após abate, na Granja Ave Nova (CNPJ 00.443.740/0001-00), Grupo Brasília Agroindustrial Avícola Ltda., localizada na Rua Nova York, 94, Imbirucu, Betim-MG. O abatedouro é devidamente regulamentado e autorizado a realizar este trabalho. Os corações coletados foram imediatamente armazenados em uma caixa térmica contendo gelo e transportados ao Laboratório de Bioengenharia (LABBIO), Departamento de Engenharia Mecânica/UFMG, onde foram pesados e medidos.

As pesagens e medições foram realizadas antes e depois dos processos de decelularização. Os corações foram medidos utilizando-se uma régua com escala de milímetros e pesados em balança de precisão (AY220; Marte; Brasil). Posteriormente, os corações foram colocados em um recipiente contendo PBS 1X e armazenados na geladeira, por um período máximo de 24 horas, antes de serem submetidos ao tratamento.

O protocolo de decelularização comum a todos os experimentos consistiu em uma adaptação do protocolo descrito por Weymann et al. (2011), ele foi escolhido por sua simplicidade, que favoreceu a fácil execução e o baixo custo de cada experimento, e pelo bom resultado de decelularização alcançado. Nesse protocolo o coração foi

perfundido durante doze horas com 4% de SDS (Dodecil sulfato de sódio) em PBS 1x (Tampão fosfato salino). Durante esse período, a cada duas horas, o detergente foi trocado. Sendo que a cada troca, o órgão foi perfundido durante quinze minutos com PBS 1x para realizar sua limpeza. Ao final das doze horas, ocorreu a perfusão por vinte e quatro horas em PBS 1x com uma troca após as primeiras doze horas.

Os parâmetros que mudaram de um experimento para outro serão descritos detalhadamente a seguir. Dentre eles estão o controle de temperatura e vazão da perfusão. Dentre outros procedimentos importantes, que foram alterados ao longo do desenvolvimento, estão o método para canulação do coração e de sua preparação inicial.

Para perfusão do coração, foi utilizado o método de perfusão retrograda descrito por Langendorff (LANGENDORFF, 1895), descrito no item 2.2. Ao final de todo processo de decelularização, o coração foi preservado em Formol 10% para futuras análises. Os corações foram avaliados visualmente com fotos tiradas antes e após os procedimentos de decelularização. Igualmente, os corações foram pesados antes e após os experimentos para avaliar as reduções na massa total dos órgãos.

3.4.1 1º Teste piloto: decelularização por perfusão

Esse teste piloto foi o primeiro contato prático com os requisitos do processo de decelularização por perfusão. Ele foi realizado numa fase inicial do desenvolvimento e apenas a MCE estava preparada para realizar o teste.

A FIGURA 3.13 mostra a montagem usada para esse teste. Como pode ser observada, a montagem era simples, contando apenas com um béquer (250 mL) funcionando como câmara de decelularização, a MCE e um termômetro, para realizar a medição de temperatura durante o experimento, porém sem um mecanismo para controlar essa temperatura.

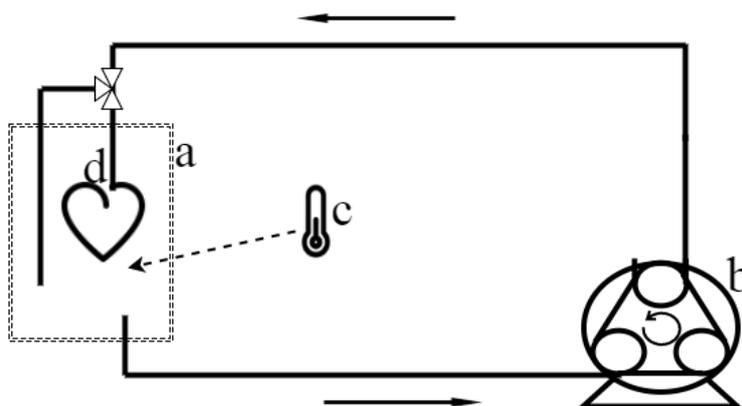


FIGURA 3.13 Esquema de montagem para o 1º teste piloto.

LEGENDA a) béquer b) bomba de rolete c) termômetro d) coração canulado pela aorta

Pouco sobre a metodologia de preparação ou canulação do coração havia sido definido nessa etapa, e a velocidade de rotação do rolete foi definida apenas tentando aproximar ao débito cardíaco médio da espécie, aproximadamente 350 mL/min (WHITTOW, 1999). Porém, aumentada para 540 mL/min após duas horas de experimento.

3.4.2 2º Teste piloto: decelularização por perfusão com eletrodo

Nesse experimento, além da montagem anterior (FIGURA 3.13), foram adicionados dois eletrodos de grafite com diferença de potencial elétrico entre eles de 3 V. Esses eletrodos foram posicionados dentro do béquer onde ocorre a decelularização, mergulhados no perfusato.

A hipótese foi que o diferencial elétrico ajudaria na decelularização por atrair os *debris* celulares, causando adesão dos *debris* celulares com polaridade nos eletrodos e possivelmente facilitando o processo de perfusão. A FIGURA 3.14 mostra essa montagem do eletrodo no béquer.

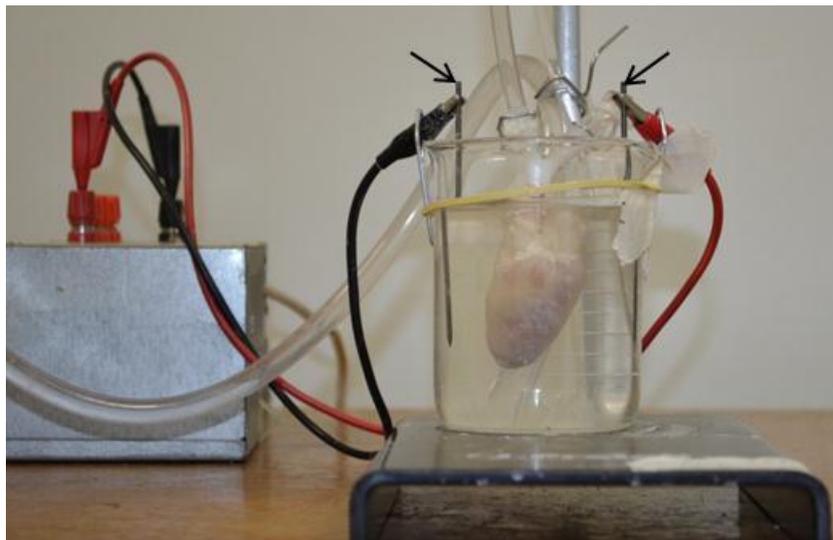


FIGURA 3.14 Montagem dos eletrodos (indicados pelas setas).

Além dessa alteração, foi adicionada à montagem uma válvula de três vias que possibilita a saída do perfusato, usando a própria vazão gerada pela bomba de rolete para retirar o fluido durante as trocas. A válvula de três vias permitiu direcionar o sentido da vazão e escolher entre dois caminhos para onde o perfusato devia seguir: para circulação normal ou para reservatório de retirada. Nesse teste, o perfusato ainda foi adicionado manualmente e diretamente no béquer a cada troca.

3.4.3 3º Teste piloto: adição do controle de temperatura, medição de pressão e método de canulação

Nesse experimento foi adicionada uma solução inicial para controlar a temperatura e avaliar a influência deste fator no processo de decelularização. A montagem do equipamento, nesse experimento, é mostrada na FIGURA 3.15.

O béquer, nesse experimento, foi colocado dentro de um banho térmico com temperatura controlada, conforme descrito no pelo item 3.2.1. Dessa forma, foi possível controlar a temperatura de todo o processo em 37 ± 1 °C.

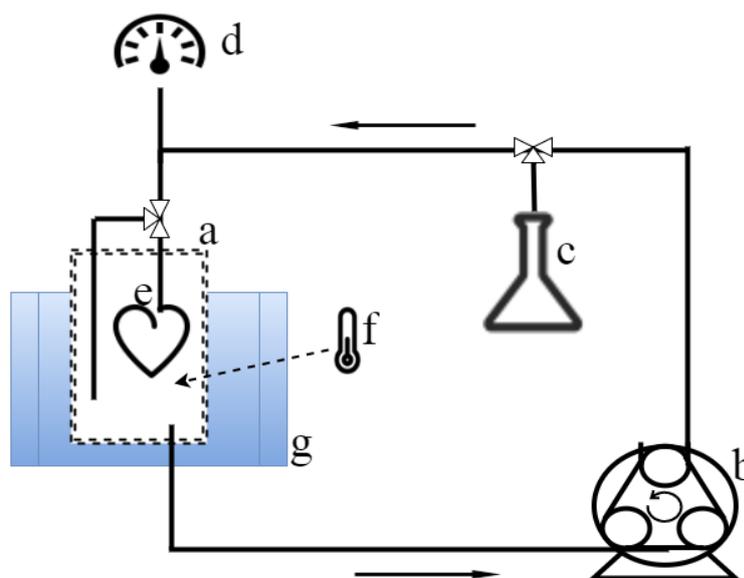


FIGURA 3.15 Esquema de montagem para 3º Teste piloto.

LEGENDA a) Béquer b) Bomba peristáltica c) Reservatório para retirada do perfusato d) Sensor de pressão e) Coração canulado pela aorta f) Sensor de temperatura g) Água à temperatura controlada do banho térmico

Outra alteração importante foi a adição de um manômetro no circuito de perfusão (FIGURA 3.15 d). Ele permite medir a pressão do perfusato que está entrando no coração e, assim, determinar melhor a velocidade de rotação. Com isso, foi descoberta a necessidade de alterar o método de canulação da aorta, pois a pressão medida pelo manômetro, nessas condições, era muito pequena, e dificilmente, mesmo em rotação máximas, alcançava os 37,5 mmHg desejados.

No novo método, a cânula é inserida ao máximo dentro da aorta, tomando o cuidado para que não obstrua os óstios coronários nem danifique a válvula aórtica. Os troncos supra aórticos do coração de galinha apresentavam grandes aberturas por onde poderia ocorrer perda de fluxo não desejada. Para solucionar esse problema, essas aberturas foram suturadas com vários pontos para dificultar a saída do perfusato por essas saídas. Dessa forma, o perfusato encontrou a obstrução causada pelo fechamento da válvula aórtica, o que eleva a pressão no local e permite a perfusão através dos óstios coronários.

3.4.4 Experimentos utilizando banho térmico

Esses experimentos foram realizados em triplicata, usando a mesma montagem do 3º teste piloto (FIGURA 3.15), porém, cuidados da preparação do coração foram tomados para melhorar a perfusão do coração, e aumentar o padrão de repetitividade de um experimento para o outro.

O coração foi coletado, na manhã do abate, na granja e transportado para o laboratório (resfriado em caixas térmicas), onde foi limpo, pesado, canulado, e os troncos supra aórticos foram suturados. Após esses procedimentos, o coração foi mantido resfriado até a manhã seguinte para iniciar o protocolo de decelularização, descrito em 3.4.

A rotação foi definida para manter a pressão entre 30 a 45 mmHg, que podia ser diferente de um experimento para o outro devido a pequenas diferenças de tamanho do coração ou qualidade final da sutura. A temperatura foi definida e controlada pelo banho térmico igualmente em todos os experimentos a 37 ± 1 °C.

3.4.5 Experimentos utilizando trocador de calor de serpentina

A montagem com o trocador de serpentina (item 3.2.2) foi realizada, e novamente foram realizados três experimentos semelhantes para avaliar a eficiência da máquina e possivelmente detectar necessidades de melhorias.

Com relação a montagem, agora com o trocador de calor de serpentina, o equipamento ficou muito próximo do desenvolvimento final desse trabalho (FIGURA 3.11), faltando apenas adicionar a câmara de decelularização, que estava sendo construída nessa fase do estudo. No lugar da câmara de decelularização, foi utilizado um béquer de 250 mL, como nos experimentos anteriores.

A temperatura foi controlada em $37,65 \pm 0,02$ °C, devido à grande precisão e estabilidade fornecida pelo controlador do banho ultra termostático (ECO RE 630G; LAUDA; Alemanha). A tomada de temperatura foi realizada em dois pontos: o primeiro medindo a temperatura do perfusato dentro do tubo de perfusão, após a saída do trocador de calor, usando um PT100 conectado ao banho, e o segundo dentro do béquer utilizando um termômetro digital (TM879H; Equitherm; Brasil). O protocolo

experimental utilizado foi o mesmo descrito para os testes com o banho térmico (item 3.4.4).

3.4.6 Experimentos com a montagem final

Esses ensaios foram realizados com a adição da câmara de decelularização e foi obtida a montagem final do equipamento de decelularização. Estes experimentos, em triplicata, foram realizados para avaliar o processo de decelularização e cada etapa do procedimento, e comparar os resultados com aqueles obtidos nos experimentos anteriores.

Outra mudança no equipamento, além da câmara, foi a adição do reservatório de entrada do perfusato (FIGURA 3.11 e) que permite a troca e adição do perfusato, sem necessidade de manipulação na câmara de decelularização, que pode ficar completamente fechada durante todo o processo de decelularização. O protocolo de decelularização foi o mesmo usado nos experimentos anteriores. A temperatura foi controlada em $37,65 \pm 0,02$ °C pelo trocador de calor de serpentina.

Para esses experimentos, foram adotados novos cuidados na preparação do coração, além de realizar a canulação e sutura dos troncos supra aórticos presentes na aorta. Foi retirado, utilizando uma pinça, todo sangue coagulado visível dentro dos átrios, ventrículo ou aorta do coração. Juntamente, foi realizada uma tentativa de retirar parte do sangue presente nas coronárias massageando o coração.

3.4.7 Teste do balão

O teste do balão tem objetivo de quantificar a estabilidade mecânica da MEC, após a decelularização, e comparar com o coração natural. Sua metodologia consiste em medir a pressão interna de um balão inserido dentro do ventrículo esquerdo do coração decelularizado, sendo o volume do balão previamente conhecido e assim criar uma curva Pressão - Volume, que possa comparar os resultados obtidos. A FIGURA 3.16 mostra a montagem realizada.

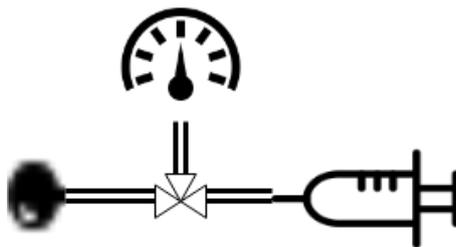


FIGURA 3.16 Montagem para teste do balão. O balão (esquerda) foi inserido no ventrículo esquerdo, e a seringa (direita) foi responsável por injetar o volume controlado dentro o balão, à cada volume o valor da pressão interna medida pelo manômetro (acima) era anotado.

O balão foi inserido dentro do ventrículo esquerdo pela aorta, passando pela válvula aórtica, e então, foi preenchido com líquido de volume conhecido, medido utilizando uma seringa de 3 mL. Finalmente, a pressão do sistema foi medida pelo manômetro conforme a FIGURA 3.16. Para efeito comparação, o teste de balão também foi realizado com corações naturais, sem passar pelo processo de decelularização, e também foi medida a pressão causada apenas pela parede de látex do balão, sem o coração, como controles experimentais. O teste do balão foi realizado em todos os corações decelularizados pelos experimentos posteriores aos experimentos pilotos, ou seja, os experimentos com o banho térmico, com o trocador de calor de serpentina, e com a montagem final. As incertezas de medição foram calculadas utilizando a distribuição paramétrica *t* de *Student*, sendo a distribuição bicaudal com nível de confiança de 90% (FIGLIOLA; BEASLEY, 2015), e após os testes, os corações foram colocados em tubos *Falcons* com formol 10%, para análise em microscopia ótica.

3.4.8 Microscopia ótica

Para avaliar a qualidade da remoção celular e resultados da decelularização, foram realizadas análises de microscopia ótica. Cortes longitudinais do ventrículo esquerdo de corações naturais e decelularizados foram fixados em formol 10%, desidratados em concentrações crescentes de etanol (50% a 100%) e clareados com xilol para posterior infiltração e inclusão em parafina, permitindo que os tecidos fossem cortados em secções de 5 μm , em micrótomo. A fim de verificar a presença ou ausência de restos celulares, como núcleos ou miofibrilas, o tecido foi corado com hematoxilina e eosina (H&E), de acordo com protocolo padronizado na literatura (OTT et al., 2008). As

análises foram realizadas em microscópio óptico (BX41; Olympus; Japão) e as imagens foram obtidas no microscópio (BX40; Olympus; Japão) acoplado à câmera digital (Moticam 2500; Motic; China), em ampliações de 200X.

O preparo e as análises das lâminas foram realizados em parceria com o Laboratório de Interação Micro-organismo - Hospedeiro do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob a coordenação das professoras Patrícia Silva Cisalpino e Danielle da Glória de Souza e com o auxílio das alunas de pós-graduação Patrícia Campi Santos e Raquel Duque.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Alterações na máquina de circulação extracorpórea

Para controlar a velocidade de rotação da MCE, usando os equipamentos propostos, os ajustes das constantes de controle foram definidos para gerar uma resposta mais lenta, porém, bastante estável e com pouquíssimas oscilações, usando, assim, valores relativamente baixos para os ganhos proporcional, integral e derivativo.

Esse modelo de resposta foi escolhido levando em consideração o funcionamento esperado da MCE, que propõe funcionar por experimentos com duração cerca de mais de 24 horas com pequenas alterações na velocidade de rotação, durante esse período. Dessa forma, a MCE é capaz de controlar a rotação e, indiretamente, definir a vazão utilizada durante os experimentos de decelularização.

Essa técnica é mesma utilizada por diversos autores para realizar a perfusão de diferentes órgãos (AKHYARI et al., 2011; MOMTAHAN et al., 2014; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; OTT et al., 2008).

O algoritmo completo desenvolvido está disponibilizado no ANEXO A. Ao final, esse controlador foi capaz de fornecer a rotação com variações máximas de 5% do valor desejado, após a estabilização.

4.2 Controle de temperatura

O método final selecionado para o controle de temperatura foi o trocador de calor de serpentina mergulhado no banho ultra termostático, realizando a troca de calor entre o perfusato e o fluido de temperatura controlada no interior do banho. Esse método é mais utilizado por evitar a contaminação do perfusato e permitir um controle rápido com baixo volume interno de perfusato necessário (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; BELL; MOCANU; YELLON, 2011).

A serpentina foi construída em aço inox em forma de uma helicóide, conforme FIGURA 4.1. A configuração do trocador de calor possui uma boa resposta à alteração

de temperatura, isso é atingido rapidamente a temperatura definida com ótima estabilidade ($\pm 0,01$ K), depois que essa temperatura é alcançada.

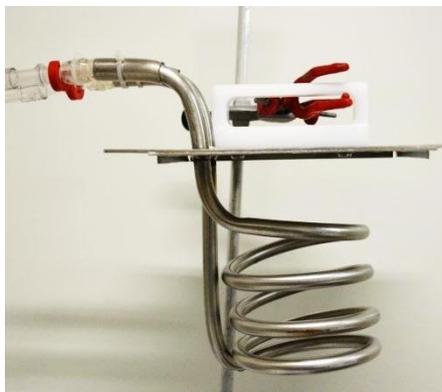


FIGURA 4.1 Trocador de calor de serpentina utilizado.

A FIGURA 4.2 mostra a resposta obtida quando o perfusato (água destilada) foi inserido no circuito de perfusão (com béquer de 250 mL) a 24 °C, sendo a temperatura definida para o fluido interno de 37,90 °C e a vazão do perfusato de aproximadamente 550 mL/min.

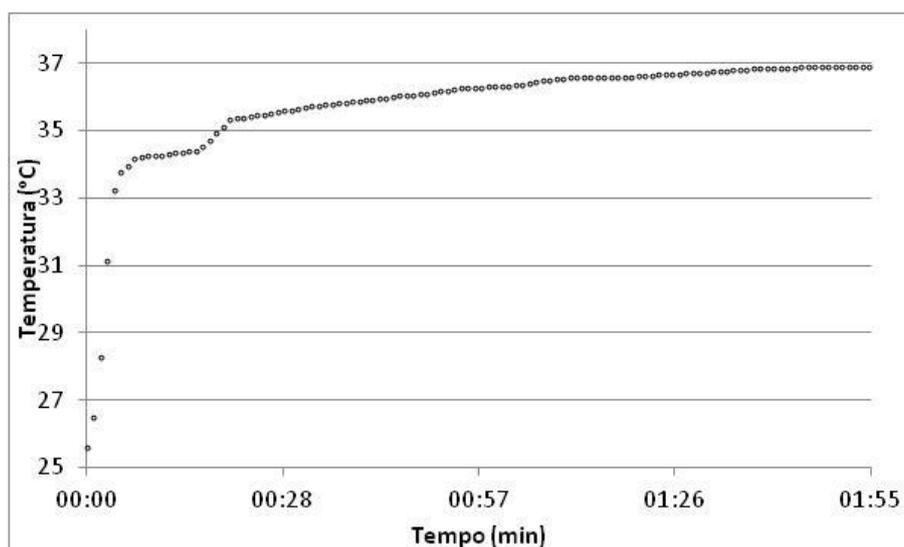


FIGURA 4.2 Resposta do trocador de calor ao inserir perfusato à 24 °C.

Como pode ser visto, com apenas dois minutos, o perfusato já atinge a temperatura de 37 °C e estabiliza em 37,5 °C, três minutos após o início da perfusão, o que indica uma boa resposta, considerando que o tempo total médio entre troca do perfusato é de duas

horas. Isso garante que a maior parte do experimento ocorre com a temperatura desejada, em alta precisão ($\pm 0,02$ °C).

O controle da temperatura, assim como a possibilidade de utilizar diversos valores durante o experimento, é um ponto crucial para se estudar o processo de decelularização. Isso permite aplicações e pesquisar melhorias em diferentes protocolos, como no caso de utilização de enzimas no fluido de decelularização. O estudo realizado por Akhyari et al. (2011) mostra a comparação entre diferentes tipos de protocolos de decelularização, com diferentes temperaturas de perfusão, em que podemos extrair a importância do controle de temperatura para cada possibilidade de protocolo e perfusato com princípios ativos diferentes.

O controlador banho ultra termostático ainda pode usar como variável de controle uma temperatura externa ao banho medido por um termopar, que pode ser posicionado dentro do circuito, garantindo o controle mais rápido da temperatura do perfusato se comparado com a medição da temperatura interna do banho. Essa função, no entanto, pode se tornar inviável no caso de protocolos de decelularização com frequentes e demoradas trocas. Como foi verificado em testes preliminares, com o esvaziamento do circuito, a temperatura medida pelo termopar cai para a temperatura ambiente, criando um falso valor na variável de controle, causando um superaquecimento do banho. Aumentando muito o tempo de resposta do sistema, porém, isto é facilmente evitado pelo operador, tendo ciência da necessidade de trocas rápidas.

4.3 Circuito de perfusão

O circuito foi construído com cerca de dois metros de tubo de silicone com 6,35 mm de diâmetro, possui dois pontos para medição de temperatura e um para medir a pressão estática do perfusato (FIGURA 4.3 g, h). O circuito possui um trocador de calor (FIGURA 4.3 c, e) responsável pelo controle da temperatura do perfusato, e uma bomba de rolete (FIGURA 4.3 b) com rotação controlada para determinar a vazão.

Essas características possibilitam a realização de uma grande variedade de protocolos de decelularização encontrados na literatura (AKHYARI et al., 2011; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; MOMTAHAN et al., 2014; OTT et al., 2008;

KASIMIR et al., 2003), permitindo alterar os valores da vazão e temperatura de perfusão para atender a esses protocolos, que não foram testados nesse trabalho. Além da facilmente prevista nesse equipamento para realizar diversas adaptações necessárias para executar melhor outros protocolos de decelularização. O circuito foi projetado também para ter flexibilidade para suportar diferentes órgãos que possam ser decelularizados pelo mesmo processo (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

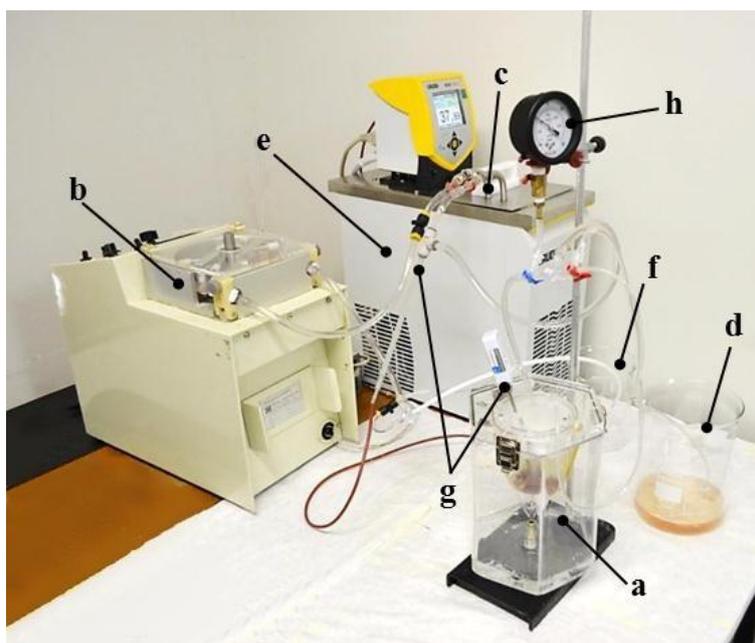


FIGURA 4.3 Equipamento de decelularização durante processo de decelularização do coração de galinha: a) Câmara de decelularização b) Bomba peristáltica c) Trocador de calor de serpentina d) Reservatório de saída do perfusato e) Banho ultra termostático f) Reservatório de entrada de perfusato g) Medidor de temperatura h) Medidor de pressão.

A câmara de decelularização (FIGURA 4.4) facilita a adaptação para diferentes órgãos. A tampa da câmara permite fixar diferentes recipientes, com volumes diferentes, para minimizar os gastos com perfusato, além de permitir a realização dos experimentos com o mínimo contato com órgão, e sem necessidade de manipulação durante os experimentos. O que reduz as chances de contaminação externa no órgão ou na MEC.

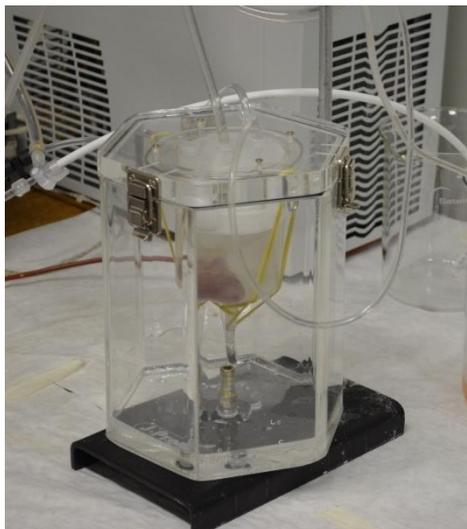


FIGURA 4.4 Câmara de decelularização com adaptação para órgãos menores.

A câmara de decelularização foi responsável, no equipamento, por separar as bolhas do circuito e impedir a recirculação do mesmo, utilizando o caminho secundário do circuito para passar pela câmara sem passar pelo órgão (FIGURA 3.11). No entanto, dependendo das características fisiológicas do órgão e o perfusato utilizado, pode ser necessário adicionar um dispositivo de retenção de bolhas (*bubble trap*), antes da cânula, a fim de assegurar a sua remoção e impedir embolias no órgão (COLAH et al., 2012). Nesse caso, o volume utilizado dentro do dispositivo de retenção de bolhas deve ser consistente com o volume total utilizado para a perfusão, para não aumentar significativamente o custo do processo.

As bombas de roletes com deslocamento positivo são um dos equipamentos mais utilizados para a perfusão de órgãos e pacientes, particularmente, porque são simples e não há nenhum contato direto entre qualquer uma das partes da bomba e o fluido. Outras vantagens são a precisão em relação ao fluxo, durabilidade, versatilidade, a ausência de contaminação (uma vez que o líquido permanece dentro do tubo ao longo do circuito da bomba), e a capacidade de proporcionar um fluxo contínuo com baixa vibração (GUYETTE et al., 2014).

A perfusão do coração ocorreu corretamente conforme esperado pelo método de perfusão retrograda de Langendorff. Como pode ser visto na FIGURA 4.5, o perfusato entra pelo coração por meio da cânula localizada na aorta e perfunde o coração através

dos óstios coronários. Como esperado, a saída do perfusato do coração acontece pelas veias ligadas ao átrio direito, como a veia cava.

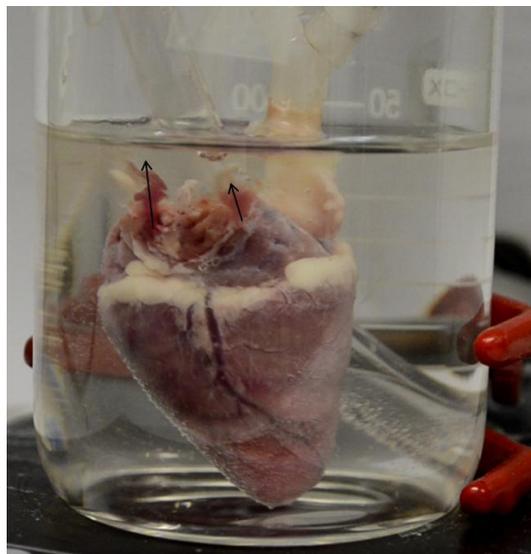


FIGURA 4.5 Foto tirada no primeiro instante da perfusão. Setas indicam a saída do perfusato junto com o sangue do átrio direito, através da abertura da veia cava.

O controle de pressão constante foi usado em diversos trabalhos (WEYMANN et al., 2011; SIERAD et al., 2015), e pode ser alcançado adicionando de um controlador e um transdutor de pressão no sistema. Diferentes artigos (FUNAMOTO et al., 2010; MOMTAHAN et al., 2014; GUYETTE et al., 2014) avaliaram as vantagens de realizar o método de pressão constante de perfusão para decelularização, concluindo serem ligeiramente mais eficazes o método de pressão constante, principalmente, em órgãos maiores. Diferentemente, este estudo usa controle de fluxo constante, com a pressão verificada por um manômetro (FIGURA 4.3 h), sem controlar a rotação em função da pressão. Esta foi uma solução menos precisa, porém mais simples e de baixo custo. Os resultados obtidos, descritos a seguir, podem confirmar o bom funcionamento do equipamento, na maior parte dos casos, porque a pressão de perfusão normalmente se manteve estável, para uma dada taxa de fluxo.

4.4 Testes experimentais

4.4.1 1º Teste piloto: decelularização por perfusão

Neste experimento, a rotação da bomba foi de 20 ± 1 RPM. Não houve controle de temperatura, portanto, foi considerada a temperatura ambiente que variou entre 24 a 26 °C. A FIGURA 4.6 mostra o resultado visual do processo de decelularização realizado nesse teste piloto.



FIGURA 4.6 Foto do coração no 1º teste piloto (escala em mm).

A) antes do processo de decelularização B) após o processo de decelularização

Ao final do protocolo de decelularização o coração ainda apresentava diversas regiões avermelhadas, principalmente na região do ventrículo esquerdo, o que indica a presença de células. A massa final do coração foi de $6,05 \pm 0,005$ g, que significa uma redução de 32,78% da massa inicial do coração limpo (que era de $9,00 \pm 0,005$ g), sem ocorrer alteração significativa no tamanho ou forma do coração.

Apesar da decelularização incompleta, o 1º teste piloto foi importante para conhecer algumas características do processo de remoção de células e alguns resultados esperados. Foi percebida a redução de massa do órgão, com pequena redução do tamanho. A aorta foi capaz de suportar o coração durante todo o experimento. O método de perfusão retrógrada foi eficiente em distribuir o fluido de decelularização e perfundir o interior do coração (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006), como pode ser visto

na FIGURA 4.6. O coração foi decelularizado em regiões mais internas, mesmo que a remoção do conteúdo celular não tenha sido completa. A MCE apresentou um bom funcionamento, mantendo-se estável mesmo em experimentos longos.

Além disso, com esses resultados, foi apurada a necessidade de melhorias no equipamento de perfusão, tanto para facilitar o processo como para melhorar a eficiência da decelularização. Por isso, foi adicionado, para experimentos futuros, um caminho para retirada do perfusato para um reservatório, diminuindo a manipulação do coração e do béquer, durante o processo. Foi adicionado também, o controle de temperatura, e um medidor de pressão na entrada do coração a fim de oferecer um melhor parâmetro para escolha da rotação e vazão da MCE.

4.4.2 2º Teste piloto: decelularização por perfusão com eletrodo

Neste teste, foram utilizados eletrodos eletricamente carregados no béquer onde ocorre a decelularização, rotação de 20 ± 1 RPM e temperaturas entre 22 a 25 °C. Foi observado um resultado visualmente pior, mostrado na FIGURA 4.7.

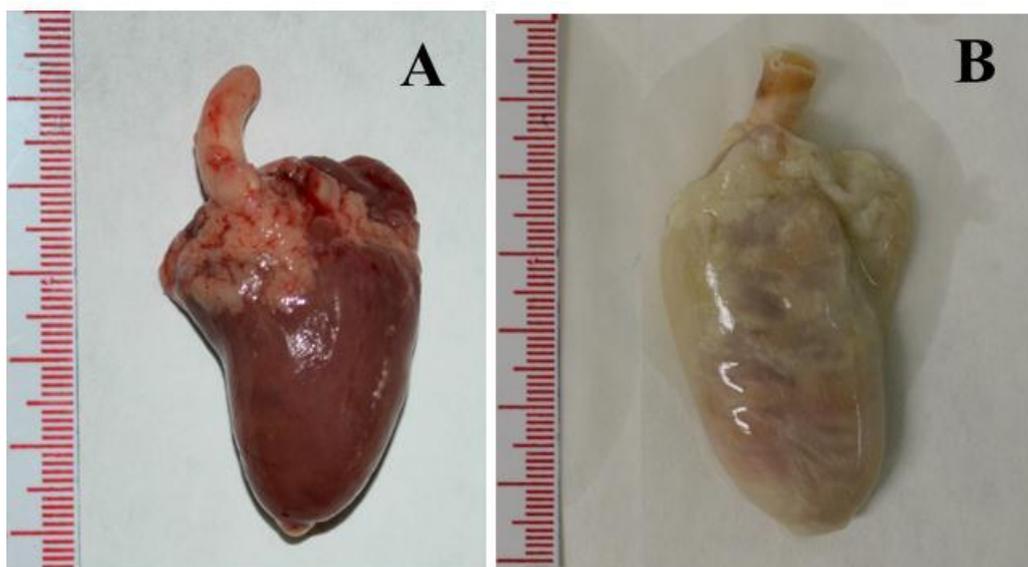


FIGURA 4.7 Foto do coração no 1º teste piloto (escala em mm).

A) antes do processo de decelularização B) após o processo de decelularização

Visualmente, o coração permaneceu mais avermelhado e mais flácido em comparação ao primeiro teste piloto. A massa final do coração foi de $10,81 \pm 0,005$ g, que significa uma redução de 15,74% da massa inicial do coração (que era de $12,83 \pm 0,005$ g).

Em relação ao uso do eletrodo, sua capacidade de atrair e separar os *debris* celulares não foi eficiente. Na FIGURA 4.8, é possível ver a formação de grande quantidade de bolhas nos eletrodos, principalmente no negativo (esquerda), simultâneo à baixa adesão de *debris* celulares.

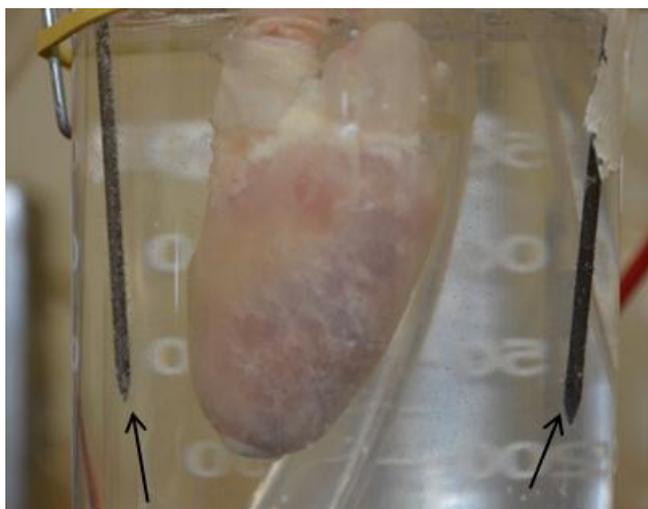


FIGURA 4.8 Eletrodo em funcionamento no 2º teste piloto. Setas indicam os eletrodos.

A presença de bolhas indica uma reação química que não era desejada, pois a hidrólise da água é capaz de gerar peróxido de hidrogênio. Devido a esses fatores, o uso do método de eletrodos foi descartado para futuros experimentos nesse trabalho, sendo essa a principal deliberação realizada a partir dos resultados desse teste. O experimento ainda reafirmou todas as conclusões relatadas para o 1º teste piloto.

4.4.3 3º Teste piloto: Adição do controle de temperatura, medição de pressão e método de canulação

Este experimento foi realizado com temperatura controlada em $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Além disso, foi adicionado o manômetro no circuito que permitiu medir a pressão do perfusato na entrada do coração, que indicou a necessidade de melhorias na canulação.

A rotação definida para a bomba foi de 26 ± 1 RPM, a pressão inicial foi de 53 ± 4 mmHg, e a final de 41 ± 14 mmHg. A massa inicial do coração foi de $11,72 \pm 0,005$ g. Com as alterações realizadas, o 3º teste piloto obteve resultados visualmente melhores, como pode ser visto na FIGURA 4.9.

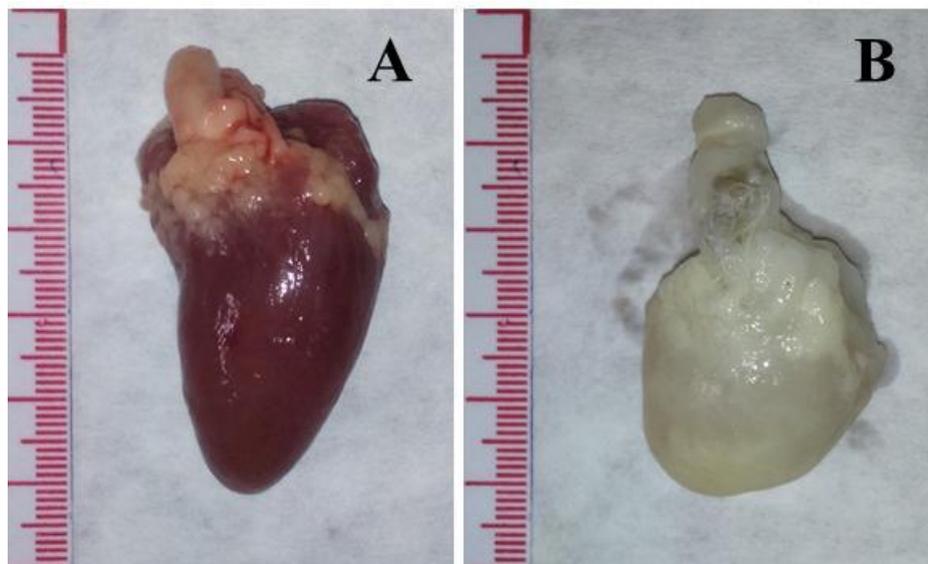


FIGURA 4.9 Foto do coração no 1º teste piloto (escala em mm).

A) antes do processo de decelularização B) após o processo de decelularização

A decelularização foi mais eficiente do que nos experimentos anteriores, apenas as regiões que separam os átrios dos ventrículos apresentaram coloração um pouco avermelhada. O coração teve uma redução de aproximadamente 1 cm no tamanho, e considerável alteração da sua forma original, ficando mais arredondado.

A massa, ao final do experimento, foi de $6,20 \pm 0,005$ g, redução de 47,05% da massa inicial do coração. Estes resultados ressaltam a importância do aquecimento do perfusato à temperatura de 37°C para o processo de decelularização, como já era esperado, já que o aumento da temperatura aumenta a entropia geral do sistema e acelera o processo de lise e remoção celular (GUYETTE et al., 2014; WEYMANN et al., 2011). A adição do manômetro também foi positiva por permitir maior repetitividade do experimento. Ele permitiu o ajuste correto da vazão em função da pressão para ajustar às diferenças de tamanhos ou possíveis diferenças de canulação dos órgãos de um experimento para o outro.

4.4.4 Experimentos utilizando banho térmico

A TABELA 4.1 mostra a redução de massa em cada experimento realizado como banho térmico.

TABELA 4.1 Massas dos corações nos experimentos utilizando banho térmico

Experimento	Massa Inicial (g)	Massa final (g)	Redução (g)	Redução %
1	10,72	7,21	3,51	32,74%
2	10,84	6,60	4,24	39,11%
3	10,19	6,58	3,61	35,43%

Todos os experimentos tiveram resultados similares com relação à redução da massa, com variações menores que 0,7 g. A decelularização foi visualmente boa nos três experimentos, como pode ser observado na FIGURA 4.10. Estudos anteriores (OTT et al., 2008; AKHYARI et al., 2011) mostram que, na prática, todas MCEs apresentam resíduos de células, após a decelularização, sendo, portanto, a qualidade da decelularização medida, dentre outros parâmetros, pela capacidade retirar a maior quantidade possível das células. O segundo experimento, foi o melhor dessa triplicata, resultando em um coração completamente esbranquiçado, com perda de 39,11% da massa inicial. A redução média da massa foi de 35,76%. É possível notar também a alteração na forma do coração que ficou com a ponta mais arredondada, devido à retração do ventrículo esquerdo, e com redução de tamanho dos átrios.

O equipamento desenvolvido para esses experimentos foi capaz de realizar a decelularização. Porém, o método usado para controlar a temperatura, por meio do banho térmico, foi considerado ineficiente por ter resposta muito lenta às alterações e a necessidade de pré-aquecer o perfusato, antes de inserí-lo em circulação. A água do banho ainda corria risco de contaminar o perfusato dentro do béquer. Além disso, havia a possibilidade de derramamento do perfusato no banho, resultando em produção de espuma e necessidade de troca da água do banho, tornando o processo mais trabalhoso e sucessível a falhas.

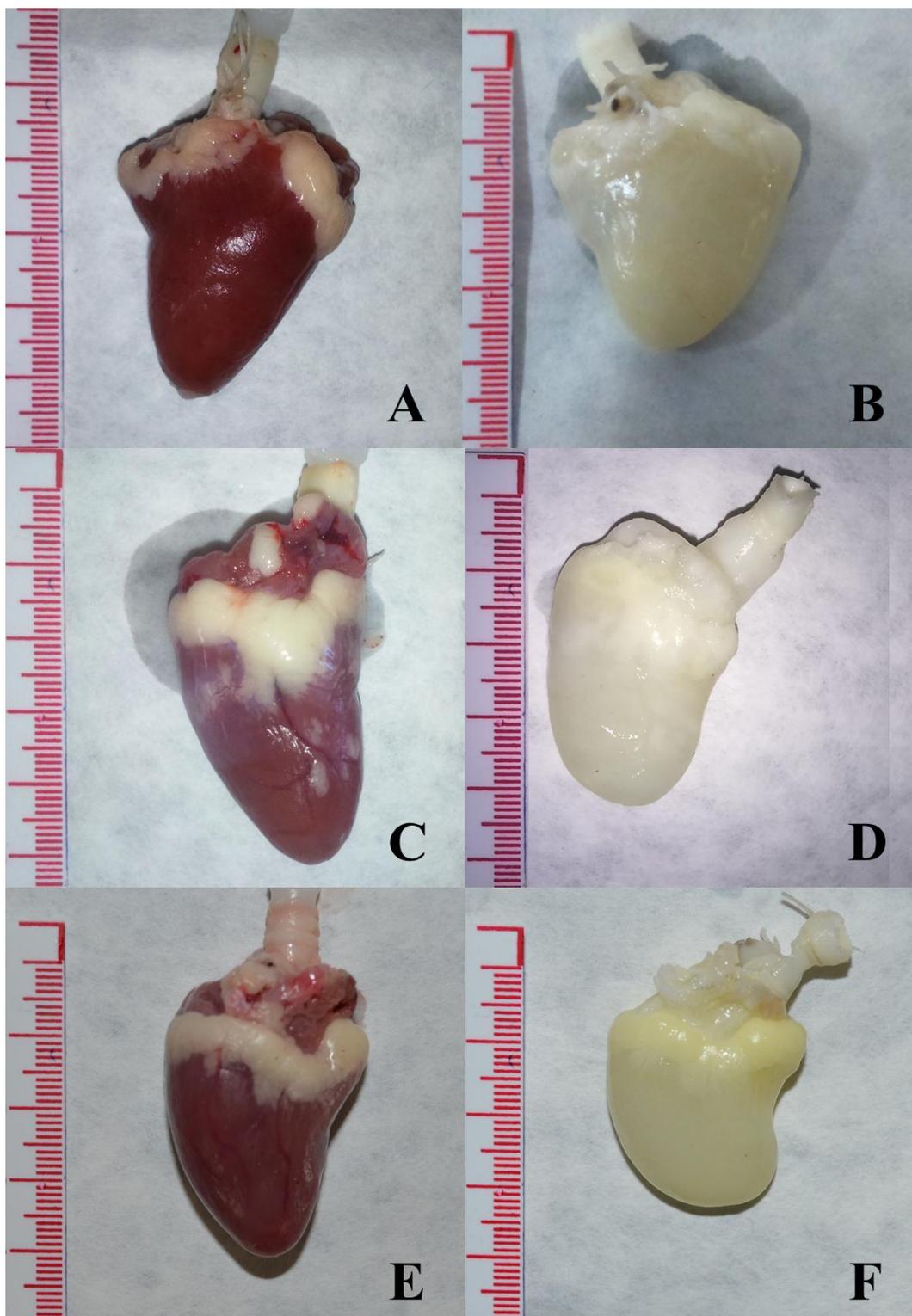


FIGURA 4.10 Fotos dos corações nos experimentos utilizando banho térmico (escala em mm).

A,C,E: corações antes do 1º, 2º, 3º experimento de decelularização respectivamente

B,D,F: corações após o 1º, 2º, 3º experimento de decelularização respectivamente

4.4.5 Experimentos utilizando trocador de calor de serpentina

A TABELA 4.2 mostra os valores medidos para massa dos corações nos três experimentos realizados.

TABELA 4.2 Massas dos corações nos experimentos utilizando trocador de calor de serpentina

Experimento	Massa Inicial (g)	Massa final (g)	Redução (g)	Redução %
1	11,26	8,28	2,98	26,47%
2	13,09	6,67	6,42	49,05%
3	14,23	9,69	4,54	31,90%

Nestes ensaios, as reduções relativas das massas foram significativamente diferentes de um experimento para outro, chegando a quase dobrar do primeiro para o segundo experimento. Porém, a média de redução da massa foi de 35,80%, próximo do alcançado pelos experimentos anteriores. Uma possível razão para a diferença nos resultados pode ser a diferença dentre massa inicial dos corações escolhidos, porém sem uma relação lógica entre a grandeza da massa inicial e a redução percentual alcançada pela decelularização.

Os resultados também podem ser avaliados por meio da FIGURA 4.11, na qual é possível notar que o primeiro experimento resultou em um coração mais amarelado, possivelmente devido à presença de grande quantidade de fibras elásticas, ou tecido adiposo com muitos carotenos (JUNQUEIRA; CASAROLI-MARANO; CARNEIRO, 2008). No segundo experimento, quase metade da massa inicial foi perdida durante a decelularização, e também ocorreu uma redução significativa no comprimento do coração.

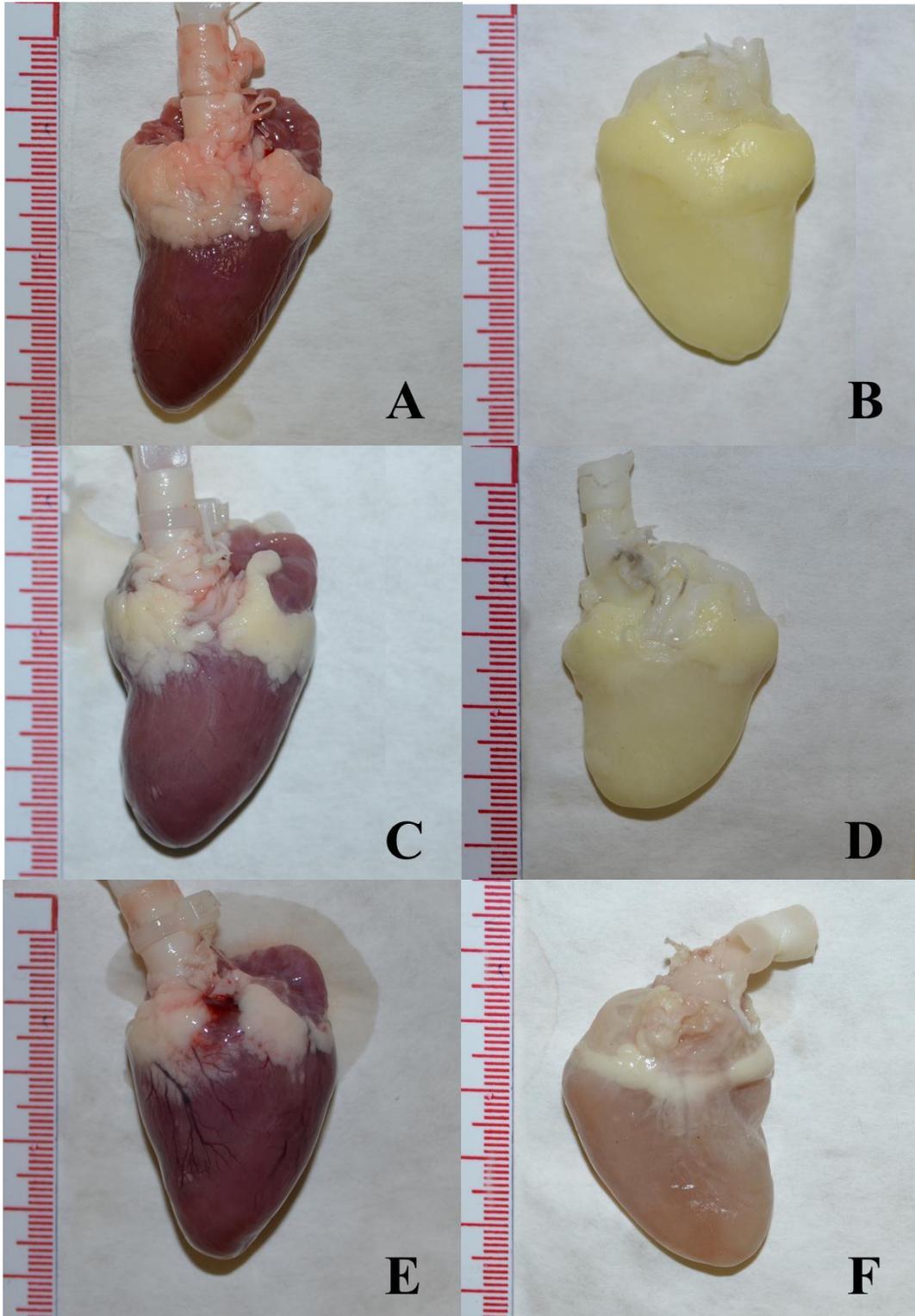


FIGURA 4.11 Fotos dos corações nos experimentos utilizando trocador de calor (escala em mm).

A,C,E: corações antes do 1º, 2º, 3º experimento de decelularização respectivamente

B,D,F: corações após o 1º, 2º, 3º experimento de decelularização respectivamente

O último experimento, apesar de ter reduzido mais massa do que o primeiro, apresentou uma coloração muito avermelhada, devido a presença de sangue coagulado no ventrículo direito do coração. A foto da FIGURA 4.12B foi tirada do mesmo experimento doze horas depois da foto da FIGURA 4.12A, portanto a MEC avermelhou durante a última lavagem com PBS1X. Isso ocorreu devido à diluição do sangue coagulado preso no ventrículo direito, que deu o aspecto de que a decelularização havia retrocedido.

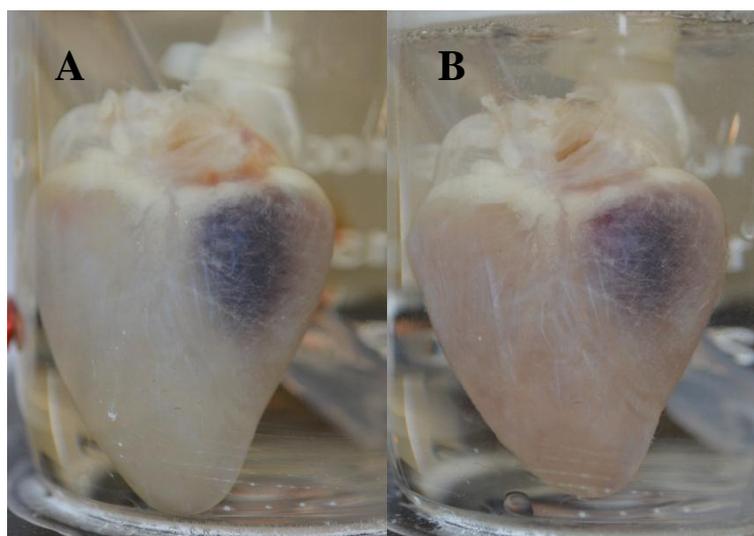


FIGURA 4.12 Fotos do 3º experimento da segunda triplicata.

A) Coração após 12 horas de SDS 4% B) Coração após 12 horas de SDS 4% + 12h de PBS 1x

Por isso, outra importante variável que pode causar essas diferenças nos resultados é a técnica de preparação e canulação, que deve ser realizada cuidadosamente para retirar o sangue coagulado e facilitar ao máximo a correta perfusão do coração pelo método utilizado. Os cuidados devem ser tomados na seleção do coração e na limpeza correta externa, e interna do coração.

Portanto, para realizar a decelularização de órgão maiores ou, principalmente, em aplicações mais precisas é necessária a realização do tratamento inicial do órgão com soluções com heparina, ou outro anticoagulante, para remoção do sangue do órgão e impedir formação de embolias que atrapalhem na perfusão (BAPTISTA et al., 2009). Esse tratamento pode ser realizado antes do abate do animal, ou logo após a remoção do órgão com perfusão de soluções anticoagulantes resfriadas (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GRAUSS et al., 2005).

4.4.6 Experimentos com a montagem final

A TABELA 4.3 mostra o resumo dos resultados das medições de massa para os três experimentos realizados com a montagem final.

TABELA 4.3 Massas dos corações nos experimentos da montagem final

Experimento	Massa Inicial (g)	Massa final (g)	Redução (g)	Redução %
1	11,97	6,18	5,79	48,37%
2	10,52	7,31	3,21	30,51%
3	9,50	6,45	3,05	32,11%

O valor médio da redução das massas foi de 37,0%, ligeiramente maior do que nas montagens anteriores. Em geral, todos os experimentos apresentaram boa decelularização, como pode ser constatado na FIGURA 4.13. As alterações em relação à montagem anterior diminuíram as possibilidades de erros ou má execução do experimento.

As adições da câmara de decelularização e dos recipientes de troca do perfusato deixaram o equipamento mais prático. Os experimentos tornaram-se mais fáceis de realizar, e com menor influência de eventos externos, reduzindo consideravelmente a necessidade de manipulação do órgão e dos fluidos de decelularização.

Os testes mostraram resultados compatíveis com protocolos similares encontrados na literatura, utilizando o SDS (WEYMANN et al., 2011; OTT et al., 2008), apesar da necessidade de realização de estudos complementares histológicos e mecânicos para avaliar a qualidade da MEC resultante das decelularizações realizadas. Macroscopicamente, a decelularização ocorreu uniformemente em todo coração, indicando a capacidade de perfusão do equipamento. A perda de aproximadamente um terço da massa, que foi medido, também é um bom indicativo da remoção das células.

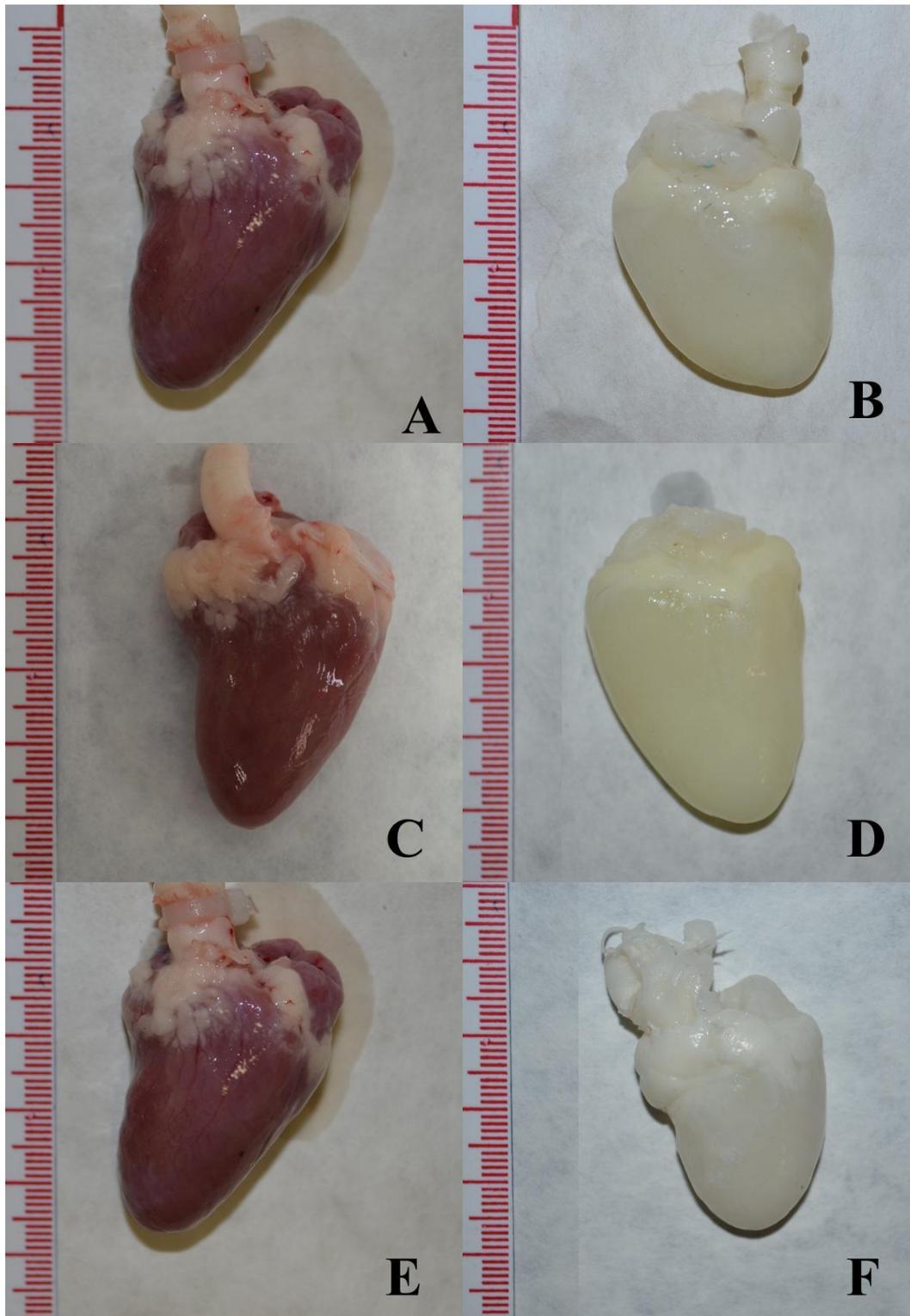


FIGURA 4.13 Fotos dos corações nos experimentos da montagem final (escala em mm).

A,C,E: corações antes do 1º, 2º, 3º experimento de decelularização respectivamente

B,D,F: corações após o 1º, 2º, 3º experimento de decelularização respectivamente

4.4.7 Teste do balão

O teste do balão é um indicativo da estabilidade mecânica da MEC, após a decelularização. A FIGURA 4.14 mostra os valores médios da pressão medida em relação ao volume inserido no coração, para cada montagem realizada, com seus respectivos erros. Os dados medidos em cada ponto de cada experimento estão apresentados no ANEXO B.

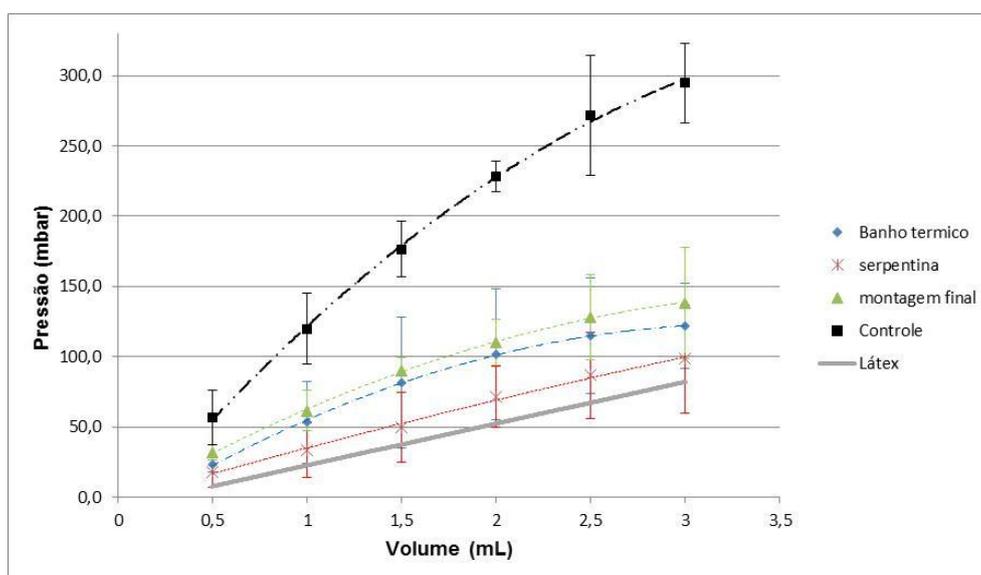


FIGURA 4.14 Resultados medidos no teste do balão para as montagens com banho térmico (azul), com trocador de calor de serpentina (vermelho), e montagem final (verde). A curva em preto mostra os resultados medidos para o controle, com corações de galinha sem o procedimento de decelularização. A curva em cinza mostra a pressão exercida apenas pelo látex do balão utilizados em todos os experimentos.

Os valores medidos para todos os corações decelularizados foram estatisticamente insignificantes entre si ($P > 0,1$) para os mesmos volumes, demonstrando pequena ou nenhuma diferença no aspecto de estabilidade mecânica da matriz extracelular em relação à montagem utilizada. Esta estabilidade está ligada a qualidade final matriz extracelular, que é um resultado direto do tipo de protocolo de decelularização utilizado (WAINWRIGHT et al., 2009). Neste trabalho, foi utilizado apenas um protocolo de decelularização, em todos os experimentos.

Em geral, os corações decelularizados ofereceram menor resistência à expansão volumétrica do que os corações naturais (Controle). Essa redução era esperada devido à

retirada das células musculares e dos possíveis danos que processo pode causar à matriz extracelular. Isso pode também inferir que a resistência estrutural do coração diminuiu com a decelularização, no presente estudo (WEYMANN et al., 2011; SÁNCHEZ et al., 2015).

Vários trabalhos avaliaram as propriedades mecânicas das matrizes extracelulares, após o procedimento de decelularização, e explicaram a influência desta no órgão (COSTA; HOLMES; MCCULLOCH, 2001; FOMOVSKY; THOMPOPOULOS; HOLMES, 2010). Esses trabalhos mostram ligeiro aumento de rigidez do tecido decelularizado, avaliados em testes de tração biaxial. Porém, Ott et al. (2008) e Witzenburg et al. (2012) mostraram que quando se corrige o valor da espessura, nesses testes, as diferenças entre os módulos tangenciais dos tecidos decelularizados e naturais desaparecem. Existe, também, uma grande dificuldade natural para delinear as características mecânicas dos constituintes do miocárdio por causa das suas interações estruturais (COSTA; HOLMES; MCCULLOCH, 2001), que reduzem a confiabilidade das tentativas de medição da rigidez. Além disso, o trabalho de Wang et al. (2010) mostrou que as propriedades mecânicas alteradas com a decelularização tendem a retornarem ao comportamento natural com a recelularização do tecido.

Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho indicam a redução da rigidez do órgão decelularizado, o que pode ser deduzido da lei de *Starling* do coração (Item 2.6), e pode ter suas causas ligadas a danos na matriz extracelular originados pelo processo. Porém, pode ser também reflexo da utilização de órgão inteiro nos testes, que diferentemente do teste biaxial que retira uma amostra do tecido, alterando todas as condições de contorno do sistema. No entanto, mesmo com a redução da estabilidade mecânica da matriz extracelular é esperada a recuperação da mesma com a recelularização do órgão.

4.4.8 Microscopia ótica

A análise do tecido decelularizado, por meio de microscopia ótica, permitiu comparar o tecido resultante da decelularização com o tecido do coração natural, não decelularizado, utilizado como controle.

Na coloração com H&E, a hematoxilina cora estruturas de caráter ácido, como os núcleos celulares, esses sendo visualizados na cor roxa ou azul-púrpura. Por sua vez, a eosina cora estruturas de caráter básico, como citoplasma e fibras de colágeno, esses sendo visualizados na cor rósea a avermelhado. A FIGURA 4.15 mostra as principais imagens obtidas.

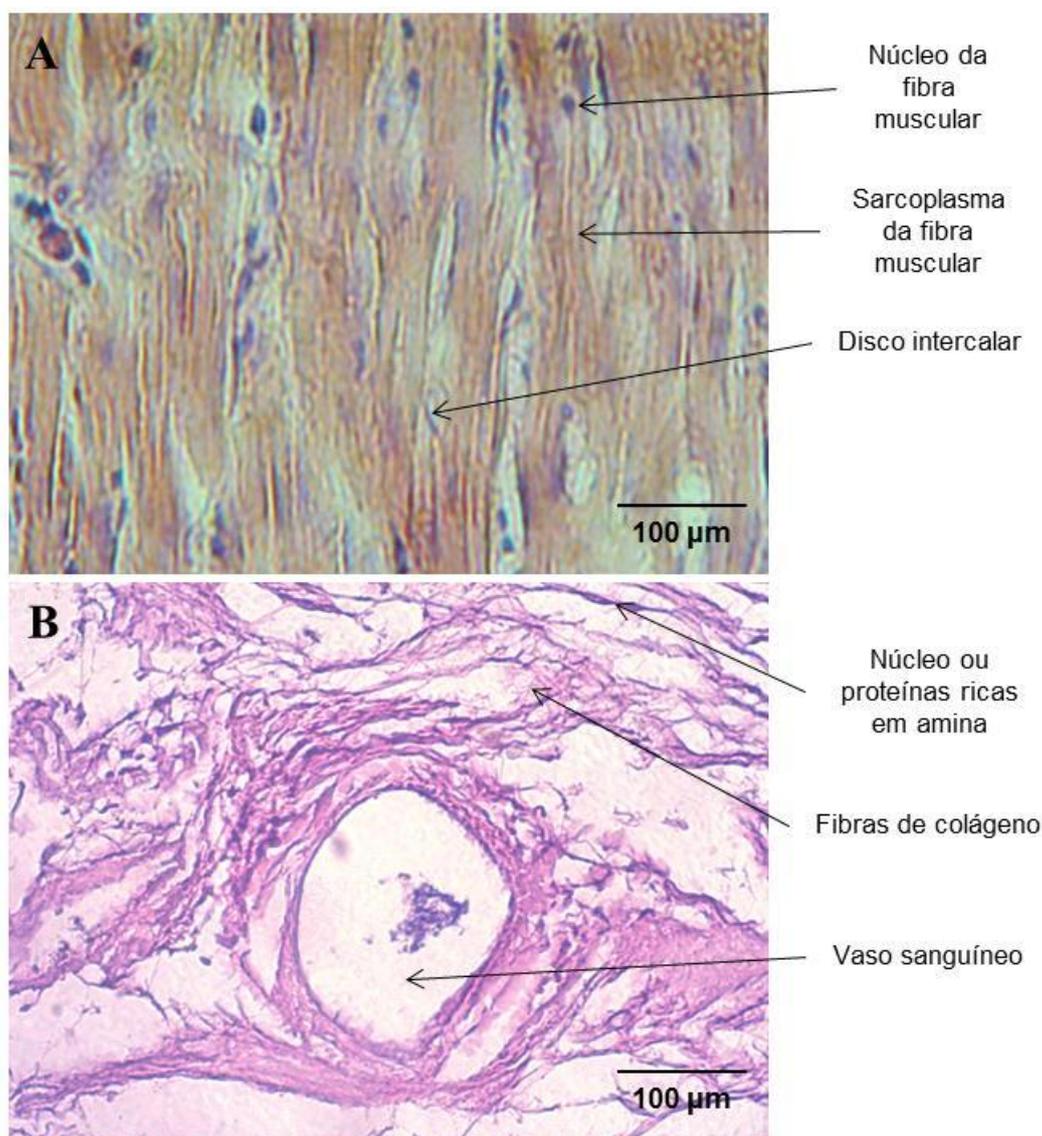


FIGURA 4.15 Imagens da microscopia ótica com corante H&E (escala em 100µm).

A) imagem do ventrículo esquerdo coração natural com aumento de 200X.

B) imagem do ventrículo esquerdo do coração decelularizado com aumento de 200X.

Na imagem de controle (FIGURA 4.15A), é possível visualizar o arranjo longitudinal das fibras musculares, coradas em rósea, e o núcleo das fibras, corado em roxo. Outro fator comumente observado no tecido de controle é a presença de discos intercalares,

estruturas que unem uma fibra muscular a outra, conferindo a característica de tecido estriado cardíaco.

Já no tecido decelularizado (FIGURA 4.15B), não é possível observar o arranjo convencional das fibras musculares do coração. Observa-se ausência de estrutura celular característica, presença sugestiva de restos de núcleos ou proteínas ricas em aminas (na cor roxa) e presença sugestivas fibras de colágeno (em róseo).

As análises comprovam a decelularização também em nível microscópico, com grande remoção celular e de seus restos (como núcleos e miofibrilas). São necessários outros testes, além da microscopia, para afirmar a remoção completa de todos os componentes celulares. Gilbert et al (2006) verificaram a improbabilidade de ocorrer remoção completa das células no tecido decelularizado, porém, as consequências biológicas de pequenas quantidades de material nuclear ou detritos citoplasmáticos, dentro do arcabouço, não apresentaram relatos que mostrem uma relação de causa-efeito entre esses remanescentes celulares e a resposta adversa do hospedeiro. Na FIGURA 4.15, também é possível ressaltar a presença da estrutura de um vaso sanguíneo, e é possível observar, nesse vaso, as túnicas que o compõe (íntima, média e adventícia) em bom estado de preservação. A presença de vaso sanguíneo preservado, bem como a sugestão de fibras de colágeno, aumenta as evidências de preservação da MEC, e do arcabouço, após o processo de decelularização. Isso é um fator de grande importância para as futuras aplicações práticas e utilização para recelularização do tecido espesso ou órgão completo (WANG et al., 2010; OTT et al., 2008), pois a grande expectativa da engenharia de órgão, com auxílio da decelularização, está na preservação da macro e microarquitetura, da vasculatura hierárquica, e sinais bioquímicos para adesão, proliferação e diferenciação celular (MOSER; OTT, 2014).

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

O equipamento desenvolvido foi capaz de realizar satisfatoriamente a decelularização do órgão escolhido para teste.

Foi desenvolvido um acionador digital para a bomba de rolete, permitindo a adição de um controlador capaz de manter a velocidade da bomba conforme desejado, durante todo o procedimento de decelularização.

O controle de temperatura foi desenvolvido, composto por uma serpentina inserida no banho ultra termostático, sendo que dentro da serpentina foi utilizado o fluido de decelularização. Essa montagem permitiu o controle rápido e eficiente da temperatura, para valores entre -30 a 200 °C, com precisão de $\pm 0,1$ K, tornando o processo de remoção celular mais eficaz.

O circuito de perfusão foi capaz de distribuir o perfusato por todo órgão com eficiência, obtendo bons resultados no teste de decelularização.

O circuito e a câmara de decelularização permitiram a realização de todo processo de maneira limpa e simples, evitando a manipulação do órgão e contaminação externa, além de diminuir o consumo de perfusato, tornando os experimentos de baixo custo.

Os resultados dos testes mostraram que esse equipamento é um modelo simples, útil e com excelente funcionalidade para realizar diferentes estudos com o objetivo de produzir um arcabouço tridimensional bioartificial.

Propostas futuras:

Algumas modificações poderão ser realizadas para ajustar o equipamento para ser usado em diferentes processos de decelularização ou diferentes órgãos. Alterando, por exemplo, o modo de perfusão para pressão constante, ou adicionando novos métodos em conjunto com a perfusão, como a NTIRE ou fluido supercrítico.

Realizar mais teste para qualificar os resultados obtidos pela decelularização, por exemplo, avaliação da resistência mecânica do tecido pelo teste de tensão deformação biaxial.

Além disso, uma continuidade natural do trabalho seria utilizá-lo em estudos para desenvolver e melhorar novos protocolos de decelularização, e estudar a técnica de repovoamento da MEC.

ABSTRACT

A critical difficulty of tissue engineering is the creation of scaffolds that can be used for the development of complex three-dimensional tissues or even whole organs. One solution would be to use the extracellular matrix from own organ to be transplanted performing its decellularization. In this process, the withdrawal and lysis of the cellular materials occurs creating a bioartificial scaffold. This study described the method to develop an equipment capable of transporting through the organ, by perfusion, the decellularization fluid and allowing creation of *in vitro* acellular scaffold while maintaining the three-dimensional architecture of the organ. It was designed to meet several existing decellularization protocols and may modify in a controlled manner the flow and perfusion pressure, the temperature of each procedure and cannulation technique of the organ. The device was tested with chicken hearts, and was efficient in performing the decellularization protocol using the perfusion method. This study also showed all the evolution of the design and development of this equipment, the improvements and results. In order to evaluate the quality of the resulting tissue, decellularized hearts were assessed according to mechanical stability, and microscopic and macroscopic analysis. Ultimately, it was developed an equipment capable of accomplishing decellularization of different organs, using different protocols found in the literature. Further amendments can be made to improve efficiency to accomplish the decellularization of diverse organs. It is expected that the equipment can be helpful in the study of characterization and improvement of the cells removal process, apart from allowing future adaptations to the process of recellularization and use in different organs.

Keywords: Decellularization, Tissue Bioengineering, Biomaterials, Perfusion process, Whole Organ Decellularization

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABTO. <http://www.abto.org.br/>. **ABTO- Associação Brasileira de Transplante de Órgãos**, 2015. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2015/anual-n-associado.pdf>. Acesso em: 30 Março 2016.

AKHYARI, P.; AUBIN, H.; GWANMESIA, P.; BARTH, M.; HOFFMANN, S.; HUELSMANN, J.; LICHTENBERG, A. The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 9, p. 915-926, 2011.

ALHAMDANI, M. S. S.; SCHRÖDER, C.; WERNER, J.; GIESE, N.; BAUER, A.; HOHEISEL, J. D. Single-step procedure for the isolation of proteins at near-native conditions from mammalian tissue for proteomic analysis on antibody microarrays. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 2, p. 963-971, 2010.

BADYLAK, S. F.; FREYTES, D. O.; GILBERT, T. W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. **Acta biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2009.

BADYLAK, S. F.; GILBERT, T. W. **Immune response to biologic scaffold materials**. Seminars in immunology. [S.l.]: Academic Press. 2008. p. 109-116.

BADYLAK, S. F.; TAYLOR, D.; UYGUN, K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. **Annual review of biomedical engineering**, v. 13, p. 27-53, 2011.

BAPTISTA, P. M.; ORLANDO, G.; MIRMALEK-SANI, S. H.; SIDDIQUI, M.; ATALA, A.; SOKER, S. **Whole organ decellularization-a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering**. Annual International Conference of the IEEE. [S.l.]: Engineering in Medicine and Biology Society. 2009. p. 6526-6529.

BELL, R. M.; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 50, n. 6, p. 940-950, 2011.

BOYD, W. D.; JOHNSON 3RD, W. E.; SULTAN, P. K.; DEERING, T. F.; MATHENY, R. G. Pericardial reconstruction using an extracellular matrix implant correlates with reduced risk of postoperative atrial fibrillation in coronary artery bypass surgery patients. **The heart surgery forum**, 2010. E311-6.

BROWN, B. N.; FREUND, J. M.; HAN, L.; RUBIN, J. P.; REING, J. E.; JEFFRIES, E. M.; BADYLAK, S. F. Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 4, p. 411-421, 2011.

CARTMELL, J. S.; DUNN, M. G. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. **Journal of biomedical materials research**, v. 49, n. 1, p. 134-140, 2000.

CEBOTARI, S.; TUDORACHE, I.; JAEKEL, T.; HILFIKER, A.; DORFMAN, S.; TERNES, W.; LICHTENBERG, A. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. **Artificial organs**, v. 34, n. 3, p. 206-210, 2010.

COKER, A. K. Ludwig's Applied Process Design for Chemical and Petrochemical Plants. **Gulf Professional Publishing**, Burlington, MA, n. 4, 2007.

COLAH, S.; FREED, D. H.; MUNDT, P.; GERMSCHEID, S.; WHITE, P.; ALI, A.; FALTER, F. Ex vivo perfusion of the swine heart as a method for pre-transplant assessment. **Perfusion**, v. 27, n. 5, p. 408-413, 2012.

COLE, M. B. Alteration of cartilage matrix morphology with histological processing. **Journal of microscopy**, v. 133, n. 2, p. 129-140, 1984.

CORTIELLA, J.; NILES, J.; CANTU, A.; BRETTLER, A.; PHAM, A.; VARGAS, G.; NICHOLS, J. E. Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem

cell differentiation and tissue formation. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 8, p. 2565-2580, 2010.

COSTA, K. D.; HOLMES, J. W.; MCCULLOCH, A. D. Modelling cardiac mechanical properties in three dimensions. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 359, n. 1783, p. 1233-1250, 2001.

COUPER, J. R.; PENNEY, W. R.; FAIR, J. R. Chemical Process Equipment revised - Selection and Design. **Gulf Professional Publishing**, Burlington, MA, n. 2, 2005.

COURTMAN, D. W.; PEREIRA, C. A.; KASHEF, V.; MCCOMB, D.; LEE, J. M.; WILSON, G. J. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. **Journal of biomedical materials research**, v. 28, n. 6, p. 655-666, 1994.

COX, B.; EMILI, A. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. **Nature protocols**, v. 1, n. 4, p. 1872-1878, 2006.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233-3243, 2011.

DALY, K. A.; STEWART-AKERS, A. M.; HARA, H.; EZZELARAB, M.; LONG, C.; CORDERO, K.; BADYLAK, S. F. Effect of the α Gal epitope on the response to small intestinal submucosa extracellular matrix in a nonhuman primate model. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 12, p. 3877-3888, 2009.

DASI, L. P.; SIMON, H. A.; SUCOSKY, P.; YOGANATHAN, A. P. Fluid mechanics of artificial heart valves. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 36, n. 2, p. 225-237, 2009.

DE MAERTELEIRE, E. Heat transfer to a helical cooling coil in mechanically agitated gas-liquid dispersions. **Chemical Engineering Science**, UK, v. 33, n. 8, p. 1107-1113, 1978.

DEEKEN, C. R.; WHITE, A. K.; BACHMAN, S. L.; RAMSHAW, B. J.; CLEVELAND, D. S.; LOY, T. S.; GRANT, S. A. Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 96, n. 2, p. 199-206, 2011.

DONG, X.; WEI, X.; YI, W.; GU, C.; KANG, X.; LIU, Y.; YI, D. RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 11, p. 2327-2336, 2009.

DU, L.; WU, X.; PANG, K.; YANG, Y. Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold. **British Journal of Ophthalmology**, 2010.

ELDER, B. D.; KIM, D. H.; ATHANASIOU, K. A. Developing an articular cartilage decellularization process toward facet joint cartilage replacement. **Neurosurgery**, v. 66, n. 4, p. 722-7, 2010.

FEIL, G.; CHRIST-ADLER, M.; MAURER, S.; CORVIN, S.; RENNEKAMPFF, H. O.; KRUG, J.; SIEVERT, K. D. Investigations of urothelial cells seeded on commercially available small intestine submucosa. **European urology**, v. 50, n. 6, p. 1330-1337, 2006.

FIGLIOLA, R. S.; BEASLEY, D. **Theory and design for mechanical measurements**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2015.

FLYNN, L. E. The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. **Biomaterials**, v. 31, n. 17, p. 4715-4724, 2010.

FOMOVSKY, G. M.; THOMPOPOULOS, S.; HOLMES, J. W. Contribution of extracellular matrix to the mechanical properties of the heart. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 48, n. 3, p. 490-496, 2010.

FREYTES, D. O.; STONER, R. M.; BADYLAK, S. F. Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 84, n. 2, p. 408-414, 2008.

FUNAMOTO, S.; NAM, K.; KIMURA, T.; MURAKOSHI, A.; HASHIMOTO, Y.; NIWAYA, K.; KISHIDA, A. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3590-3595, 2010.

FUNG, Y.-C. **Biomechanics: circulation**. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2013.

GAILIT, J.; RUOSLAHTI, E. Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 26, p. 12927-12932, 1988.

GEANKOPLIS, C. J. **Transport Processes and Separation Process Principles**. 4. ed. New Jersey, NJ: Prentice Hall, 2009.

GILBERT, T. W.; WOGNUM, S.; JOYCE, E. M.; FREYTES, D. O.; SACKS, M. S.; BADYLAK, S. F. Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder derived extracellular matrix. **Biomaterials**, v. 29, n. 36, p. 4775-4782, 2008.

GILBERT, W. T.; SELLARO, L. T.; BADYLAK, F. S. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675-3683, 2006.

GILLIES, A. R.; SMITH, L. R.; LIEBER, R. L.; VARGHESE, S. Method for decellularizing skeletal muscle without detergents or proteolytic enzymes. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 4, p. 383-389, 2010.

GIUSTI, S.; BOGETTI, M. E.; BONAFINA, A.; DE PLAZAS, S. F. An improved method to obtain a soluble nuclear fraction from embryonic brain tissue. **Neurochemical research**, v. 34, n. 11, p. 2022-2029, 2009.

GRAUSS, R. W.; HAZEKAMP, M. G.; OPPENHUIZEN, F.; VAN MUNSTEREN, C. J.; GITTENBERG-DE GROOT, A. C.; DERUITER, M. C. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. **European journal of cardio-thoracic surgery**, v. 27, n. 4, p. 566-571, 2005.

GUI, L.; CHAN, S. A.; BREUER, C. K.; NIKLASON, L. E. Novel utilization of serum in tissue decellularization. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 16, n. 2, p. 173-184, 2009.

GUYETTE, J. P.; GILPIN, S. E.; CHAREST, J. M.; TAPIAS, L. F.; REN, X.; OTT, H. C. Perfusion decellularization of whole organs. **Nature protocols**, v. 9, n. 6, p. 1451-1468, 2014.

HENDERSON, P. W.; NAGINENI, V. V.; HARPER, A.; BAVINCK, N.; SOHN, A. M.; KRIJGH, D. D.; SPECTOR, J. A. Development of an acellular bioengineered matrix with a dominant vascular pedicle. **Journal of Surgical Research**, v. 164, n. 1, p. 1-5, 2010.

HODDE, J.; JANIS, A.; ERNST, D.; ZOPF, D.; SHERMAN, D.; JOHNSON, C. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part I. Composition and matrix architecture. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 4, p. 537-543, 2007.

HOPKINSON, A.; SHANMUGANATHAN, V. A.; GRAY, T.; YEUNG, A. M.; LOWE, J.; JAMES, D. K.; DUA, H. S. Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 14, n. 4, p. 371-381, 2008.

HOROWITZ, B.; BONOMO, R.; PRINCE, A. M.; CHIN, S. N.; BROTMAN, B.; SHULMAN, R. W. Solvent/detergent-treated plasma: a virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. **Blood**, v. 79, n. 3, p. 826-831, 1992.

INCROPERA, F. P. "**Fundamentals of heat and mass transfer**". 7^a. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2011.

JACKSON, D. W.; GROOD, E. S.; WILCOX, P.; BUTLER, D. L.; SIMON, T. M.; HOLDEN, J. P. The effects of processing techniques on the mechanical properties of bone-anterior cruciate ligament-bone allografts An experimental study in goats. **The American journal of sports medicine**, v. 16, n. 2, p. 101-105, 1988.

JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Cell fixatives for immunostaining. **Immunocytochemical Methods and Protocols**, p. 55-61, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CASAROLI-MARANO, J.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan, 2008.

KARABEKMEZ, F. E.; DUYMAZ, A.; MORAN, S. L. Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand. **Hand**, v. 4, n. 3, p. 245-249, 2009.

KASIMIR, M. T.; RIEDER, E.; SEEBACHER, G.; WOLNER, E.; WEIGEL, G.; SIMON, P. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. **The International journal of artificial organs**, v. 26, n. 5, p. 421-427, 2003.

KLEBE, R. J. Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. **Nature**, v. 250, n. 463, p. 248-251, 1974.

LAMÉ, G. **Theorie mathématique de l'Elasticite**. Paris: Mallet-Bachelier, 1852.

LANGENDORFF, O. "Untersuchungen am uberlebenden Säugethierherzen". **Pflügers Arch für die Gesamte Physiologie des Menschen and der Tiere**, v. 61, p. 291-332, 1895.

LAUDA. <http://www.lauda-brinkmann.com/>. **LAUDA**, 30 out. 1998. Disponível em: <<http://www.lauda-brinkmann.com/downloads/manuals/A%20100%20+%20A%20100%20T.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2015.

LAUDA. <http://www.lauda.de>. **lauda**, 2005. Disponível em: <http://www.lauda.de/fileadmin/user_upload/lauda/Documents/Betriebsanleitungen/Englisch/YACE0088_a1_ECO_Gold_Internet_11-08-25.pdf>. Acesso em: 20 out. 2015.

LEE, R. C. Cell injury by electric forces. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1066, n. 1, p. 85-91, 2006.

LEHR, E. J.; RAYAT, G. R.; CHIU, B.; CHURCHILL, T.; MCGANN, L. E.; COE, J. Y.; ROSS, D. B. Decellularization reduces immunogenicity of sheep pulmonary artery vascular patches. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 141, n. 4, p. 1056-1062, 2011.

LOPES, M. D.; MOINO, C. A.; DA SILVA ROSA, V.; SILVA, A. C. R. G.; DE MORAES JR, D. Comparative between coefficients Sieder-Tate equation for heat transfer through tubular baffle. **Unisanta Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 74-78, 2013.

LUMPKINS, S. B.; PIERRE, N.; MCFETRIDGE, P. S. A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. **Acta biomaterialia**, v. 4, n. 4, p. 808-816, 2008.

MACCHIARINI, P.; JUNGEBLUTH, P.; GO, T.; ASNAGHI, M. A.; REES, L. E.; COGAN, T. A.; DICKINSON, S. C. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. **The Lancet**, v. 372, n. 9655, p. 2023-2030, 2008.

MEYER, S. R.; CHURCHILL, T. A.; ZHU, L.; LAKEY, J. R.; ROSS, D. B. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 79, n. 2, p. 254-262, 2006.

MICROCHIP. PIC18F2331/2431/4331/4431. **Data Sheet**, 2003. 393.

MISHRA, D. K.; THRALL, M. J.; BAIRD, B. N.; OTT, H. C.; BLACKMON, S. H.; KURIE, J. M. .; KIM, M. P. Human lung cancer cells grown on acellular rat lung matrix create perfusable tumor nodules. **The Annals of thoracic surgery**, v. 93, n. 4, p. 1075-1081, 2012.

MOMTAHAN, N.; SUKAVANESHVAR, S.; ROEDER, B. L.; COOK, A. D. "Strategies and processes to decellularize and recellularize hearts to generate functional organs and reduce the risk of thrombosis". **Tissue Engineering Part B: Reviews**, 2014.

MOMTAHAN, N.; SUKAVANESHVAR, S.; ROEDER, B. L.; COOK, A. D. Strategies and processes to decellularize and recellularize hearts to generate functional

organs and reduce the risk of thrombosis. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 21, n. 1, p. 115-132, 2014.

MONTOYA, C. V.; MCFETRIDGE, P. S. Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 15, n. 2, p. 191-200, 2009.

MOSER, P. T.; OTT, H. C. Recellularization of organs: what is the future for solid organ transplantation? **Current opinion in organ transplantation**, v. 19, n. 6, p. 603-609, 2014.

MOSTOW, E. N.; HARAWAY, G. D.; DALSING, M.; HODDE, J. P.; KING, D.; GROUP, O. V. U. S. Effectiveness of an extracellular matrix graft (OASIS Wound Matrix) in the treatment of chronic leg ulcers: a randomized clinical trial. **Journal of vascular surgery**, v. 41, n. 5, p. 837-843, 2005.

NAKAYAMA, K. H.; BATCHELDER, C. A.; LEE, C. I.; TARANTAL, A. F. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 7, p. 2207-2216, 2010.

NELSON, C. M.; BISSELL, M. J. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 287, 2006.

OGATA, K. **Engenharia de controle moderno**. [S.l.]: Prentice Hall, 2003.

OTT, H. C.; CLIPPINGER, B.; CONRAD, C.; SCHUETZ, C.; POMERANTSEVA, I.; IKONOMOU, L.; VACANTI, J. P. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. **Nature medicine**, v. 16, n. 8, p. 927-933, 2010.

OTT, H. C.; MATTHIESEN, T. S.; GOH, S. K.; BLACK, L. D.; KREN, S. M.; NETOFF, T. I.; TAYLOR, D. A. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. **Nature medicine**, v. 14, n. 2, p. 213-221, 2008.

PATEL, N.; SOLANKI, E.; PICCIANI, R.; CAVETT, V.; CALDWELL-BUSBY, J. A.; BHATTACHARYA, S. K. Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics, v. 8, n. 5, p. 1055-1070, 2008.

PETERSEN, T. H.; CALLE, E. A.; ZHAO, L.; LEE, E. J.; GUI, L.; RAREDON, M. B.; HERZOG, E. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 538-541, 2010.

PHILLIPS, M.; MAOR, E.; RUBINSKY, B. Nonthermal irreversible electroporation for tissue decellularization. **Journal of biomechanical engineering**, v. 132, n. 9, p. 091003, 2010.

PRASERTSUNG, I.; KANAKPANONT, S.; BUNAPRASERT, T.; THANAKIT, V.; DAMRONGSAKKUL, S. Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 85, n. 1, p. 210-219, 2008.

REING, J. E.; BROWN, B. N.; DALY, K. A.; FREUND, J. M.; GILBERT, T. W.; HSIONG, S. X.; BADYLAK, S. F. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, n. 33, p. 8626-8633, 2010.

ROBERT, B. M.; MIHAELA, M. N.; DEREK, Y. M. "Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion". **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 50, p. 940-950, 2011.

ROSS, E. A. . W. M. J. . H. T.; TERADA, N.; CLAPP, W. L.; ADIN, C.; BATICH, C. D. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 11, p. 2338-2347, 2009.

SÁNCHEZ, P. L.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. E.; CONSTANZA, S.; CLIMENT, A. M.; MOSCOSO, I.; GONZALEZ-NICOLAS, M. A.; ESCALANTE, J. L. Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts. **Biomaterials**, v. 61, p. 279-289, 2015.

SANO, M. B.; NEAL, R. E.; GARCIA, P. A.; GERBER, D.; ROBERTSON, J.; DAVALOS, R. V. Towards the creation of decellularized organ constructs using irreversible electroporation and active mechanical perfusion. **Biomedical engineering online**, v. 9, n. 1, p. 83, 2010.

SASAKI, S.; FUNAMOTO, S.; HASHIMOTO, Y.; KIMURA, T.; HONDA, T.; HATTORI, S.; MOCHIZUKI, M. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. **Mol Vis**, v. 15, p. 2022–2028, 2009.

SAWADA, K.; TERADA, D.; YAMAOKA, T.; KITAMURA, S.; FUJISATO, T. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue, v. 83, n. 6, p. 943-949, 2008.

SELLARO, T. L.; RANADE, A.; FAULK, D. M.; MCCABE, G. P.; DORKO, K.; BADYLAK, S. F.; STROM, S. C. Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liver-derived extracellular matrix gels. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 3, p. 1075-1082, 2009.

SHIN'OKA, T.; IMAI, Y.; IKADA, Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 7, p. 532-533, 2001.

SHUPE, T.; WILLIAMS, M.; BROWN, A.; WILLENBERG, B.; PETERSEN, B. E. Method for the decellularization of intact rat liver. **Organogenesis**, v. 6, n. 2, p. 134-136, 2010.

SIERAD, L. N.; SHAW, E. L.; BINA, A.; BRAZILE, B.; RIERSON, N.; PATNAIK, S. S.; SIMIONESCU, D. T. Functional Heart Valve Scaffolds Obtained by Complete Decellularization of Porcine Aortic Roots in a Novel Differential Pressure Gradient Perfusion System. **Tissue Engineering**, n. ja, 2015.

SONG, J. J.; GUYETTE, J. P.; GILPIN, S. E.; GONZALEZ, G.; VACANTI, J. P.; OTT, H. C. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. **Nature medicine**, v. 19, n. 5, p. 646-651, 2013.

SUTHERLAND, F. J.; HEARSE, D. J. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. **Pharmacological Research**, v. 41, n. 6, p. 613-627, 2000.

UYGUN, B. E.; SOTO-GUTIERREZ, A.; YAGI, H.; IZAMIS, M. L.; GUZZARDI, M. A.; SHULMAN, C.; HERTL, M. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. **Nature medicine**, v. 16, n. 7, p. 814-820, 2010.

WAINWRIGHT, J. M.; CZAJKA, C. A.; PATEL, U. B.; FREYTES, D. O.; TOBITA, K.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 16, n. 3, p. 525-532, 2009.

WALDROP, F. S.; PUCHTLER, H.; MELOAN, S. N.; YOUNKER, T. D. Histochemical investigations of different types of collagen. **Acta histochemica. Supplementband**, v. 21, p. 23-31, 1979.

WANG, B.; BORAZJANI, A.; TAHAI, M.; DE JONGH CURRY, A. L.; SIMIONESCU, D. T.; GUAN, J.; LIAO, J. Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 94, n. 4, p. 1100-1110, 2010.

WEYMANN, A.; LOGANATHAN, S.; TAKAHASHI, H.; SCHIES, C.; CLAUS, B.; HIRSCHBERG, K.; SZABO, G. "Development and evaluation of a perfusion decellularization porcine heart model-generation of 3-dimensional myocardial neoscaffolds". **Circulation**, v. 75, p. 852-860, 2011.

WHITTOW, G. C. **Sturkie's avian physiology**. [S.l.]: Academic Press, 1999.

WITZENBURG, C.; RAGHUPATHY, R.; KREN, S. M.; TAYLOR, D. A.; BAROCAS, V. H. Mechanical changes in the rat right ventricle with decellularization. **Journal of biomechanics**, v. 45, n. 5, p. 842-849, 2012.

XU, C. C.; CHAN, R. W.; TIRUNAGARI, N. A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria. **Tissue engineering**, v. 13, n. 3, p. 551-566, 2007.

XU, H.; WAN, H.; SANDOR, M.; QI, S.; ERVIN, F.; HARPER, J. R.; MCQUILLAN, D. J. Host response to human acellular dermal matrix transplantation in a primate model of abdominal wall repair. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 12, p. 2009-2019, 2008.

YANG, B.; ZHANG, Y.; ZHOU, L.; SUN, Z.; ZHENG, J.; CHEN, Y.; DAI, Y. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 16, n. 5, p. 1201-1211, 2010.

YANG, M.; CHEN, C. Z.; WANG, X. N.; ZHU, Y. B.; GU, Y. J. Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 91, n. 1, p. 354-361, 2009.

ANEXO A

Algoritmo, em C, usado no compilador CCS@:

```

/*****
Controlador MCE
Autor: Jonathas Haniel
Versao 2.0                               PIC18F4550
Coleta set_point para rotaçao e aciona o potenciometro digital usando PID
LABBIO 2015

*****/

#include <18f4550.h>

#DEVICE ADC=10
#FUSES NOWDT           //No Watch Dog Timer
#FUSES WDT128         //Watch Dog Timer uses 1:128 Postscale
#FUSES HS             //High speed Osc (> 4mhz for PCM/PCH) (>10mhz for
PCD)
#FUSES NOPROTECT      //Code not protected from reading
#FUSES BROWNOUT       //Reset when brownout detected
#FUSES BORV20         //Brownout reset at 2.0V
#FUSES NOPUT          //No Power Up Timer
#FUSES CPD            //Data EEPROM Code Protected
#FUSES STVREN         //Stack full/underflow will cause reset
#FUSES NODEBUG        //No Debug mode for ICD
#FUSES LVP            //Low Voltage Programming on B3(PIC16) or B5(PIC18)
#FUSES NOWRT         //Program memory not write protected
#FUSES NOWRTD        //Data EEPROM not write protected
#FUSES IESO          //Internal External Switch Over mode enabled
#FUSES PBADEN        //PORTB pins are configured as analog input channels
on RESET
#FUSES NOWRTC        //configuration not registers write protected
#FUSES NOWRTB        //Boot block not write protected
#FUSES NOEBTR        //Memory not protected from table reads
#FUSES MCLR          //Master Clear pin enabled
#FUSES LPT1OSC       //Timer1 configured for low-power operation
#FUSES NOXINST       //Extended set extension and Indexed Addressing mode
disabled (Legacy mode)
#FUSES PLL12         //Divide By 12(48MHz oscillator input)
#FUSES CPUDIV4       //System Clock by 4
#FUSES USBDIV        //USB clock source comes from PLL divide by 2
#FUSES VREGEN        //USB voltage regulator enabled
#FUSES ICPRT         //ICPRT enabled

#build (reset=0x1000)

```

```

#build (interrupt=0x1008)
#org 0x000,0x0FFF
void bootloader(){
#asm
nop
#endasm
} //reserve space for the bootloader
#use delay(clock=48000000)

#DEFINE BOTAO1 PIN_E1
#DEFINE BOTAO2 PIN_E2
#DEFINE BOOT PIN_B4
#DEFINE LEDV PIN_D1
#DEFINE LEDA PIN_D0
#DEFINE LEDVD PIN_C2

#include <LCD10.C> /* Biblioteca fornecida no aula "Sistemas Embarcado" do
PPGMEC*/
//variaveis

volatile short r[8];
volatile signed int16 saida=2;
unsigned int8 numero,pisca_led,contagem=0;
volatile unsigned int8 rot=20;
volatile unsigned int16 estouro_timer1=0,us=0,vazao,vr;
volatile static unsigned int16 rpm[4];
volatile float rpm_m=0.;

volatile signed long int erro=0,erro_i=0,Tp,Td,Ti,U,Ui=0;
//const unsigned int8 kp=1,kd=3,ki=50;

#int_TIMER1
void TIMER1_isr(void)
{
estouro_timer1++;
set_timer1(0);
}

/*Config*/
void Config()
{
//#use FAST_IO(B)
#use FAST_IO(C)
#use FAST_IO(D)

SET_TRIS_C(0x00);
output_low(LEDA);
output_low(LEDV);

```

```

output_low(LEDVD);
output_low(PIN_C1);//buzzer
SET_TRIS_D(0x00);
SET_TRIS_B(0b0001000);

output_high( PIN_C6);output_high( PIN_C7);output_high( PIN_B1);output_high(
PIN_B2);
output_high( PIN_B3);output_high( PIN_B5);output_high( PIN_B6);output_high(
PIN_B7);

setup_timer_0(RTCC_EXT_H_TO_L|RTCC_DIV_1); //PIN A4
setup_timer_1(T1_INTERNAL|T1_DIV_BY_1);//resolução= 1us estouro=5.4ms
enable_interrupts(INT_TIMER0);
enable_interrupts(INT_TIMER1);
enable_interrupts(INT_EXT);
enable_interrupts(GLOBAL);
set_timer0(0);
set_timer1(0);
lcd_init();
}

/*Start of Main*/
void main(void)
{

Config();
lcd_putc("\f");
while(!input(BOOT)){

//*****Definir tamanho do tubo*****

while(input(BOOT))
{
if(input(BOTAO1)) {saida--;delay_ms(150);}
if(input(BOTAO2)) {saida++;delay_ms(150);}
if(saida>3){saida=1;} if(saida<1){saida=3;}

if(saida==1){vr=402;rpm[1]="1";rpm[2]="/";rpm[3]="2";}
if(saida==2){vr=268;rpm[1]="3";rpm[2]="/";rpm[3]="8";}
if(saida==3){vr=135;rpm[1]="1";rpm[2]="/";rpm[3]="4";}

lcd_gotoxy(1,1);
printf(lcd_putc,"TAMANHO DO TUBO");
lcd_gotoxy(1,2);
printf(lcd_putc,"%c%c%c",rpm[1],rpm[2],rpm[3]);

}do{delay_ms(50);lcd_putc("\f");}while(!input(BOOT));
rpm[1]=0;rpm[2]=0;rpm[3]=0;saida=25;

```

```

/*****Definir velocidade ou vazao*****/

while(input(BOOT))
{
  if(input(BOTAO1)) {rot--;delay_ms(70);}
  if(input(BOTAO2)) {rot++;delay_ms(70);}

  vazao=(unsigned int)16(rot*vr)/10;

  lcd_gotoxy(1,1);
  printf(lcd_putc,"RPM/VAZAO ml/min");
  lcd_gotoxy(1,2);
  printf(lcd_putc,"%u / %lu",rot,vazao);

}do{delay_ms(50);lcd_putc("\f");}while(!input(BOOT));

/*****/
while(true) //infinite loop
{
  if(input(BOTAO1)) {if(rot!=0){rot--;delay_ms(70);}}
  if(input(BOTAO2)) {if(rot!=100){rot++;delay_ms(70);}}

  contagem=get_timer0();
  if(contagem>=18*rpm_m/30)// considerando 36 sinalizadores por volta
  {
    us=get_timer1();contagem=get_timer0();
    rpm_m=(float)contagem*60./((estouro_timer1*0.0054+us*0.000001)*36.);
    if(rpm_m>100){rpm_m=rpm[0];}
    contagem=0;set_timer0(0);set_timer1(0);estouro_timer1=0;us=1;
  }
  if(estouro_timer1>=695)//695referente à 4 rpm(para 1/4 de volta) = 3,75s
  {
    rpm_m=0;
    contagem=0;set_timer0(0);set_timer1(0);estouro_timer1=0;us=1;
  }
  rpm[0]=(float)rpm_m*10;

  rpm_m=(float)(rpm[0]+rpm[1]+rpm[2]+rpm[3])/40;// média de cada 1 volta, pra
estabilizar a medição

  rpm[3]=rpm[2];rpm[2]=rpm[1];rpm[1]=rpm[0];

/*****PID*****/
  if (us==1){
    erro=(float)(rot-rpm_m);

    Tp=(float)erro/(3*(rot/60.)); //pode retirar essas variaveis erro/(10*kp) 5

```

```

    Td=(float)(erro_i-erro)/(10); //(erro-erro_i)/(10*kd)0
    Ti=(float)Ui/140;//Ui/ki 80
    U=Tp+Td+Ti;

    saida=saida+U;

    erro_i=erro;
    Ui=(float)Ui+(erro+erro_i)/2;
    if(Ui>32400){Ui=32400;}    if(Ui<-32400){Ui=-32400;}
    us=0;
}
//*****

//saida=rot;
if(saida>255){saida=255;}    if(saida<0){saida=0;}
vazao=(float)(rpm_m*vr)/10;

//*****SAIDA PARALELA DE COMANDO DOS RELES*****
for(us=0;us<=7;us++){r[us]=0;}
us=0;numero=saida;
while( numero!=0)
{
    r[us] = numero %2;
    numero = numero/2;
    us++;
}us=0;
output_bit( PIN_C6, !r[0]);
output_bit( PIN_C7, !r[1]);
output_bit( PIN_B1, !r[2]);
output_bit( PIN_B2, !r[3]);
output_bit( PIN_B3, !r[4]);
output_bit( PIN_B5, !r[5]);
output_bit( PIN_B6, !r[6]);
output_bit( PIN_B7, !r[7]);

//*****LCD*****
    pisca_led++;
    if(pisca_led>20){output_toggle(LEDVD);pisca_led=0;lcd_putc("\f");}
    lcd_gotoxy(1,1);
    printf(lcd_putc,"%u %ld %u",rot,saida,contagem);
    lcd_gotoxy(1,2);
    printf(lcd_putc,"R=%f V=%lu",rpm_m,vazao);

}
}

```

ANEXO B

Resumo dos valores medidos no teste do balão.

Nome	Experimento	Teste do Balão(mbar)					
		0,5 mL	1,0 mL	1,5 mL	2,0 mL	2,5 mL	3,0 mL
Banho térmico	1	20	70	110	130	140	140
	2	25	50	70	90	105	115
	3	25	40	65	85	100	110
Serpentina	1	25	30	45	65	75	80
	2	15	25	40	65	80	95
	3	15	45	65	85	105	120
Montagem final	1	30	55	85	100	110	115
	2	35	70	95	115	135	145
	3	30	60	90	115	140	155
Controle	1	65	135	185	225	250	280
	2	45	110	165	235	295	310
	3	60	115	180	225	270	295
Látex	1	15	20	35	50	70	75
	2	10	20	40	55	70	80
	3	10	20	35	55	70	80