

# DECELLULARIZATION METHODS IN RAT KIDNEYS AND EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS AND PRESERVATION OF THE EXTRACELLULAR MATRIX: AN INTEGRATIVE REVIEW

Elson Rezende Cardoso de Lima<sup>1</sup>

Ricardo Silva Moura<sup>2</sup>

Luis Vicente Franco de Oliveira<sup>3</sup>

Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA<sup>123</sup>

## ABSTRACT

**Introduction:** Kidney transplantation is the most effective treatment for end-stage renal disease; however, the number of donor kidneys does not meet the high demand of patients with this condition. In this context, renal bioengineering is a potential therapeutic tool for obtaining functional kidneys for transplantation in patients with chronic end-stage renal disease. **Methodology:** This literature review focused on analyzing rat kidney decellularization methods in the preservation of the extracellular matrix (ECM). A bibliographic search was conducted in PubMed, Web of Science, and Scopus in September 2024 using the descriptors “extracellular matrix,” “decellularization,” “kidneys,” and “methods.” **Results:** Six selected articles were analyzed. The methods that used sodium dodecyl sulfate (SDS) and Triton X-100 were the most effective in preserving the extracellular matrix. Enhancement methods were also addressed, showing efficiency in practicality and speed. **Conclusion:** The most effective and most commonly used methods are those involving sodium dodecyl sulfate and Triton X-100, with emphasis on sodium dodecyl sulfate due to its practicality and results. Nevertheless, some limitations and challenges were recognized, including the absence of standardized renal decellularization protocols and the scale differences between rats and humans.

**Keywords:** kidney; extracellular matrix; decellularization; rat.

## INTRODUCTION

Kidney transplantation is the most effective treatment for end-stage renal disease; however, the number of donor kidneys does not meet the increasing demand of patients with this condition. Consequently, a long waiting list for donors arises.

Renal bioengineering represents a potential therapeutic tool for obtaining functional kidneys for transplantation in patients with end-stage chronic kidney disease. One of the crucial steps is decellularization, as it is from the decellularized scaffolds that cellular adhesion, signaling, proliferation, migration, and differentiation of stem cells into specific renal cell types become possible. This occurs due to the preservation of the extracellular matrix (ECM). Therefore, this study aims to review the existing literature on decellularization methods in rat kidneys and the evaluation of ECM preservation and effectiveness.

## METHODOLOGY

This study was conducted as a literature review focused on analyzing rat kidney slice decellularization methods and their ability to preserve the ECM. A bibliographic search was carried out in PubMed, Web of Science, and Scopus in September 2024 using the keywords “extracellular matrix,” “decellularization,” “kidneys,” and “methods,” according to DeCS/BVS terms. The search was limited to free-access English-language articles published in the last 10 years. The initial search retrieved 128 articles: 45 from PubMed, 39 from Web of Science, and 44 from Scopus. After excluding 12 duplicates, 116 articles remained. Following abstract and full-text screening, 6 articles were included in this integrative review.

## RESULTS

Table 1 summarizes the main findings and the methodological characteristics of each of these studies.

Tabela 1: Estudos que avaliaram métodos de descelularização e seus resultados

Autor/Ano	Objetivos	Métodos	Resultados
(NARCISO et al., 2022)	Desenvolver um novo método de descelularização em que uma fina seção de tecido é mantida presa a uma lâmina de vidro, permitindo a descelularização “ <i>in situ</i> ” sem remover a amostra de um estágio microscópico.	Os órgãos são coletados e armazenados a -80 °C, são crio-seccionados em seções de 20 µm e depositados em lâminas de vidro carregadas positivamente. Ocorre uma série de lavagens e enxágues, incluindo o agente descelularizante e uma incubação de desoxirribonuclease I (DNase). Após a remoção cuidadosa dos reagentes, uma seção totalmente descelularizada é produzida em 2 h	O novo método de descelularização fornece uma alternativa confiável aos protocolos atuais de descelularização devido à sua simplicidade, menores requisitos de massa de amostra e, mais importante, abre novas oportunidades de pesquisa para entender o papel da MEC em algumas condições fisiológicas e patológicas, bem como para reparo e engenharia de tecidos.
(DIEDRICH et al., 2024)	Fornecer novos dados abrangentes sobre o matrisseio de matrizes extracelulares descelularizadas de fígado e rim de camundongo obtidas por meio de proteômica shotgun.	Foram coletados fígados e rins de dez camundongos machos para descelularização. Os rins foram perfundidos com solução salina, Triton X-100 e SDS. Após a descelularização, os órgãos foram preparados para proteômica usando o método de preparação de amostra auxiliada por filtro.	Os resultados do exame histológico e bioquímico confirmam que a descelularização foi bem-sucedida e que a maioria dos componentes celulares foi removida, enquanto a estrutura da MEC foi amplamente preservada.
(MALLIS et al., 2021)	Avaliar duas abordagens diferentes de descelularização para produzir bioandames renais.	Rins de ratos Wistar foram descelularizados com dois métodos, usando rotação cíclica e agitador magnético, ambos com tampões e SDS, seguidos de incubação em meio sérico por 3 ciclos. Análises	A quantificação histológica, bioquímica e de DNA confirmou que a 2ª abordagem teve o melhor resultado em relação à composição renal e eliminação celular. Rins acelulares de ambas

		histológicas, bioquímicas, quantificação de DNA, ensaios de citotoxicidade e repovoamento de rins acelulares foram realizados.	as abordagens foram recelularizados com sucesso.
(SAUTER et al., 2023)	O objetivo deste trabalho é investigar o efeito de duas concentrações diferentes de dodecil sulfato de sódio (ou seja, 0,66% e 3%) na capacidade das células endoteliais humanas de aderir e proliferar em um scaffold de rim de rato acelular.	Scaffolds renais acelulares de rato descelularizados por perfusão com SDS a 0,66% ou 3%. Células endoteliais humanas EA.hy 926 foram semeadas na artéria renal. Após 5 dias de cultura dinâmica controlada por pressão, os rins recelularizados foram analisados por seccionamento, coloração histoquímica, imuno-histoquímica e análise semiquantitativa.	Na análise semiquantitativa da recelularização, a contagem de células após cinco dias de cultura dinâmica mais que dobrou ao usar o protocolo de descelularização suave com uma concentração de SDS de 0,66% em comparação a 3%.
(GUAN et al., 2015)	Simplificar o processo de criação de um scaffold renal em um modelo de rato, avaliar a estrutura e a função da MEC e produzir um rim funcional por meio da recelularização desses arcabouços.	O rim foi conectado a uma bomba peristáltica para perfusão contínua. As soluções foram perfundidas em sequência: PBS por 15 minutos, SDS 0,5% por 4 horas, seguido de PBS por 24 horas para remover o SDS.	Foi desenvolvido um protocolo rápido e eficiente para produzir um arcabouço renal a partir de rins de ratos, preservando o sistema vascular e a matriz extracelular. Isso proporcionou uma oportunidade de demonstrar a viabilidade de recelularizar os scaffolds com células desejadas, incluindo células-tronco, renais e vasculares.
(SALTI et al., 2023)	Investigar os efeitos dos métodos de tratamento físico na eficácia da descelularização de fatias de rim cortadas com precisão por imersão em reagentes químicos.	Rins fatiados foram imersos em reagentes químicos de três formas diferentes para comparação. Foram incubados por 1 hora em tripsina-EDTA 0,025%, seguido por 2 horas em Triton X-100 2%, 2 horas em desoxicolato de sódio 2% e 15 horas em SDS 0,1%, e depois lavados.	Em resumo, o CCD foi o tratamento mais equilibrado, com boa remoção de DNA e preservação da MEC, enquanto o APH preservou bem os GAGs, mas não removeu tanto DNA. O SBU foi eficaz na remoção de DNA, mas prejudicou a integridade dos GAGs e da ultraestrutura do tecido.

Fonte: autoria própria, 2024.

Notas: Matriz extracelular = MEC. Alta Pressão Hidrostática = APH. Ciclos de Congelamento-Descongelamento = CCD. Sistema de Banho Ultrassônico = SBU. Glicosaminoglicano = GAG. Dodecil Sulfato de Sódio = SDS

It was observed that current decellularization methods present significant limitations, as most require prolonged periods, sometimes lasting several days, in addition to failures in ECM preservation. Thus, Narciso et al. (2022) proposed slicing the organ into 20  $\mu\text{m}$  sections and subjecting them to six decellularizing agents, with the method using sodium deoxycholate being the most balanced in terms of cell removal and preservation of ECM tissue structure, while also being a rapid and simple technique.

Diedrich et al. (2024) perfused mouse kidneys with phosphate-buffered saline for 10 minutes, followed by 30 minutes of perfusion with 1% Triton X-100 and 120 minutes with 1% sodium dodecyl sulfate. This study obtained good results in ECM preservation. Methods to optimize decellularization using cyclic rotation and magnetic stirring were also employed. According to Mallis et al. (2021), magnetic stirring proved more effective, although the other method was also satisfactory. Sauter et al. (2023) also used sodium dodecyl sulfate, but aimed to compare salt concentrations and concluded that the lower concentration, namely 0.66%, resulted in better recellularization outcomes with EA.hy 926 endothelial cells. Guan et al. (2015) demonstrated that sodium dodecyl sulfate enables rapid cell lysis and removal of nuclear and cytoplasmic residues, whereas Triton X-100 acts more slowly and may damage ECM collagen.

The study by Salti et al. (2023) adopted a different approach by analyzing the immersion of kidney slices in chemical reagents for decellularization, aiming to avoid ECM damage caused by standard treatments involving long agitation periods. It was observed that combining freeze-thaw cycles with immersion in chemical reagents was the most effective method for preserving the ECM.

## **CONCLUSION**

This review revealed relevant findings regarding different decellularization methods. The most effective and widely used methods are those employing sodium dodecyl sulfate (SDS) and Triton X-100, with particular emphasis on SDS due to its practicality and results. Additionally, immersion protocols using freeze-thaw cycles were considered satisfactory for ECM preservation. Nonetheless, certain limitations and challenges remain, including the absence of standardized protocols for renal decellularization and the discrepancies between studies using whole kidneys and those using renal slices, which may influence outcomes. Research continues to investigate new strategies and optimizations so that decellularization and recellularization bioengineering may be applied to the treatment of kidney diseases.

## REFERENCE

DIEDRICH, A.-M. et al. Proteomic analysis of decellularized mice liver and kidney extracellular matrices. **Journal of Biological Engineering**, v. 18, n. 1, p. 17, 22 fev. 2024.

FIGLIUZZI, M.; BONANDRINI, B.; REMUZZI, A. Decellularized Kidney Matrix as Functional Material for whole Organ Tissue Engineering. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 15, n. 4, p. e326–e333, 11 jan. 2017.

GUAN, Y. et al. The effective bioengineering method of implantation decellularized renal extracellular matrix scaffolds. **Oncotarget**, v. 6, n. 34, p. 36126–36138, 3 nov. 2015.

MALLIS, P. et al. Optimizing Decellularization Strategies for the Efficient Production of Whole Rat Kidney Scaffolds. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 18, n. 4, p. 623–640, 20 ago. 2021.

NARCISO, M. et al. Novel Decellularization Method for Tissue Slices. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 9 mar. 2022.

SALTI, H. et al. Decellularization of precision-cut kidney slices—application of physical and chemical methods. **Biomedical Materials**, v. 18, n. 2, p. 025004, 1 mar. 2023.

SAUTER, J. et al. Effect of different decellularization protocols on reendothelialization with human cells for a perfused renal bioscaffold of the rat. **BMC Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 8, 16 mar. 2023.