



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102017009187-2 A2



(22) Data do Depósito: 02/05/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 10/03/2020

(54) Título: SENSOR ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS

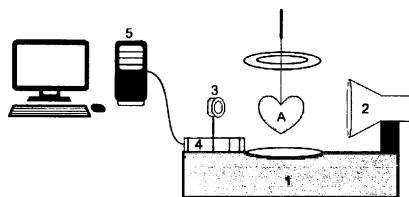
(51) Int. Cl.: A01N 1/02; C12M 1/42.

(52) CPC: A01N 1/0242; C12M 35/04.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO.

(72) Inventor(es): BRENO VALENTIM NOGUEIRA; ADILSON RIBEIRO PRADO; AFRÂNIO CÔGO DESTEFANI; GABRIEL HENRIQUE TAUFER; GABRIELA MODENESI SIRTOLI; JAIRO PINTO DE OLIVEIRA; LUIZ FELIPE CASTELO DEL CARO; RAYSSA HELENA ARRUDA PEREIRA; TADEU ÉRITON CALIMAN ZANARDO.

(57) Resumo: Trata-se de um equipamento que possibilitará avaliar o estado de descelularização de órgãos para habilitá-los para testes de recelularização, fornecendo o comportamento óptico dos processos de descelularização, os dados numéricos de tensão, as derivadas dos pontos e os gráficos, que possibilitam identificar o momento ideal de retirada do órgão dos reagentes de perfusão, correlacionando o material celular residual com a tensão detectada da luz transmitida; O sensor será composto por uma base ajustável (1), fonte luminosa (2), um fotodiodo (3), plataforma (placa) de prototipagem (4) e também por um software de programação (5) formando um sistema de sensoriamento óptico para aplicação biotecnológica que correlacionará o comportamento óptico de órgãos, durante o processo de descelularização, com os testes de verificação tradicionais histológicos e espectrométricos, e assim, possibilitando padronizar o processo de descelularização utilizando o dispositivo eletrônico.



## “SENSOR ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS”

[001] Refere-se a presente patente de invenção um sensor óptico aplicado à descelularização de órgãos, mais especificamente a um equipamento para auxiliar a retirada do órgão com dados objetivos, como a intensidade de luz que atravessa o órgão e seu perfil durante o processo (modelo polinomial), tornando-se uma etapa adicional aos processos de descelularização, cuja finalidade é dar um caráter objetivo à tomada de decisões, identificando a ausência de células do órgão através de uma avaliação óptica.

[002] Atualmente, não existem dispositivos para esta etapa do processo de descelularização. Existem equipamentos que apenas executam a descelularização, mas não identificam a ausência de células do órgão. Portanto, não há no momento um equipamento semelhante para desempenhar a função especificada.

[003] Atualmente, ao descelularizar um órgão, identifica-se o momento ideal para a sua retirada do processo através da aparência deste órgão e do tempo padronizado por descelularizações prévias. Tais padronizações são realizadas processando e cortando o órgão para quantificação de DNA e análise histológica (visualização de núcleos e materiais celulares utilizando corantes específicos). O processamento e corte dos órgãos inviabilizam-nos de serem utilizados nas etapas subseqüentes de repovoamento celular com células-tronco. Dessa forma, os órgãos destinados à recelularização são retirados do processo baseando-se apenas no tempo e no aspecto visual. O tempo é variável, pois, o tamanho, o estado fisiológico e a idade do órgão influenciam na eficiência da retirada das células. Já o aspecto visual é subjetivo.

[004] A demanda de órgãos para transplante supera sobremaneira a disponibilidade de doadores para essa finalidade. Dados da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO) tornam essa problemática evidente. Em junho de 2015, constavam 32.000 pacientes à espera de um transplante e o montante de órgãos transplantados entre janeiro e junho do mesmo ano alcançou apenas 10.355 órgãos (Registro Brasileiro de Transplantes – RBT, 2015). Ou seja, o primeiro semestre de 2015 apresentou um déficit de, no mínimo, 32.000 órgãos. Além disso, outro aspecto capaz de agravar ainda mais esse cenário consiste na rejeição que os pacientes transplantados podem desenvolver após o procedimento, conhecido como a reação na qual o organismo receptor desenvolve uma resposta imunológica contra as células presentes no órgão transplantado (Guyette ET AL., 2016).



[005] Dessa forma, tanto a escassez de órgãos para transplantes quanto a possibilidade de rejeição ao transplante impulsionam o desenvolvimento de ferramentas alternativas capazes de dar novas perspectivas a este cenário. Há, portanto o surgimento dos órgãos bioartificiais e dos arcabouços descclularizados com o propósito de substituir órgãos ou tecido danificados por doenças ou traumas (Fu ET AL, 2014). Órgãos ou tecidos bioartificiais consistem em estruturas construídas de proteínas e polímeros sintéticos. Já os arcabouços descclularizados são formados após a remoção das células do órgão de um doador através de processos capazes de preservar a matriz protéica e glicoprotéica que compõem a estrutura dos órgãos (Lu ET AL, 2013). Em ambos os processos a estrutura suportará novas células que devem ser adicionadas através de procedimentos de Repovoamento Celular. Órgãos menos complexos como bexigas urinárias, traquéias e córneas ou tecidos como vasos sanguíneos e válvulas cardíacas tem apresentado bons resultados após o procedimento em humanos. Os órgãos mais complexos, tais quais o coração (Sanchez ET AL, 2015), fígado (Mazza ET AL, 2015) e rins (Abolbashari et al, 2016) encontram-se em fase experimental e tem apresentado grande potencial de progressão para estudos clínicos em humanos.

[006] Durante o processo de descclularização de um órgão, que consiste na retirada de todas as células visando implantar células-tronco para o pleno funcionamento e transplante, o maior desafio recai sobre a total remoção das células e de quaisquer materiais celulares evitando danos à estrutura. Os critérios estabelecidos para avaliação da qualidade da descclularização consistem na quantificação do DNA remanescente, que não deve exceder 50 ng/mg, e, o arcabouço resultante não deve apresentar núcleos, tampouco material nuclear (Crapo, Gilbert, 2011; Londono, Badylak, 2015). Tais metodologias de avaliação requerem procedimentos invasivos que danificam a estrutura do órgão descclularizado, não sendo possível realizá-las nos órgãos destinados ao transplante. Além disso, os testes para confirmação são realizados após o processo de descclularização, em um momento definido visualmente pela transparência do órgão e de um tempo médio fixado a partir de padronizações prévias. Entretanto, as dimensões, a temperatura, a pressão ou o estado fisiológico inicial do órgão podem influenciar na eficiência de remoção das células, conseqüentemente, o tempo de descclularização é alterado e o padrão para identificação do final do processo restringe-se ao aspecto visual, o qual é subjetivo. Tal impasse pode ocasionar o uso de órgãos com DNA vestigial e de matriz extracelular desnecessariamente degradada nos testes subseqüentes, causando a ineficiência no desempenho destes, principalmente, na



etapa de repovoamento celular. Além disso, o DNA vestigial em órgãos transplantados poderá desencadear respostas inflamatórias no hospedeiro, comprometendo todo o processo.

[007] Por conseguinte, tornou-se necessário um dispositivo capaz de identificar a etapa final do processo com maior objetividade e acurácia, que sinalize o momento ideal para a retirada do órgão do processo de descclularização, podendo ainda, desempenhar uma etapa alternativa aos procedimentos invasivos. Portanto, com intuito de solucionar tais inconvenientes encontrados atualmente no estado da arte, foi desenvolvido o sensor óptico aplicado à descclularização de órgãos, que compreende em um sistema de sensoriamento óptico para aplicação biotecnológica correlacionando-se o comportamento óptico de órgãos murinos, ou qualquer outro órgão durante o processo de descclularização, com os testes de verificação tradicionais histológicos e espectrométricos. E assim, possibilitando padronizar o processo de descclularização utilizando o dispositivo eletrônico.

[008] O sensor óptico aplicado à descclularização de órgãos permitirá avaliar a composição do órgão pelo comportamento da luz durante o processo haja vista a extinção (absorção e espalhamento) e o índice de refração da luz, que são específicos e característicos dos componentes opticamente ativos presentes nos tecidos e que podem ser provenientes da célula ou da matriz extracelular (JACQUES, Steven L., 2013). Essas propriedades da luz transmitida através do órgão influenciarão a intensidade da luz detectada após atravessar este órgão, fornecendo informações do seu estado de descclularização. A partir disso é possível padronizar um componente objetivo para a retirada do órgão do processo, que compreende o perfil óptico e o polinômio que se encaixa ao modelo.

[009] A seguir serão citadas algumas das vantagens proporcionadas pela utilização do sensor óptico aplicado à descclularização de órgãos, tais como:

- Oferece um dado objetivo para auxiliar no momento de retirada do órgão dos processos de descclularização;
- Não é invasiva;
- É ajustável a órgãos de diferentes tamanhos;
- É possível incorporar diferentes sensores à estrutura;
- Possui dimensões de fácil manuseio;
- Evita o descarte de órgãos por descclularizações incompletas;

- Aumenta as chances de sucesso nas etapas de recelularização;
- O órgão continua apto para as etapas subseqüentes, pois não danifica a sua estrutura.

[010] O sensor óptico aplicado à descclularização de órgãos poderá ser melhor compreendido através da descrição detalhada em consonância com as seguintes figuras em anexo, onde:

FIGURA 01 Apresenta um esquema representativo do sensor óptico aplicado à descclularização de órgãos.

FIGURA 02 Apresenta uma vista externa da câmara escura do sensor óptico aplicado à descclularização de órgãos.

FIGURA 03 Apresenta uma vista interna aproximada da câmara escura do sensor óptico aplicado à descclularização de órgãos.

FIGURA 04 Apresenta uma vista interna da câmara escura do sensor óptico aplicado à descclularização de órgãos.

[011] Em conformidade com as figuras acima explicitadas, observa-se que o sensor óptico aplicado à descclularização de órgãos consiste em um sistema composto por dois módulos acoplados a uma base ajustável (1) nos três eixos (x,y e z) com possibilidade para alinhamento adequado do órgão a ser descclularizado. Um dos módulos consiste em uma fonte luminosa (2) de amplo espectro e alto brilho(LED de luz branca). No lado oposto, encontra-se o segundo módulo, o qual é composto por um fotodiodo (3)(fotodetector) e uma plataforma (placa) de prototipagem (4) eletrônica de hardware livre e de placa única conectado ao computador, no qual o software de programação registra, avalia os dados e elabora o gráfico simultaneamente.

[012] O software de programação (5) convenientemente utilizado, *Matlab*(podendo ser utilizado outro, já que a programação foi desenvolvida no trabalho),registra, avalia os dados e elabora o gráfico simultaneamente. No centro o órgão A é fixado e perfundido com os reagentes específicos.

[013] O órgão (A) deve ser fixado à agulha presente no centro da estrutura do equipamento. A agulha está conectada a uma mangueira utilizada para perfusão do órgão (A) com os reagentes de descclularização. Nas laterais da estrutura central estão os botões de ajuste de altura da base, de proximidade da fonte de luz em relação ao órgão (A) e de alinhamento dos componentes “detector – órgão – luz”. Após o alinhamento deve ser iniciado o programa para o registro dos valores de tensão

detectados pelo fotodiodo (3). O líquido que perfunde o órgão (A) é canalizado para um receptáculo conectado a um frasco de descarte por uma mangueira.

[014] O gráfico é gerado com base nos valores de tensão em função do tempo, ele apresenta um perfil semelhante entre as descelularizações e atinge um platô que é utilizado para definir o momento de retirada do órgão (A). O gráfico das derivadas demonstra um perfil também semelhante entre as diferentes descelularizações e auxilia na determinação do ponto no qual há estabilização dos valores de tensão. Para a retirada do órgão (A) é necessário apenas desconectá-lo da agulha de perfusão. A correlação entre os pontos do platô e a quantidade de células residuais nos órgãos foi padronizada através de uma curva de concentração de DNA dos órgãos retirados em diferentes pontos. Ou seja, o padrão-ouro utilizado para correlação foi à quantificação de DNA.

[015] A Figura 02 apresenta a visualização externa do equipamento permitindo-se identificar a câmara escura, para prevenir alterações de sinal provenientes de perturbações externas, conectada a um computador.

[016] Na Figura 03 apresenta a visualização interna do protótipo, na qual pode-se identificar um órgão (A) em processo de descelularização fixado ao equipamento, à direita encontra-se a fonte luminosa (2) e à esquerda, o fotodiodo (3) (fotodetector). Ambos estão presos a uma base ajustável (1) nos três eixos.

[017] Já na Figura 04 apresenta uma imagem do protótipo que possibilita identificar a placa de prototipagem (4) externamente e à esquerda da câmara escura e o interior da câmara escura.

[018] Sendo assim, o sensor óptico aplicado à descelularização de órgãos, será aplicado aos processos de descelularização de órgãos, podendo ser adaptado para bioreatores e demais equipamentos semelhantes, identificando o momento em que não há mais células (através da intensidade da luz), de forma não invasiva, possibilitando a etapa de recelularização com células-tronco. Os processos de descelularização têm o objetivo de possibilitar que órgãos normalmente rejeitados para transplante possam ser transplantados. Além disso, o uso de células-tronco tem o propósito de evitar rejeições.



## REIVINDICAÇÕES

1. SENSOR ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS caracterizado por um equipamento que possibilitará avaliar o estado de descelularização de órgãos para habilitá-los para testes de recelularização, fornecendo o comportamento óptico dos processos de descelularização, os dados numéricos de tensão, as derivadas dos pontos e os gráficos, que possibilitam identificar o momento ideal de retirada do órgão dos reagentes de perfusão; o qual ainda permitirá correlacionar material celular residual com a tensão detectada da luz transmitida;
2. SENSOR ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o equipamento consiste de um sistema composto por dois módulos acoplados a uma base ajustável (1) nos três eixos (x,y e z) com possibilidade para alinhamento adequado do órgão a ser descelularizado; Um dos módulos consiste em uma fonte luminosa (2) de amplo espectro e alto brilho (LED de luz branca); No lado oposto, encontra-se o segundo módulo, o qual é composto por um fotodiodo (3) (fotodetector) e uma plataforma (placa) de prototipagem (4) eletrônica de hardware livre e de placa única conectado ao computador, no qual o software de programação (5) registra, avalia os dados e elabora o gráfico simultaneamente;
3. SENSOR ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS, de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizado pelo fato de que o software de programação (5) convenientemente utilizado, *Matlab*(podendo ser utilizado outro, já que a programação foi desenvolvida no trabalho), registra, avalia os dados e elabora o gráfico simultaneamente. No centro o órgão é fixado e perfundido com os reagentes específicos;
4. SENSOR ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO DE ORGÃOS, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, caracterizado pelo fato de que a base ajustável (1) será capaz de comportar os módulos e o órgão; a fonte luminosa (2) refere-se a um LED de luz branca que emiti de sobre o órgão (sendo possível acoplar outras fonte); O fotodetector (3) corresponderá a um fotodiodo que recebe a luz que atravessa o órgão (é possível acoplar outros detectores); A placa de prototipagem (4), refere-se a uma placa de prototipagem que será utilizada para processar e enviar os dados recebidos pelo fotodetector (3) ao computador; por fim, o software de programação (5) que será desenvolvida uma programação para criar os gráficos.

FIGURA 01

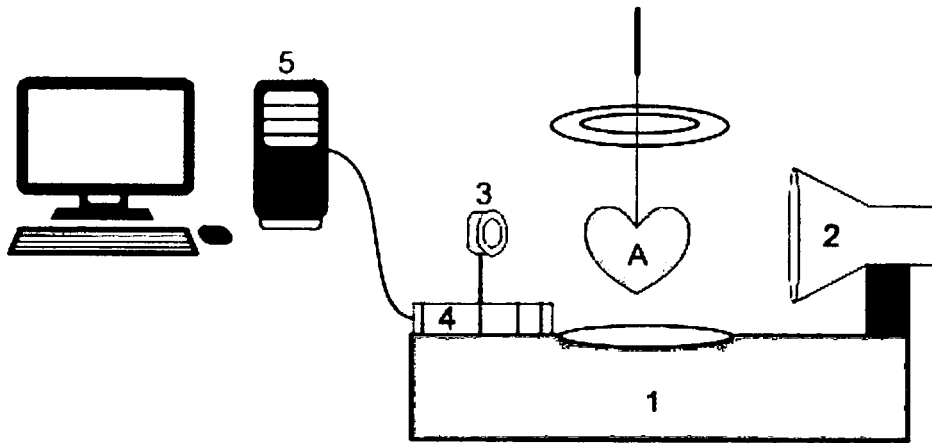


FIGURA 02

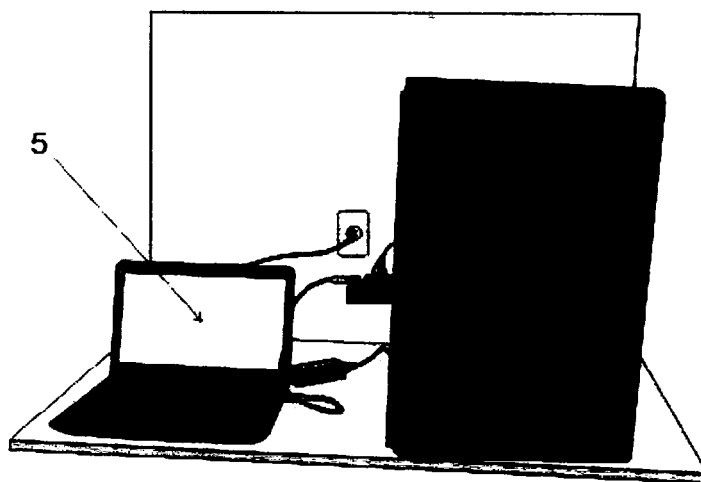


FIGURA 03

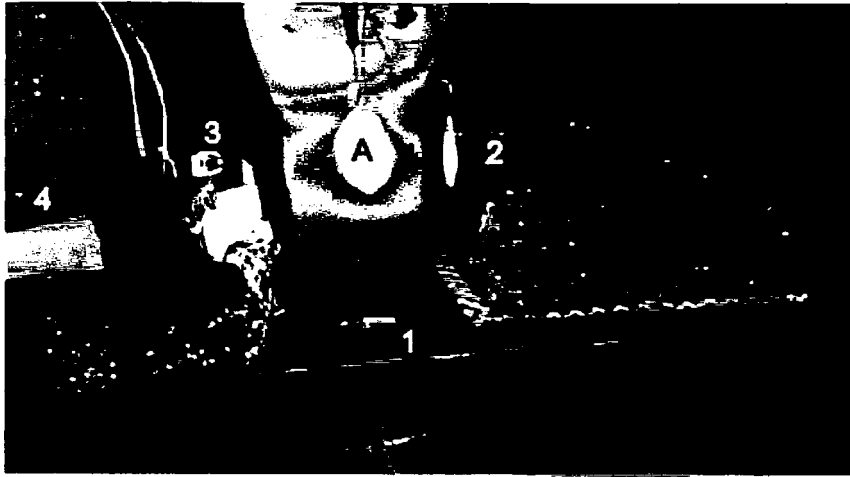


FIGURA 04





## RESUMO

SENSOR ÓPTICO APLICADO À DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS. Trata-se de um equipamento que possibilitará avaliar o estado de descclularização de órgãos para habilitá-los para testes de recelularização, fornecendo o comportamento óptico dos processos de descclularização, os dados numéricos de tensão, as derivadas dos pontos e os gráficos, que possibilitam identificar o momento ideal de retirada do órgão dos reagentes de perfusão, correlacionando o material celular residual com a tensão detectada da luz transmitida; O sensor será composto por uma base ajustável (1), fonte luminosa (2), um fotodiodo (3), plataforma (placa) de prototipagem (4) e também por um software de programação (5) formando um sistema de sensoriamento óptico para aplicação biotecnológica que correlacionará o comportamento óptico de órgãos, durante o processo de descclularização, com os testes de verificação tradicionais histológicos e espectrométricos, e assim, possibilitando padronizar o processo de descclularização utilizando o dispositivo eletrônico.