

UNIVERSIDADE EVANGÉLICA DE GOIÁS – UniEVANGÉLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MOVIMENTO HUMANO E REABILITAÇÃO
PPGMHR

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DE PULMÕES
DE RATTUS NORVEGICUS

JOÃO PEDRO RIBEIRO AFONSO

Anápolis, GO

2022

UNIVERSIDADE EVANGÉLICA DE GOIÁS – UniEVANGÉLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MOVIMENTO HUMANO E REABILITAÇÃO
PPGMHR

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DE PULMÕES
DE RATTUS NORVEGICUS

Dissertação apresentada à Universidade
Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA para
obtenção do título de Mestre em Movimento
Humano e Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Luís Vicente Franco de Oliveira

Anápolis, GO

2022

A257

Afonso, João Pedro Ribeiro.

Otimização do processo de descelularização de pulmões *De Rattus norvegicus* / João Pedro Ribeiro Afonso - Anápolis: Universidade Evangélica de Goiás, 2022.

23 p.; il.

Orientador: Prof^o. Dr. Luís Vicente Franco de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Programa de pós-graduação em Movimento Humano e Reabilitação - Universidade Evangélica de Goiás, 2022.

1. Descelularização 2. Scaffold 3. Bioengenharia Pulmonar 4. Matriz extracelular 5. *Derattus Norvegicus*. I. Oliveira, Luís Vicente Franco de. II. Título

CDU 615.8

Catálogo na Fonte

Elaborado por Hellen Lisboa de Souza CRB1/1570

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a trilhar meu próprio caminho.

Agradeço a todos meus professores pela dedicação e ensinamentos que contribuíram para minha formação ao longo da minha vida.

Agradeço ao meu orientador Luís Vicente, pelo desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e por todas as oportunidades e ensinamentos que me proporcionou durante esses últimos anos.

Agradeço a todos os meus colegas de pós graduação, graduação, alunos de iniciação científica e colaboradores da Universidade Evangélica de Goiás, que conviveram comigo durante a realização desta pesquisa e que de alguma maneira ajudaram durante a minha jornada.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás pelo apoio financeira para desenvolvimento deste projeto.

Epígrafe

As coisas do mundo vão se traduzindo
E o tempo é o vento que vai conduzindo
E a gente navega os mares da vida
Aprendendo a viver...

Zé Geraldo

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	2
2.1 Transplantes pulmonar	2
2.2 Transplantes no Brasil.....	3
2.3 Biogenharia pulmonar	3
2.4 Matriz extracelular na Bioengenharia Pulmonar	4
2.5 Processo de descelularização.....	6
3. Objetivos	7
3.1 Objetivo geral	7
3.2 Objetivos específicos.....	7
4. Material e métodos.....	8
4.1 Caracterização do estudo.....	8
4.2 Aspectos éticos e legais	9
4.3 Modelo animal.....	9
4.4 Desenho do estudo	9
4.5 Preparação dos animais e procedimentos cirúrgicos.....	8
4.6 Descelularização dos pulmões	9
5. Resultados	12
6. Discussão.....	14
7. Conclusão	18
8. Referências.....	19

Resumo

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, em 2019, 3,23 milhões de pessoas vieram a óbito por doenças pulmonares, sendo a terceira principal causa de morte no mundo. Nos casos mais avançados de doenças pulmonares crônicas onde o paciente não responde as terapias medicamentosas e à reabilitação pulmonar, o transplante pulmonar é considerado a melhor alternativa capaz de melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida. Mesmo com o avanço das técnicas cirúrgicas, o sucesso dos transplantes pulmonares ainda é limitado. A Bioengenharia de órgãos é uma área promissora da Medicina regenerativa, que tem buscado desenvolver tecidos e órgãos funcionais através da manipulação de células troncos visando o implante e ou transplante. Uma das abordagens mais utilizadas implica na recelularização da matriz extracelular de scaffolds, obtidos através do processo de descelularização. Essa técnica consiste na utilização de meios físicos, químicos e biológicos para a remoção de todo conteúdo celular do tecido ou órgão, mantendo intacta sua estrutura tridimensional, conservando a sua composição proteica e molecular, além das propriedades mecânicas. Os objetivos deste estudo foram o de desenvolver um protocolo otimizado identificando o método químico mais eficiente no processo de descelularização de pulmões de *Rattus norvegicus*. Trata-se de um estudo experimental em modelo animal, desenvolvido no laboratório de Cultura de Células da UniEVANGÉLICA. Para a realização deste estudo, foram utilizados *Rattus norvegicus*, machos, da linhagem Wistar, com peso médio de 300 a 350g fornecidos pelo Biotério Central da UniEVANGÉLICA. Com a realização deste estudo, pode-se concluir que os três protocolos utilizados foram capazes de obter um scaffold com aspecto translúcido e de coloração esbranquiçada. Entretanto, o protocolo 3 onde foi utilizado SDS + Triton X-100, foi capaz de descelularizar os pulmões de *Rattus norvegicus* em um menor tempo quando comparado aos dois outros protocolos testados. De acordo com os resultados deste estudo pode-se afirmar que a combinação de diferentes detergentes no processo de descelularização de pulmões de *Rattus norvegicus*, tanto os mais utilizados como os alternativos, podem gerar resultados que otimizem o processo de descelularização.

PALAVRAS-CHAVE: descelularização, scaffold, bioengenharia pulmonar, matriz extracelular

Lista de quadros e tabelas

Quadro 1. Componentes estruturais da MEC comuns e suas funções.....5

Quadro 2. Descrição dos protocolos utilizados.....13

Lista de figuras

Figura 1. Fluxograma do estudo.....	8
Figura 2. Fluxograma com as metodologias do estudo	10
Figura 3. Descelularização de pulmão de <i>Rattus norvegicus</i>	12
Figura 4. Descelularização de pulmão de <i>Rattus norvegicus</i>	13
Figura 5. Descelularização de pulmão de <i>Rattus norvegicus</i>	13

Lista de abreviaturas

OMS	Organização Mundial da Saúde
MEC	Matriz Extracelular
ISHLT	Sociedade Internacional de Transplante de Coração e Pulmão
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
FC	Fibrose Cística
Alfa – 1	alfa-1-antitripsina
HAPI	Hipertensão Arterial Pulmonar Idiopática
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
H&E	Hematoxilina e Eosina
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
PPA	Pressão na artéria pulmonar
PBS	Tampão Fosfato Salino
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
CHAPS	(3-((3-colamidopropil)dimetilamônia)-1-propanossulfonato)
GAGs	Glicosaminoglicanos
SLES	Lauril éter sulfato de sódio
LP	Laurato de Potássio
TRITON X - 100	(C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n)

1. Introdução

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2019, 3,23 milhões de pessoas vieram a óbito por doenças pulmonares, sendo a terceira principal causa de morte no mundo. Os dados mostram que a maioria das mortes causadas por doenças pulmonares acontecem em países de baixa e média renda, muitas vezes relacionadas a fatores ambientais e principalmente a falta de um diagnóstico precoce e tratamento adequado¹.

Nos casos mais avançados de doenças pulmonares crônicas onde o paciente não responde as terapias medicamentosas e à reabilitação pulmonar, o transplante pulmonar é considerado a melhor alternativa capaz de melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida². Mesmo com o avanço das técnicas cirúrgicas, o sucesso dos transplantes pulmonares ainda é limitado. Além disso, a mortalidade nas filas de espera por um órgão compatível ainda é alta, sendo necessário o desenvolvimento de tratamentos alternativos para pacientes com doenças pulmonares em estado mais avançado^{2,3}.

A Bioengenharia de órgãos é uma área promissora da Medicina regenerativa, que tem buscado desenvolver tecidos e órgãos funcionais através da manipulação de células troncos visando o implante e ou transplante. A Medicina regenerativa tem buscado reconstruir diferentes tecidos utilizando culturas de células tronco submetidas a diferentes estímulos, com o objetivo de tratar partes lesadas do nosso organismo ou até reconstruir órgãos inteiros a partir de sua própria estrutura visando o transplante de órgãos⁴.

Graças aos recentes esforços científicos, a Bioengenharia pulmonar tem sido uma excelente alternativa para a obtenção de novos órgãos e ou tecidos fisiológicos. Uma das abordagens mais utilizadas implica na recelularização da matriz extracelular de scaffolds, obtidos através do processo de descclularização⁵. Essa técnica consiste na utilização de meios físicos, químicos e biológicos para a remoção de todo conteúdo celular do tecido ou órgão, mantendo intacta sua estrutura tridimensional, conservando a sua composição proteica e molecular, além das propriedades mecânicas⁵.

Uma descelularização eficaz é importante para que posteriormente, seja possível re-endotelizar o tecido pulmonar através da utilização de células tronco. Infelizmente, durante essa técnica alguns métodos físicos e químicos são agressivos e podem danificar a matriz extracelular, além de reduzir a quantidade de proteínas essenciais para que o tecido mantenha suas propriedades fisiológicas^{5,6}. De acordo com o estado da arte, o presente estudo justifica-se no sentido de otimizar os protocolos de descelularização de pulmões de *Rattus norvegicus* existentes oferecendo maior efetividade no processo.

2. Revisão de literatura

2.1 Transplantes pulmonar

De acordo com os dados da Sociedade Internacional de Transplante de Coração e Pulmão (ISHLT), ocorrem cerca de 4000 mil transplantes por ano sendo que no ano de 2018 foi relatado um total de 69200 procedimentos realizados em todo o mundo⁹. Esses números provavelmente devem ser mais altos, pois a notificação de procedimentos realizados é voluntária e diversos centros de transplante no mundo não são cadastrados na ISHLT^{7,8}.

Os dados disponibilizados pela ISHLT⁷, mostram que o transplante pulmonar foi realizado devido à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), 34%; fibrose pulmonar idiopática (FPI), 24%; fibrose cística, 17%; deficiência de alfa-1-antitripsina (alfa-1), 6%; hipertensão arterial pulmonar idiopática (HAPI), 3%; fibrose pulmonar (não FPI), 4%; bronquiectasias, 3%; re-transplante, 2,6%; e sarcoidose, 2,5%.

Nas últimas décadas o procedimento de transplante pulmonar se tornou uma realidade clínica e tem evoluído bastante, devido a alterações nas diretrizes para seleção de doadores, avanços das técnicas cirúrgicas, melhora da qualidade das drogas imunossupressoras e melhores cuidados pré e pós-cirúrgicos. Esses progressos possibilitaram a redução da mortalidade na fila de espera e conseqüentemente um maior número de transplantes, proporcionando uma sobrevida média de 5 anos para os pacientes transplantados⁸.

Mesmo com os recentes avanços obtidos, a lista de espera para receber um órgão ainda continua longa e a taxa de sucesso pós transplante em conjunto com o tempo de sobrevivência, são fatores que preocupam as autoridades de saúde de todo o mundo. Entre os fatores responsáveis pela alta mortalidade pós transplante, destaca-se a supressão imunológica, disfunção primária de enxerto e a disfunção crônica do aloenxerto pulmonar, principalmente sob a forma da síndrome da bronquiolite obliterante⁹.

2.2 Transplantes no Brasil

De acordo com os dados da Sociedade Brasileira de Transplante de Órgãos existem atualmente 9 centros de transplantes de pulmão no Brasil, sendo 4 deles no Estado de São Paulo, 2 na cidade de Porto Alegre, 1 no Estado do Paraná, 1 no Estado do Rio de Janeiro e 1 na cidade de Fortaleza. Entre os anos de 2009 e 2019, foram realizados 856 transplantes de pulmão no país, sendo que em 2019 constavam 199 pessoas na lista de pacientes em espera de um órgão¹⁰.

O transplante de pulmão quando comparado à outros órgãos, apresenta uma taxa de sucesso bem menor. Isso se deve a alta complexidade do procedimento cirúrgico aliado aos cuidados pós-operatórios, que são extremamente necessários à recuperação do paciente. Além disso, a falta de conscientização da população sobre a importância da doação de órgãos, compromete diretamente a disponibilidade deles, contribuindo para o aumento significativo da mortalidade nas listas de espera¹⁰.

2.3 Biogenharia pulmonar

A DPOC caracteriza-se pela inflamação das vias aéreas e destruição da arquitetura da árvore brônquica, resultando em uma redução do fluxo de ar e consequente comprometimento das trocas gasosas¹¹. De acordo com os dados da OMS, estima-se que 384 milhões de pessoas apresentam DPOC e é projetado que até 2030 seja a 4ª principal causa de morte¹².

Além da DPOC, destacam-se outras doenças que comprometem o sistema respiratório causando danos na maioria das vezes irreversíveis como a fibrose cística, enfisema pulmonar, FPI, hipertensão pulmonar idiopática e doença pulmonar intersticial¹³.

Nos casos mais avançados de doenças pulmonares crônicas, o tratamento mais indicado é o transplante pulmonar, proporcionando ao paciente uma sobrevida média de 5 anos e uma melhor qualidade de vida¹⁴. Entretanto, a falta de doadores, complicações pós cirúrgicas como rejeições imunológicas e a alta complexidade do procedimento, faz com que seja necessário o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

Diante desse cenário, a bioengenharia pulmonar tem se mostrado uma opção promissora através da obtenção de scaffolds, utilizando a técnica de descelularização e a regeneração tecidual do mesmo utilizando células tronco^{5,15}. Esse processo tem como objetivo recriar um pulmão que consiga realizar todas suas funções fisiológicas, mantendo a homeostase de todo nosso organismo.

2.4 Matriz extracelular na Bioengenharia Pulmonar

A matriz extracelular (MEC) do pulmão é composta por membranas basais e matrizes intersticiais. A membrana basal é caracterizada por uma estrutura fina de glicoproteínas que reveste o lado basal do epitélio e endotélio, além de músculos circundantes, células nervosas e gordurosas. A matriz intersticial mantém a estrutura das características tridimensionais e biomecânicas do pulmão que são formadas por diferentes tipos de células estruturais presentes nos tecidos^{16,17}.

Além da MEC manter a estrutura tridimensional do órgão, possibilitando a adesão celular, ela também fornece uma série de fatores biomecânicos e biofísicos como microambiente adequado, sinais bioquímicos, funções teciduais específicas e fenótipo que influenciam diretamente o comportamento celular, possibilitando a ocorrência de processos teciduais fisiológicos que são críticos para o desenvolvimento e funcionamento dos órgãos¹⁶⁻¹⁸.

Quadro 1 - Componentes estruturais da matriz extracelular comuns e suas funções:

Componente	Presença na MEC	Função	Referência
Colágenos	Principal proteína constituinte da MEC, compondo um peso seco de 80 a 90%	Auxilia na formação da estrutura tridimensional dos tecidos. Atua na integridade biológica e estrutural da MEC.	AMIRRAH et al, 2022
Fibronectina	Segundo principal componente e proteína mais abundante da MEC.	Faz ligação com outras proteínas da matriz extracelular. Exerce papel fundamental na formação da MEC durante o desenvolvimento tecidual. Está presente no processo de progressão de doenças e atua na cura de feridas. Realiza interações intracelulares desencadeando à efeitos bilaterais célula-matriz que determina a função celular e à alteração celular-dependentes da MEC.	SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010
Laminina	Principal componente não-colagenoso da membrana basal da MEC	Dirreciona o destino celular induzindo cascatas de sinalização intracelular. Possuem um papel importante nos processos de diferenciação, adesão e migração celular	SCHÉELE et al, 2007
Glicosaminoglicanos - GAGs	GAGs sulfatados formam proteoglicanos através das ligações covalentes com as proteínas.	Realizam interações relacionadas com fatores de crescimento e outras moléculas bioativas. Componente fundamental para a mecânica dos tecidos.	MENEZES et al, 2022
Fatores de crescimento	Estão dispersos na MEC com forma de biomoléculas solúveis	Regulam o comportamento celular via sinalização intrácrina, parácrina, autócrina e endócrina. Auxiliam no reparo e regeneração tecidual.	PARK et al, 2022

Com tantas funções importantes desempenhadas, pode-se observar que a MEC é uma estrutura de extrema significância na área de Engenharia de tecidos e Medicina regenerativa.

2.5 Processo de descelularização

Para se obter um scaffold de MEC, o órgão deve passar por um processo denominado de descelularização. Esse processo consiste na remoção da própria membrana, conservando a estrutura tridimensional, colágeno, glicosaminoglicanos e proteínas residentes essenciais à sinalização celular. A remoção completa das células elimina os antígenos do doador, reduzindo as chances de uma possível resposta inflamatória e rejeição imunológica do órgão no receptor²⁵.

De acordo com a literatura científica internacional, vários métodos de descelularização já foram testados, entretanto ainda não há consenso sobre qual seja o mais eficaz. Os métodos mais eficientes disponíveis são aqueles que utilizam tratamentos físicos, químicos e biológicos para obter um scaffold com a preservação da estrutura nativa da MEC, ideal para uma futura reendotelização²⁶.

Um bom protocolo de descelularização se inicia com tratamentos físicos para lise da membrana celular, seguidos de tratamentos enzimáticos para separar os componentes celulares da MEC e o uso de detergentes químicos, solubilizando os componentes celulares citoplasmáticos e nucleares, realizando também a remoção de detritos celulares.

Após a descelularização, os scaffolds devem ser perfundidos com uma solução tampão para equilibrar o pH do sistema e remover resíduos químicos, que podem ser prejudiciais ao tecido hospedeiro^{26,27}. Os métodos de descelularização não conseguem remover 100% do material celular, possibilitando possíveis comprometimentos da citocompatibilidade causados pelo material celular residual remanescente após o procedimento.

De acordo com estudo publicado recentemente, devem se observar alguns critérios para que a descclularização seja considerada ideal. Dentre estes critérios, destaca-se que a MEC apresente <50 ng dsDNA por mg de peso seco, que o comprimento do fragmento de DNA seja <200 pb e observe a falta de material nuclear visível em seções de tecido coradas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ou Hematoxilina e Eosina (H&E)²⁷.

Sabendo que a Bioengenharia pulmonar é uma terapia promissora para a obtenção de novos tecidos e órgãos, um importante passo para que isso ocorra é a otimização do processo de decelularização pulmonar, possibilitando obter scaffolds no menor tempo, removendo a maior quantidade possível de fragmentos de DNA e preservando ao máximo as microestruturas e componentes da MEC.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo otimizado de descclularização de pulmões de *Rattus norvegicus*.

3.2 Objetivos específicos

Identificar o método químico mais eficiente no processo de descclularização de pulmões de *Rattus norvegicus*;

4. Material e métodos

4.1 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo controlado experimental laboratorial em modelo animal, desenvolvido no laboratório de Cultura de Células do Programa de Pós Graduação em Movimento Humano e Reabilitação da Universidade Evangélica de Goiás.

4.2 Aspectos éticos e legais

Previamente, o projeto do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA, tendo sido aprovado sob o parecer número 006/2020. Foram seguidos os Princípios Éticos na Experimentação Animal, de acordo com as diretrizes estabelecidas para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos constituído pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal — CONCEA/2013 e as Diretrizes Éticas internacionais para uso de animais em experimentação científica.

4.3 Modelo animal

Para a realização deste estudo, foram utilizados *Rattus norvegicus*, machos, da linhagem Wistar, com peso médio de 300 a 350g fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Evangélica de Goiás — UniEVANGÉLICA — Anápolis (GO). Os animais foram acondicionados nas instalações do Biotério e mantidos em ambiente limpo e seco, com luminosidade natural, respeitando o ciclo claro/escuro de 12h, temperatura e umidade relativa do ar adequadas. A ração e a água eram ad libitum e monitoramento diário para troca de palha e água.

4.4 Desenho do estudo

Neste estudo, foram utilizados 11 ratos machos da linhagem Wistar, que foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos distintos: Controle (C), Protocolo 1 (P1) Protocolo 2 (P2) e Protocolo 3 (P3). O desenho do estudo esta demonstrado na Figura 1.

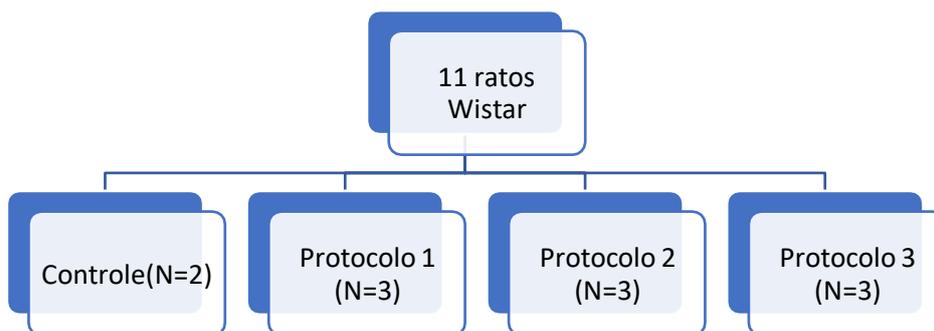


Figura 1: Fluxograma do estudo

4.5 Preparação dos animais e procedimentos cirúrgicos

Inicialmente, os ratos foram transportados em gaiolas de plástico do Biotério Central da Universidade Evangélica de Goiás até o laboratório de Cultura de Células do Programa de Pós Graduação em Movimento Humano e Reabilitação. Os animais foram mantidos no laboratório com temperatura controlada, ração e água ad libitum, por um período de 3 horas para adaptação do ambiente, visando causar o menor stress possível.

Para início dos procedimentos, os ratos foram retirados da gaiola e posicionados em cima da grade para serem contidos manualmente. Após a contenção, os animais foram anestesiados com 90 a 100 mg/Kg de Cetamina e 8 a 15 mg/kg de Xilazina (intraperitoneal), de acordo com protocolo padrão adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Evangélica de Goiás. Para verificar a profundidade da anestesia, foi realizados testes de reflexo para identificar a presença ou a ausência de determinados sinais, como reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e as alterações das frequências cardíaca e respiratória, que apresentam alterações de acordo com os planos anestésicos atingidos.

Após a confirmação da anestesia e sem qualquer presença de reflexo de dor, os ratos foram eutanasiados por overdose de anestésico, utilizando o triplo da dose recomendada de acordo com o peso corporal de cada animal. Após a realização da overdose dos animais com xilazina e cetamina, eles foram colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica e seus membros foram fixados, deixando a cavidade torácica exposta.

Após a fixação, foi utilizado um bisturi para realizar uma incisão da parte superior do tórax até o abdômen do animal, permitindo a visualização da caixa torácica. Em seguida, a caixa torácica foi rebatida e foram perfundidos através do ventrículo direito com uma solução tampão de fosfato (PBS) contendo 50 U/ml heparina e 1µg/ml de nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) para evitar formação de coágulos sanguíneos. Em seguida, o bloco cardiorrespiratório foi coletado e dissecado para a remoção do esôfago, tecidos linfáticos conjuntivos e anexos.

4.6 Descelularização dos pulmões

Após o procedimento cirúrgico, os pulmões isolados foram armazenados a -80° C até que o processo de descelularização fosse iniciado. Os pulmões foram, posteriormente, descongelados em banho-maria a 40°C e congelados a -80° C, seguido por descongelamento. Este processo foi repetido quatro vezes para aumentar a lise celular e facilitar a sua remoção.

Posteriormente, foi feito um corte na ápice do coração visando a facilitação na introdução de uma cânula através da artéria pulmonar até o ventrículo direito. Após a canulação da traqueia e da artéria pulmonar, estas foram conectadas ao sistema experimental, sendo seguidos 3 protocolos distintos para a descelularização.

Em todos os 3 protocolos a traqueia canulada foi conectada a um gerador de fluxo contínuo de pressão positiva nas vias aéreas (CPAP) para fornecer uma pressão traqueal (transpulmonar) de 10 cmH₂O insuflando os pulmões a um volume fisiológico e evitando atelectasias. O protocolo de descelularização dos pulmões está descrito na Figura 2.

Protocolo 1: foram utilizados meios descelularizantes perfundidos através da artéria pulmonar, com uma pressão constante de PPA=10 cmH₂O, inicialmente com PBS, uma vez, durante 30 minutos, seguido de 1% de SDS, durante 210 min e finalmente nova perfusão com PBS durante 30 minutos.

Protocolo 2: foram aplicados meios descelularizantes, perfundidos através da artéria pulmonar, com uma pressão constante de PPA=10 cmH₂O, inicialmente perfundidos com PBS, uma vez, durante 30 minutos, seguido de perfusão a 1% de Triton X-100, durante 210 min e finalmente nova perfusão com PBS durante 30 minutos.

Protocolo 3: foram utilizados meios descelularizantes, perfundidos através da artéria pulmonar, com uma pressão constante de PPA=10 cmH₂O, inicialmente com PBS, uma vez, durante 30 minutos, seguidos de perfusão com 1% de SDS

+ 1% de Triton X — 100 durante 180 min e finalmente perfusão com PBS durante 30 minutos.

Durante a realização dos protocolos, foi cronometrado o tempo que cada pulmão levaria para adquirir um aspecto translúcido e uma coloração esbranquiçada.

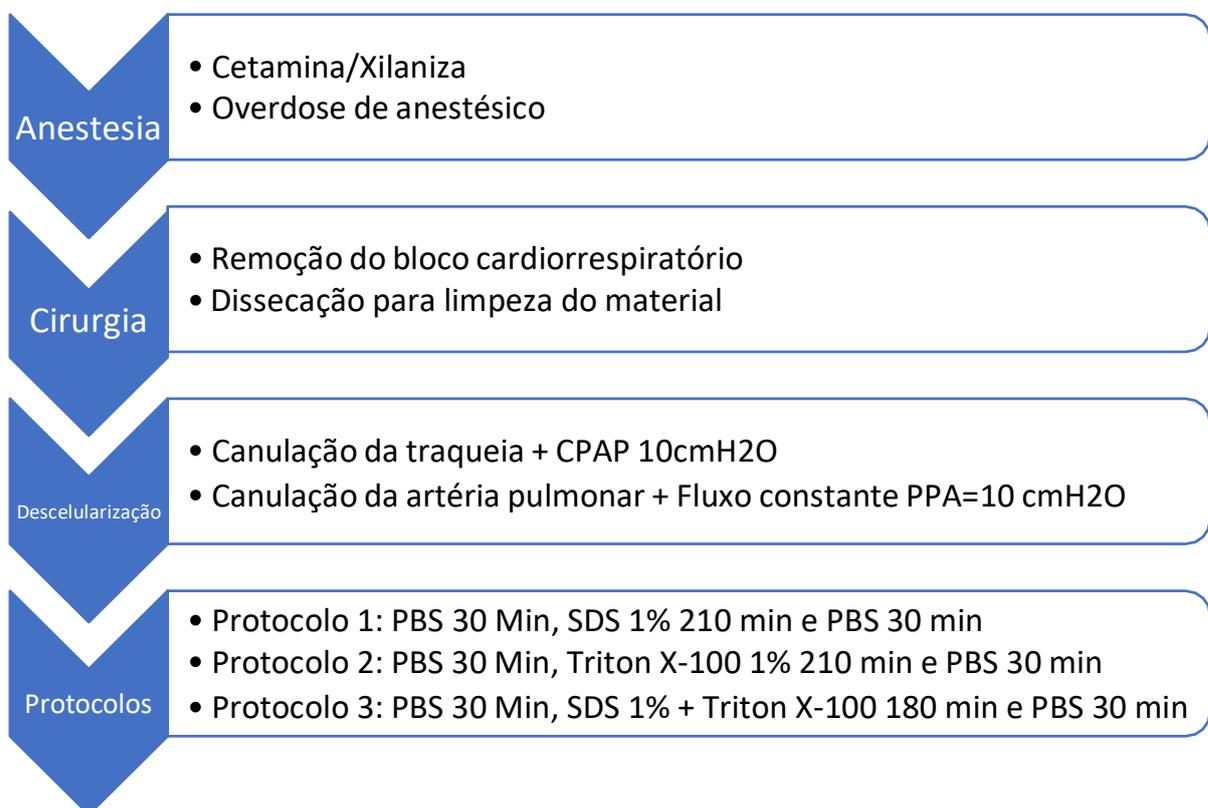


Imagem 2: Fluxograma com as metodologias do estudo.

5. Resultados

Em relação aos resultados deste estudo, na realização do protocolo 1, a artéria pulmonar foi canulada e conectada ao sistema de perfusão com os detergentes biológicos a uma pressão constante de PPA = 10 cmH₂O. Foram utilizados os meios descelularizantes PBS 1x durante 30 minutos, em sequência 1% de SDS durante 210 min e por último uma perfusão de PBS por 30 minutos. Logo nos primeiros minutos da primeira perfusão com PBS, foi possível observar os pulmões totalmente expandidos e apresentando uma coloração esbranquiçada a partir de 30 minutos.

Há medida que a perfusão de SDS ia ocorrendo os pulmões adquirindo um aspecto translucido até que no final do processo os órgãos atingiram uma coloração esbranquiçada, aspecto transparente e estruturas macroscópicas preservadas, indicando remoção celular.

Para a realização do protocolo 2, a artéria pulmonar foi canulada e conectada ao sistema de perfusão há uma pressão constante de PPA = 10 cmH₂O e em seguida iniciado o processo de descelularização com os meios descelularizantes PBS 1x, durante 30 minutos, 1% de Triton X-100, durante 210 min e finalmente PBS por 30 minutos. Foram percebidos aspectos semelhantes ao protocolo 1, com um pulmão mais volumoso, adquirindo uma coloração esbranquiçada com a perfusão do PBS e ao final do processo um aspecto translucido muito semelhante aos órgãos descelularizados com o protocolo 1.

Para a realização do protocolo 3 foi seguido um roteiro semelhante aos protocolos descritos anteriormente. Após a canulação da artéria pulmonar, os órgãos foram conectados ao sistema de perfusão, há uma pressão constante de PPA = 10 cmH₂O e em seguida perfundidos com os meios descelularizantes, PBS 1x, durante 30 minutos, 1% de SDS e 1% de Triton X-100, durante 210 min e PBS durante 30 minutos. Após a perfusão de todos os detergentes biológicos os órgãos atingiram a coloração esbranquiçada e aspecto transparente em menor tempo quando comparado com os outros protocolos.

No desenvolvimento dos protocolos 1 e 2 onde foram utilizados o SDS e Triton X-100 respectivamente, foi possível obter pulmões descelularizados em 270 minutos de procedimento, enquanto no protocolo 3, onde foi utilizado o SDS combinado com o Triton X-100 os pulmões foram descelularizados em menor período, totalizando um tempo de 240 minutos (Quadro 1).

	Pressão positiva (CPAP)	Pressão	Agentes químicos	Tempo
Protocolo 1	10 cmH2O	PPA=10 cmH2O	SDS 1%	270 Min
Protocolo 2	10 cmH2O	PPA=10 cmH2O	Triton X-100 1%	270 Min
Protocolo 3	10 cmH2O	PPA=10 cmH2O	SDS 1% + Triton X-100 1%	240 Min

Quadro 2: Descrição dos protocolos utilizados para a descelularização



Figura 3. P1. Descelularização de pulmão de *Rattus norvegicus* utilizando SDS.



Figura 4. P2. Descelularização de pulmão de *Rattus norvegicus* utilizando Triton X-100.

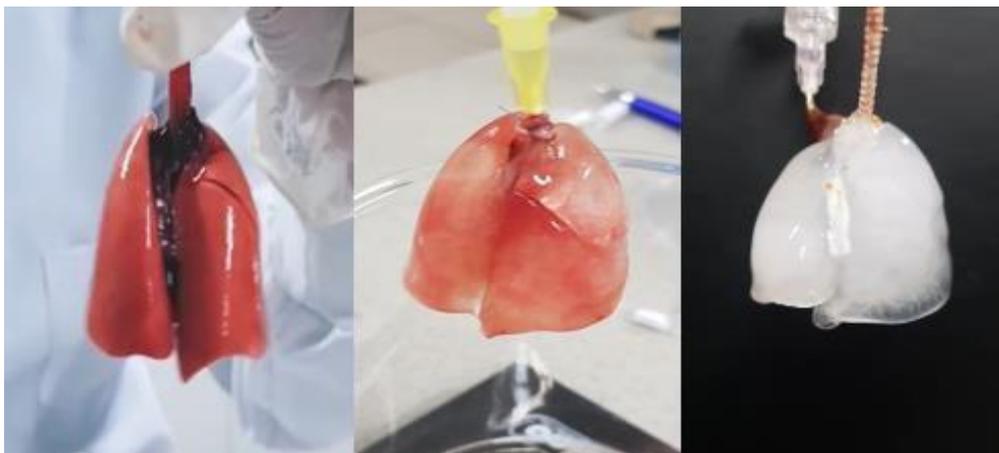


Figura 5. P3. Descelularização de pulmão de *Rattus norvegicus* utilizando SDS + Triton X-100.

6. Discussão

Com os resultados obtidos neste estudo experimental, pode-se observar que independente do protocolo utilizado, a decelularização pulmonar via vascular e com pressão constante via traquea, é um excelente método para se obter um scaffold em um curto período, além de manter suas estruturas anatômicas preservadas.

Os resultados de Girard e colaboradores (2013) mostram que é possível obter um *scaffold* ideal para ser submetido ao processo de recelularização utilizando um protocolo com pressão constante de 30 cmH₂O, com SDS a uma concentração de 0,1% com o auxílio de um biorreator. Foi observado pelos autores que o *scaffold* apesar de sofrer degradações devido ao alto fluxo utilizado, ficou totalmente livre de núcleos celulares e reteve as principais proteínas da MEC, possibilitando o cultivo de células C-10-GFP. Entretanto, o processo de descelularização levou 1230 minutos para ser realizado, diferente deste que necessitou de 240 minutos com uma pressão constante menor.

O estudo realizado em 2016 por Wang e colaboradores comparou a eficácia entre a descelularização via traqueal e arterial. Os resultados mostram que utilizando um protocolo químico de Triton X-100 1% e SDS 0,8% foi possível obter scaffolds descelularizados, tanto utilizando as vias aéreas como a artéria pulmonar. Entretanto, foi observado que a descelularização via traqueia danificou as estruturas das vias aéreas e a arquitetura dos alvéolos, enquanto o protocolo via vascular manteve essas estruturas preservadas. Em relação à preservação das proteínas presentes na MEC pulmonar, foi observado que ambos os protocolos foram capazes de reter esses componentes, no entanto a eficiência da remoção de DNA foi maior no protocolo que utilizou a descelularização via arterial.

Um modelo alternativo de descelularização semelhante ao utilizado neste estudo é visto no trabalho de Tsuchiya et al, 2016. Foi comparada a obtenção de scaffolds pela via arterial e via aérea, onde o detergente CHAPS foi infundido usando pressão negativa e pressão expiratória final positiva, dentro de um biorreator com um volume de 10cc para cada inspiração. Os resultados mostram que o processo de descelularização através da via aérea apesar de ser mais eficaz na remoção do DNA e conservar maior quantidade de colágeno, causa uma redução de GAGs, fibras elásticas, proteoglicanos e lamininas. Já no protocolo utilizando a via arterial é observado que há uma retenção maior das proteínas presentes na MEC, porém não foi tão eficaz na remoção do DNA.

No trabalho de Urbano e colaboradores em 2017 foi feita uma comparação entre dois protocolos de descelularização, avaliando as propriedades mecânicas do pulmão descelularizado. Tanto o *scaffold* obtido pela perfusão via traqueal, quanto o obtido por via arterial, obtiveram resultados semelhantes em relação ao comportamento das propriedades mecânicas do tecido pulmonar. Os resultados mostram também que o protocolo de descelularização via traqueal foi mais eficaz em relação à remoção de DNA comparado com o via artéria pulmonar.

Em um trabalho de Palma e colaboradores, realizado em 2016, pulmões foram descelularizados pela artéria pulmonar com um fluxo variando de 5 a 30 cmH₂O. Os resultados mostraram que a resistência vascular dos pulmões descelularizados diminuem de 6 a 7 cmH₂O min/ml para 3 cmH₂O min/ml em resposta a um aumento da pressão arterial pulmonar de 5 para 20 cmH₂O, mantendo-se estável em até 30 cmH₂O no sistema arterial pulmonar.

De acordo com os resultados deste estudo e dos estudos citados anteriormente, percebe-se que o método de descelularização utilizando a ventilação das vias aéreas combinado com a perfusão via vascular é uma alternativa eficaz que otimiza o processo, se assemelhando com a fisiologia do pulmão. Quando comparados os resultados deste estudo com os de Girard e colaboradores (2013) pode-se perceber que é possível obter um *scaffold* em menor tempo e com uma pressão constante menor, causando menor degradação das microestruturas pulmonares.

Os trabalhos de Wang (2016) e Tsuchiya (2016) apresentam resultados diferentes quando se compara a preservação das proteínas da MEC. O trabalho de Palma e colaboradores 2016 e Urbano e colaboradores 2017, mostram que tanto a descelularização via traqueal quanto a via arterial não apresentam diferenças entre as propriedades mecânicas do pulmão. Entretanto, o fluxo de infusão de reagentes pela artéria pulmonar, afeta diretamente a resistência vascular de pulmões descelularizados.

Wang obteve melhores resultados utilizando a combinação de Triton X-100 e SDS perfundidos através da artéria pulmonar, além de conseguir uma melhor preservação das estruturas quando comparada com a descclularização pela traqueia. Apesar de que neste estudo não foram feitas análises sobre a retenção das proteínas da MEC, o protocolo de Triton X-100 e SDS semelhante ao de Wang pode descclularizar um órgão com uma velocidade maior.

Os detergentes químicos utilizados nos processos de descclularização, devem estar em concentrações baixas para não danificarem as microestruturas pulmonares e reterem o máximo de proteínas possíveis. Entretanto, mesmo em baixas concentrações essas degradações podem ocorrer. Neste sentido, alguns autores propuseram métodos alternativos para descclularização utilizando detergentes naturais, que são menos agressivos que os comumente utilizados.

No trabalho de Obata e colaboradores realizado em 2019, foi feito uma comparação entre um protocolo utilizando laurato de potássio (LP) e um protocolo utilizando o SDS. Os resultados indicaram que o protocolo utilizando LP obteve um scaffold com menores danos nas microestruturas pulmonares quando comparado com o protocolo que utilizou o SDS. Além disso, foi constatado que ao transplantar o pulmão descclularizado com LP, as reações biológicas do sistema imunológico foram mínimas.

Um interessante estudo realizado por Jinhui e colaboradores em 2018 mostrou que um protocolo utilizando o Lauril éter sulfato de sódio (SLES) como detergente alternativo foi capaz de obter um scaffold com uma maior retenção de colágeno, elastina e glicosaminoglicanos (GAGs), quando comparado com o pulmão descclularizado com SDS. Também foi observado uma MEC com maiores quantidades de proteínas como colágeno I, colágeno IV, laminina, fibronectina e elastina no protocolo utilizando SLES. Um dos protocolos deste estudo utilizando o SDS e Triton X-100 foi capaz de descclularizar os pulmões corroborando com outros estudos da literatura.

O desenvolvimento de novas pesquisas utilizando detergentes alternativos com composições químicas menos agressivas, podem ser uma excelente alternativa para a otimização do processo de descclularização. De acordo com o estado da arte, percebe-se que estudos complementares devem ser realizados para analisar a viabilidade dessas novas opções.

7. Conclusão

Com a realização deste estudo, pode-se concluir que os três protocolos utilizados foram capazes de obter um scaffold com aspecto translúcido e de coloração esbranquiçada. Entretanto, o protocolo 3 onde foi utilizado SDS + Triton X-100, foi capaz de descclularizar os pulmões de *Rattus norvegicus* em um menor tempo quando comparado aos dois outros protocolos testados. De acordo com os resultados deste estudo pode-se afirmar que a combinação de diferentes detergentes no processo de descclularização de pulmões de *Rattus norvegicus*, tanto os mais utilizados como os alternativos, podem gerar resultados que otimizem o processo de descclularização.

8. Referências

1. World Health Organization. (2019)
2. Meyer KC. Recent advances in lung transplantation [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* 2018, 7(F1000 Faculty Rev):1684
3. Bos S, Vos R, Van Raemdonck DE, Verleden GM. Survival in adult lung transplantation: where are we in 2020? *Curr Opin Organ Transplant*. 2020 Jun;25(3):268-273. doi: 10.1097/MOT.0000000000000753. PMID: 32332197.
4. Edgar L, Pu T, Porter B, Aziz JM, La Pointe C, Asthana A, Orlando G. Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation. *Br J Surg*. 2020 Jun;107(7):793-800. doi: 10.1002/bjs.11686. PMID: 32463143.
5. Uriarte JJ, Uhl FE, Rolandsson Enes SE, Pouliot RA, Weiss DJ. Lung bioengineering: advances and challenges in lung decellularization and recellularization. *Curr Opin Organ Transplant*. 2018 Dec;23(6):673-678. doi: 10.1097/MOT.0000000000000584. PMID: 30300330; PMCID: PMC8669574.
6. Chambers DC, Cherikh WS, Harhay MO, et al. The international thoracic organ transplant registry of the international society for heart and lung transplantation: thirty-sixth adult lung and heart-lung transplantation report — 2019; focus theme: donor and recipient size match. *J Heart Lung Transpl* 2019; 38:1042–1055.
7. Erasmus ME, van der Bij W. Death after lung transplantation: improving long term survival despite perilous early postoperative years. *Transpl Int* 2020; 33:128–129.
8. Hook JL, Lederer DJ. Selecting lung transplant candidates: where do current guidelines fall short? *Expert Rev Respir Med*. 2012 Feb;6(1):51-61. doi: 10.1586/ers.11.83. PMID: 22283579; PMCID: PMC3286653.
9. Steven D. Nathan, The Future of Lung Transplantation, *Chest*, Volume 147, Issue 2, 2015, Pages 309-316, ISSN 0012-3692, <https://doi.org/10.1378/chest.14-1748>

10. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). Registro Brasileiro de Transplante. Estatísticas e transplantes (Jan/Jun) 2014 [Internet]. São Paulo: ABTO; 2014 [citado 2015 Mar. 16]. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=457&c=900&s=0>
11. Agarwal AK, Raja A, Brown BD. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2022 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 32644707.
12. World Health Organization. (2020)
13. Perez AA, Shah RJ. Critical Care of the Lung Transplant Patient. Clin Chest Med. 2022 Sep;43(3):457-470. doi: 10.1016/j.ccm.2022.04.007. PMID: 36116814.
14. Werlein C, Seidel A, Warnecke G, Gottlieb J, Laenger F, Jonigk D. Lung Transplant Pathology: An Overview on Current Entities and Procedures. Surg Pathol Clin. 2020 Mar;13(1):119-140. doi: 10.1016/j.path.2019.11.003. PMID: 32005428.
15. Ikonomou L, Magnusson M, Dries R, Herzog EL, Hynds RE, Borok Z, Park JA, Skolasinski S, Burgess JK, Turner L, Mojarad SM, Mahoney JE, Lynch T, Lehmann M, Thannickal VJ, Hook JL, Vaughan AE, Hoffman ET, Weiss DJ, Ryan AL. Stem cells, cell therapies, and bioengineering in lung biology and disease 2021. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2022 Sep 1;323(3):L341-L354. doi: 10.1152/ajplung.00113.2022. Epub 2022 Jun 28. PMID: 35762622; PMCID: PMC9484991.
16. Yi, S., Ding, F., Gong, L., Gu, X. (2017). Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Curr Stem Cell Res Ther. 12, 233-246. doi: 10.2174/1574888X11666160905092513
17. Zhou, Y., Horowitz, J.C., Naba, A., Ambalavanan, N., Atabai, K., Balestrini, J., *et al.* (2018). Extracellular matrix in lung development, homeostasis and disease. Matrix Biol. 73, 77-104. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.005
18. Burgstaller, G., Oehrle, B., Gerckens, M., White, E.S., (2017). Schiller HB, Eickelberg O. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. Eur Respir J. 50, 1601805. doi: 10.1183/13993003.01805-2016

19. Tebyanian, H., Karami, A., Nourani, M.R., Motavallian, E., Barkhordari, A., Yazdani, M., Seifalian, A. (2019). Lung tissue engineering: An update. *J Cell Physiol.* 234, 19256-19270. doi: 10.1002/jcp.28558
20. AMIRRAH, I. N. et al. A comprehensive review on collagen type I development of biomaterials for tissue engineering: from biosynthesis to bioscaffold. *Biomedicines*, v.10, n. 9, p. 2307, 2022.
21. SINGH, P.; CARRAHER, C.; SCHWARZBAUER, J. E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 26, p.397–419. 2010.
22. SCHÉELE, S. et al, Laminin isoforms in development and disease. *Journal of molecular medicine*, v. 85, n.8, p. 825–836, 2007.
23. MENEZES, R. et al. Biomaterials and tissue engineering approaches using glycosaminoglycans for tissue repair: lessons learned from the native extracellular matrix. *Acta biomaterialia*, 2022.
24. PARK, H. J. et al. Static and dynamic biomaterial engineering for cell modulation. *Nanomaterials*, v.12, n.8, p. 1377, 2022.
25. Rana, D., Zreiqat, H., Benkirane-Jessel, N., Ramakrishna, S., Ramalingam, M. (2017). Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 11, 942-965. doi: 10.1002/term.2061
26. Crapo, P.M., Gilbert, T.W., Badylak, S.F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 32, 3233-43. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
27. Girard, E.D., Jensen, T.J., Vadasz, S.D., Blanchette, A.E., Zhang, F., Moncada, C.,
28. Weiss, D.J., Finck, C.M. (2013). Automated procedure for biomimetic de-cellularized lung scaffold supporting alveolar epithelial transdifferentiation. *Biomaterials.* 34, 10043- doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.055
29. Obata, T., Tsuchiya, T., Akita, S., Kawahara, T., Matsumoto, K.,

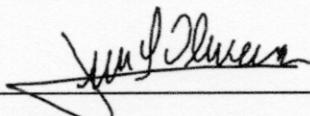
- Miyazaki, T., et al. (2019). Utilization of Natural Detergent Potassium Laurate for Decellularization in Lung Bioengineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 25, 459-471. doi:10.1089/ten.TEC.2019.0016
- 30.** Wang, Z., Wang, Z., Yu, Q., Xi, H., Weng, J., Du, X., et al. (2016). Comparative study of two perfusion routes with different flow in decellularization to harvest an optimal pulmonary scaffold for recellularization. *J Biomed Mater Res A*. 104, 2567-75. doi:10.1002/jbm.a.35794
- 31.** da Palma RK, Nonaka PN, Campillo N, Uriarte JJ, Urbano JJ, Navajas D, Farré R, Oliveira LVF. Behavior of vascular resistance undergoing various pressure insufflation and perfusion on decellularized lungs. *J Biomech*. 2016 May 3;49(7):1230-1232. doi: 10.1016/j.jbiomech.2016.02.043. Epub 2016 Mar 4. PMID: 26949099.
- 32.** Urbano JJ, da Palma RK, de Lima FM, Fratini P, Guimaraes LL, Uriarte JJ, Alvarenga LH, Miglino MA, Vieira RP, Prates RA, Navajas D, Farré R, Oliveira LVF. Effects of two different decellularization routes on the mechanical properties of decellularized lungs. *PLoS One*. 2017 Jun 1;12(6):e0178696. doi: 10.1371/journal.pone.0178696. PMID: 28570606; PMCID:PMC5453562.
- 33.** Tsuchiya, T., Mendez, J., Calle, E.A., Hatachi, G., Doi, R., Zhao, L. (2016). Ventilation-Based Decellularization System of the Lung. *Biores Open Access*. 5, 118-26. doi:10.1089/biores.2016.0012
- 34.** Ma J, Ju Z, Yu J, Qiao Y, Hou C, Wang C, Hei F. Decellularized Rat Lung Scaffolds Using Sodium Lauryl Ether Sulfate for Tissue Engineering. *ASAIO J*. 2018 May/Jun;64(3):406-414. doi: 10.1097/MAT.0000000000000654. PMID: 28863041.

FOLHA DE APROVAÇÃO
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DE PULMÕES DE RATTUS
NORVEGICUS
JOÃO PEDRO RIBEIRO AFONSO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Movimento Humano e Reabilitação -PPGMHR da Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE.

Aprovado em 21 de dezembro de 2022.

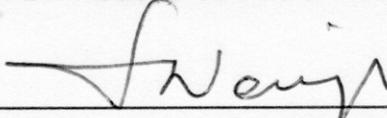
Banca examinadora



Prof. Dr. Luís Vicente Franco de Oliveira



Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira



Prof. Dr. Sergio Roberto Nacif