

EFICÁCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA A DESCELULARIZAÇÃO DE PULMÕES

**Vinício Vilela da Costa Barros de Melo¹
João Pedro Ribeiro Afonso²
Ricardo Silva Moura³
Shayra Kellen Arantes Souza⁴
Naiza Murielly Pereira Borges⁵
Yago José Fagundes de Freitas⁶
Diego Calixto de Pina⁷
Luís Vicente Franco de Oliveira⁸**

INTRODUÇÃO

A Bioengenharia pulmonar é uma ferramenta terapêutica em potencial na obtenção de pulmões funcionais para transplante em pacientes com doenças pulmonares crônicas terminais. Embora a Bioengenharia apresente uma abordagem médica regenerativa para os diferentes órgãos, ela tem sido aplicada em menor escala para os pulmões, com poucos relatos de tentativas preliminares¹.

A Bioengenharia pulmonar é particularmente difícil dada à variedade de células envolvidas, a complexidade estrutural da árvore brônquica e do circuito de circulação pulmonar e do envolvimento de estímulos mecânicos associados à respiração. No entanto, muitos obstáculos técnicos permanecem para se alcançar um pulmão reconstruído viável para transplante, como como o desenvolvimento de melhores protocolos para descclularização, a otimização no protocolo de recelularização, o tipo

¹ Discente do curso de Ciências Biológicas, Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA, E-mail: vilela43863@gmail.com

² Mestrando no PPG Movimento Humano e Reabilitação Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA, E-mail: joaopedro180599@gmail.com

³ Mestre em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, Universidade Evangélica de Goiás, E-mail: ricardos_moura@hotmail.com

⁴ Discente do curso de Fisioterapia, Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA, shayra.kas@gmail.com

⁵ Discente do curso de Medicina, Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA, E-mail: yago_freitas10@hotmail.com

⁶ Discente do curso de Medicina, Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA, E-mail: Naiza_murielly@hotmail.com

⁷ Mestrando no PPG Movimento Humano e Reabilitação Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA, E-mail: diego0611ESCS@hotmail.com

⁸ PPG Movimento Humano e Reabilitação Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA, E-mail: oliveira.lvf@gmail.com

celular mais adequado para a recelularização, a endotelização da matriz vascular e o desenvolvimento de biorreatores adequados ao processo de recelularização².

As doenças do sistema respiratório tais como Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - DPOC (enfisema pulmonar e bronquite crônica), a fibrose pulmonar idiopática (FPI), hipertensão arterial pulmonar primária, doença intersticial pulmonar e a fibrose cística (FC) resultam em danos irreversíveis na estrutura pulmonar, tendo o transplante pulmonar como indicação terapêutica quando a doença atinge uma progressão avançada²². Infelizmente, o sucesso do transplante pulmonar ainda é limitado, principalmente devido à escassez de órgãos para transplante e alta incidência de bronquiolite obliterante resultante de uma resposta aloimune provocada pelas disparidades entre o doador e os antígenos do receptor. Geralmente, de acordo com a literatura, a taxa de sobrevivência pós transplante pulmonar é de 50% com um período de sobrevida aproximadamente de cinco anos^{2,3}.

Diante das atuais limitações em relação às doações requerem estratégias no sentido de aumentar a disponibilidade de órgãos funcionais para transplante. Necessidade esta, reforçada pelo envelhecimento progressivo da população, o que aumenta a lista de espera de pacientes com doenças respiratórias graves incapacitantes e terminais. Como exemplo, citamos a DPOC que está prevista para ser a terceira principal causa de morte no ano de 2030^{4,5}. Neste contexto, a Medicina Regenerativa Pulmonar tem sido considerada como uma alternativa terapêutica em potencial, porém as pesquisas atuais não chegaram a obter um pulmão funcional que possa ser transplantado em um ser humano. Portanto, mais esforços científicos são necessários⁶.

METODOLOGIA

Descelularização dos pulmões

Os pulmões foram obtidos a partir de ratos wistar machos, com peso de 200-250 g oriundos do Biotério Central da UniEVANGÉLICA. Inicialmente, os ratos foram anestesiados com Xilazina (10 a 13 mg/kg, intraperitoneal) e Cetamina (80 a 90 mg/Kg, intraperitoneal), de acordo com protocolo padrão adotado pela CEUA.

Posteriormente, os ratos foram eutanasiados por overdose de anestésico. Imediatamente após a eutanásia, o diafragma foi perfurado e a caixa torácica rebatida para a visualização dos pulmões. Os pulmões dos ratos 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. A seguir, a traquéia, o esôfago, o coração e os pulmões foram retirados e os tecidos limpos para remover esôfago, tecidos linfáticos e conjuntivos anexos.

Os pulmões foram armazenados a -80° C até que o processo de descclularização seja iniciado. Os pulmões foram, posteriormente, descongelados em banho-maria a 40°C e congelados rapidamente em gelo seco, seguido por descongelamento. Este processo foi repetido quatro vezes para aumentar a quebra celular e facilitar a sua remoção. Após a canulação da traqueia e da artéria pulmonar, estas foram conectadas ao sistema experimental adotando uma sequência de meios descclularizantes, perfundidos através da artéria pulmonar, para a descclularização. 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.

Protocolos para descclularização

Protocolo 1 (SDS) - Após a canulação da traqueia e da artéria pulmonar, estas serão conectadas ao sistema experimental adotando a seguinte sequência de meios descclularizantes, perfundidos através da artéria pulmonar, com uma pressão constante de PPA=20 cmH₂O, (1) PBS 1x, durante 30 minutos, (2) água deionizada durante 15 minutos, (3) 1% de SDS, durante 150 min e (4) PBS durante 30 minutos.

Protocolo 2 (Triton X-100) - Após a canulação da traqueia e da artéria pulmonar, estas serão conectadas ao sistema experimental adotando a seguinte sequência de meios descclularizantes, perfundidos através da artéria pulmonar, com uma pressão constante de PPA=20 cmH₂O, (1) PBS 1x, durante 30 minutos, (2) água deionizada durante 15 minutos, (3) 1% de Triton X-100, durante 150 min e (4) PBS durante 30 minutos.

Protocolo 3 (SDS e Triton X-100) - Após a canulação da traqueia e da artéria pulmonar, estas serão conectadas ao sistema experimental adotando a seguinte sequência de meios descelularizantes, perfundidos através da artéria pulmonar, com uma pressão constante de PPA=20 cmH₂O, (1) PBS 1x e Triton X-100, durante 30 minutos, (2) água deionizada durante 15 minutos, (3) 1% de Triton X-100, durante 150 min e (4) PBS durante 30 minutos.

Avaliação da eficiência dos protocolos

Para a avaliação da eficiência dos protocolos foi realizada a quantificação de componentes da matriz extracelular como colágeno, elastina, laminina e glucosaminoglicanas. O colágeno será quantificado por oxidação da prolina 4-OH-L para pirrol e reação com p-dimetilaminobenzaldeído (absorbância lida a 560 nm). A elastina será quantitativamente mensurada por meio de kit dye-binding Fastin Elastin (BicolorLTD), de acordo com as instruções do fabricante. A laminina será quantificada utilizando um kit ELISA laminina (Genomics Insight) em amostras homogeneizadas em inibidores da protease (Roche). As GAGs serão determinadas utilizando o a coloração de azul de dimetilmetileno. A proteína total será determinada pelo método de Bradford (Sigma).

Resultados parciais

Após a realização dos 3 protocolos, em ambos foi possível obter pulmões descelularizados e com suas estruturas anatômicas preservadas após 3 horas e 30 minutos de perfusão. Para a confirmação da eficácia da descelularização e a identificação do método mais eficiente, será aplicada a coloração DAPI para análise da remoção celular e kits específicos para a quantificação dos componentes da matriz extracelular como colágeno, elastina e lâminina.

REFERÊNCIAS

1. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Trasplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. **The New England journal of medicine**. 2001: 344(7):532-3.

2. Yusen RD, et al. Lung Transplantation in the United States, 1999–2008. **Am J Transplantation** 2010;10(2):1047–1068.
3. Stehlik J, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th official adult heart transplant report—2012. **The Journal of heart and lung transplantation**, v. 31, n. 10, p. 1052-1064, 2012.
4. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. **The European respiratory journal** 2006; 27(2):397-412.
5. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, et al. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of 30 chronic obstructive pulmonary disease. **American journal of respiratory and critical care medicine** 2010;182(5):693-718.
6. Nichols JE, et al. Design and development of tissue engineered lung: Progress and challenges. **Organogenesis**.2009;5:57-61