

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FLAVIA MEDINA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇO CARDÍACO
DERIVADO DE ÓRGÃO DESCELULARIZADO**

VITÓRIA

2016

FLAVIA MEDINA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇO CARDÍACO
DERIVADO DE ÓRGÃO DESCELULARIZADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof Dr. Breno Valentim Nogueira

VITÓRIA

2016

FLAVIA MEDINA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇO CARDÍACO
DERIVADO DE ÓRGÃO DESCELULARIZADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 12 de maio de 2016.

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira - UFES

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba - UFJF

Prof. Dr. Dominik Lenz – UVV

Prof. Dra. Flavia de Paula - UFES

VITÓRIA

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo conhecimento que me foi dado e por ter me sustentado em todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus pais, Gilson e Lourdes, que me apoiaram em todas as minhas decisões e sempre estiveram presente. E a minha irmã, Francielly *In memoriam*, que me ajudou e me deu força para que eu iniciasse o mestrado.

Ao meu noivo, Rosemberg, que teve muita paciência e passou todos os bons e maus momentos junto de mim sempre me incentivando.

Ao Professor Dr. Breno Valentim Nogueira que me orientou na realização deste trabalho.

Aos colegas da turma de mestrado e aos demais que estiveram cursando as disciplinas juntos.

Aos colegas do LUCAR que estão presentes e aos que já passaram pelo laboratório foram dois anos de ótima convivência. E aqueles que estiveram mais diretamente ligados ao trabalho que me auxiliaram nos experimentos meu muito obrigada a Afrânio, Tadeu e Gabriela. Aos técnicos do laboratório Jairo, Sueli e Helio e ao prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes obrigada pelo conhecimento compartilhado e apoio nos experimentos.

Aos professores José Geraldo Mill e Marcelo Perim Baldo pelo empréstimo da bomba peristáltica para realização dos experimentos.

A UFES e ao programa de pós graduação em biotecnologia pela oportunidade e o conhecimento adquirido.

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida, a Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES): edital número 006/2014 - universal - projeto individual de pesquisa (termo de outorga: 0606/2015) e edital CNPq/FAPES Nº 012/2014 (processo: nº0832/2015).

RESUMO

A doença cardíaca é considerada maior causa de morte no mundo e muitos pacientes tem como única forma de tratamento o transplantes do órgão. A bioengenharia tecidual veio como forma de auxiliar no problema de escassez de órgãos para doação, utilizando de técnicas que consistem em retirar as células do órgão mantendo os componentes da Matriz Extracelular (MEC) e recelularizar com células do próprio paciente, portanto reduzindo a concentração de moléculas imunologicamente ativas. Todos os agentes usados em descelularização alteram a composição e causam algum dano a ultraestrutura. O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de arcabouço cardíaco derivado de matriz extracelular (MEC) descelularizada com uso de dois agentes e com tempo de exposição reduzidos. Como modelo experimental foram utilizados 14 ratos Wistar, machos, com idade de dois meses pesando em média 330g. Após anestesia (Ketamina/Xilazina 90mg/Kg/10 mg/Kg), os animais tiveram seu tórax aberto e retirado o coração. O órgão foi canulado e perfundido através da aorta ascendente inicialmente com PBS, seguidos por perfusão com detergentes SDS 1% e Triton X-100 1%. Foram utilizadas técnicas de microscopia óptica onde as mostras após processadas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E), Picosírius e marcadas com anticorpos para laminina e fibronectina. Para microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura as amostras após processadas foram obtidas imagens em seus respectivos microscópios. A quantificação de DNA foi feita através de kit DNeasy e as amostras entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, utilizando teste t de Student. Foi encontrada ausência de células nos arcabouços descelularizados, observada por microscopia óptica e a manutenção da estrutura do arcabouço da MEC foi visualizada macroscopicamente e microscopicamente onde foi revelada alteração na microestrutura. Os principais componentes da MEC se mantiveram no arcabouço descelularizado e a concentração de DNA teve uma redução de 87,04% comparando os grupos controle e descelularizado. Com uso de apenas dois agentes e a redução do tempo de exposição o processo se manteve eficaz na retirada de células, melhor preservação dos componentes da MEC, podendo utilizar os arcabouços para recelularização.

Palavras-chave: Coração. Descelularização. Matriz Extracelular. Microscopia.

ABSTRACT

Heart disease is considered leading cause of death worldwide and for many patients the only possible treatment is a transplant organ. The tissue engineering came like a way to help in shortage of donor organs, using techniques that consist of removing the organ cells maintaining the components of the extracellular matrix (ECM) and recellularizar with patients own cells, thereby reducing the concentration of immunologically active molecules. All agents used in decellularization alter the composition and cause some damage to the ultrastructure. The objective of this work was the development of a cardiac framework derived extracellular matrix (ECM) decellularized with use of two agents and exposure time reduced. As experimental model were used 14 male Wistar rats aged two months weighing on average 330g. After anesthesia (Ketamine / Xylazine 90 mg / kg / 10 mg / kg), animals had their open chest and removed heart. Their was cannulated and perfused through the ascending aorta initially with PBS, followed by perfusion with 1% SDS detergent and 1% Triton X-100. Optical microscopy techniques were used after which the samples processed were stained with hematoxylin and eosin (H&E), Picrosirius and labeled with fibronectin and laminin antibodies. For transmission electron microscopy and scanning electron microscopy samples were processed after images obtained in their microscopes. Quantification of DNA was done using DNeasy kit and the samples between groups were considered significant at $p < 0.05$ using Student's t test. It was found from the absence of cells in decellularized scaffolds, observed by optical microscopy and maintenance of the ECM scaffold structure was viewed macroscopically and microscopically where it was revealed change in microstructure. The major components of the ECM remained in the decellularized scaffold and DNA concentration decreased by 87.04% comparing control groups and decellularized. With use of only two agents, and reducing the time of exposure process remained effective in the removal of cells, better preservation of ECM components, and may utilize the scaffolds for repopulation.

Keywords: Heart. Decellularization. Extracellular matrix. Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As 10 principais causas de mortes no mundo em 2012. Fonte: (OMS, 2014).	11
Figura 2. Composição da matriz extracelular. Fonte: (LONDONO; BADYLAK, 2015)	20
Figura 3. Esquema de um sistema de perfusão. No erlenmeyer a solução a ser perfundida passa através de cânulas através de uma bomba peristáltica até a agulha onde o órgão está inserido.	23
Figura 4. Imagens macroscópicas do processo de descelularização de coração de rato.	29
Figura 5. Imagens de microscopia óptica dos grupos controle (A, B e C) e descelularizado (D, E e F). Coloração H&E. Barra de escala: 50 µm.	30
Figura 6. Imagens de microscopia óptica dos grupos controle (A, B e C) e descelularizado (D, E e F). Coloração com picrosírius. Barra de escala: 50 µm.	31
Figura 7. Figuras A e C são amostras do grupo controle, Figuras B e D amostras do grupo descelularizado, em marrom mostra a marcação com anticorpos anti laminina e anti fibronectina.	32
Figura 8. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Imagens A,B e C mostrando a presença de mitocôndrias e sarcômero. Imagem D, E e F setas mostram a presença de fibras colágenas. M = mitocôndria; S = sarcômero.	33
Figura 9. Imagens de microscopia eletrônica de varredura. Imagem A e C mostrando a organização das células cardíacas e das fibras da matriz extracelular, enquanto que na imagem B e D as fibras da matriz se mostram retraídas no arcabouço acelular.no arcabouço acelular.....	34
Figura 10. Concentração de DNA em ng por mg de matriz dos grupos controle (n=3) e descelularizado (n=3). Os dados estão expressos como média ± EPM; (**p< 0,001, teste t de Student).	35

LISTA DE SIGLAS

CHAPS	3 - [(3-colamidopropil) dimetilamônio] - 1-propanossulfonato
COPD	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DAB	<i>Diaminobenzidine</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra-Acético
EGTA	Ácido Etileno-Glicol-Tetra Acético
FN	Fibronectina
GAGs	Glicosaminoglicanos
HCl	Ácido Clorídrico
H&E	Hematoxilina e Eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MEC	Matriz Extracelular
MET	Microscopia Eletrônica de Trasmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de varredura
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Para análise
PBS	Tampão fosfato de sódio (do inglês <i>Phosphate Buffered Sodium Saline</i>)
SDS	Docecil Sulfato de Sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.2 Epidemiologia	9
1.3 Bioengenharia tecidual	11
1.4 Descelularização	12
1.4.1 Agentes químicos	13
1.4.1.2 Soluções hipotônicas e hipertônicas.....	14
1.3.1.3 Álcoois	14
1.4.1.4 Detergentes	15
1.4.1.5 Outros solventes.....	16
1.4.2 Agentes biológicos	16
1.4.2.1 Enzimas	16
1.4.2.2 Agentes não enzimáticos.....	17
1.4.3 Agentes físicos	17
1.4.3.1 Temperatura	17
1.4.3.2 Força e pressão	18
1.5 Matriz extracelular	18
1.5.1 Principais componentes da MEC do coração	19
1.5.1.1 Colágeno	19
1.5.1.2 Fibronectina e Laminina.....	19
1.5.1.4 Glicosaminoglicanos	20
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 METODOLOGIA	22
3.1 Animais experimentais	22
3.2 Sacrifício dos animais	22
3.3 Descelularização	23
3.4 Processamento Histológico	23
3.5 Coloração Hematoxilina & Eosina (H&E) e Picrosírius	24

3.6	Imunohistoquímica (IHQ).....	25
3.7	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	26
3.8	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	27
3.9	Análise quantitativa de DNA	27
3.10	Análise Estatística	28
4	RESULTADOS.....	29
4.1	Descelularização	29
4.2	Análise histológica	29
4.2.1	Coloração com H&E.....	29
4.2.2	Coloração com Picrosírius.....	30
4.2.3	Imunohistoquímica	31
4.3	Microscopia eletrônica de transmissão	32
4.4	Microscopia eletrônica de varredura.....	33
4.5	Análise quantitativa de DNA	34
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	39
7	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Coração

O coração é um órgão dividido em duas câmaras: átrio e ventrículo, direito e esquerdo. O lado direito do coração bombeia o sangue para os pulmões e o lado esquerdo bombeia para os órgãos periféricos. Entre o átrio e ventrículo direito existe a valva tricúspide e entre átrio e ventrículo esquerdo a valva mitral (bicúspide), essas válvulas são responsáveis por evitar o refluxo de sangue dos ventrículos para os átrios durante a diástole (GUYTON; HALL, 2006).

As fibras do músculo cardíaco são formadas de várias células ligadas entre si por complexo juncional chamado de discos intercalares. Nesses discos encontram-se três especializações juncionais: zônulas de adesão, desmossomos e junções comunicantes, essas últimas permitem facilmente a difusão de íons pelo fluido intracelular, facilitando a propagação dos potenciais de ação de uma célula à outra (GUYTON; HALL, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As células que compõem o músculo cardíaco tem aproximadamente 15 μm de diâmetro e 85-100 μm de comprimento. Células cardíacas possuem estriações transversais semelhantes àquelas encontradas no músculo esquelético, porém possuem de um a dois núcleos, contrário ao encontrado em células esqueléticas que são multinucleadas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

1.2 Epidemiologia

As doenças cardíacas representam as maiores causas de morte no mundo (LU et al., 2013), dados confirmados pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2014). Estima-se que 17,4 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2012 (Figura 1) (OMS, 2014). No Brasil, segundo dados do ministério da saúde,

foram registrados 335.213 óbitos por doenças do aparelho circulatório no período de 2011 (Ministério da saúde/SVS - Sistema de Informação de Mortalidade e IBGE).

Doenças cardiovasculares incluem doenças coronarianas, cerebrovasculares, congênitas do coração, reumáticas do coração, dentre outras. Diversos fatores comportamentais podem contribuir para o aumento do risco dessas doenças, como hábitos alimentares, tabaco, falta de atividade física, uso de álcool e outros. Além disso, algumas doenças como diabetes, hipertensão e hiperlipidemia também podem desencadear doenças cardiovasculares (OMS, 2015).

O tratamento é limitado em pacientes com grave redução da função cardíaca, a única opção de muitos indivíduos em estágio final da doença é o transplante do órgão, mas esse tratamento só é possível para um número limitado de pacientes devido à escassez de doadores (FUNAKOSHI et al., 2016). Apesar de melhorar as taxas de sobrevivência a curto prazo, a longo prazo esse tratamento ainda possui limitações devido a rejeição ao órgão e aos efeitos da imunossupressão (GUYETTE et al., 2016).

A II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco estabelece alguns critérios que vão desde o processo de seleção de potenciais receptores, até os cuidados em todas as fases após o transplante. Para seleção de receptores de coração são feitos vários testes que envolvem anamnese, testes físicos, testes de compatibilidade sanguínea, avaliação da gravidade da insuficiência, avaliação funcional de múltiplos órgãos, testes sorológicos, rastreamento de neoplasias além de consultas nutricionais, psicológicas/psiquiátricas. Os pacientes candidatos ao transplante recebem grandes quantidades de medicamentos antes mesmo da realização do transplante. Após transplantes o uso de imunossupressores se faz necessários devido à alta taxa de rejeição ao transplante, a utilização de corticosteróides, inibidores de calcineurina e antiploriferativos ainda é usada de maneira rotineira. Mesmo com toda monitorização e utilização de medicamentos a rejeição ainda é muito comum, o que aumenta ainda mais os gastos com os pacientes transplantados (BACAL et al., 2009).

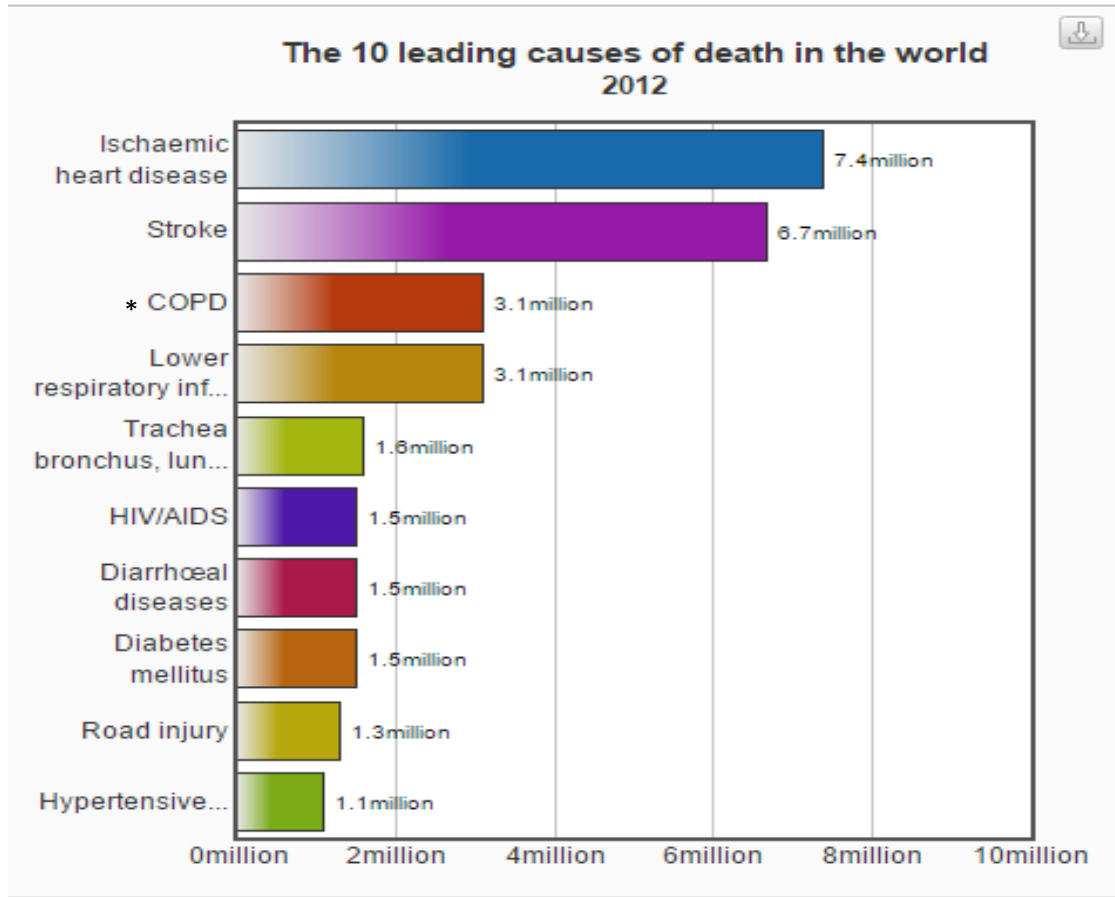


Figura 1. As 10 principais causas de mortes no mundo em 2012. Fonte: (OMS, 2014).

*COPD (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica)

1.3 Bioengenharia tecidual

A criação de corações bioartificiais surge como uma solução promissora ao atual problema da escassez de órgãos para transplantes. Além disso, as taxas de rejeição ao transplante poderiam ser drasticamente reduzidas com o uso de células derivadas dos próprios pacientes (GUYETTE et al., 2016). Nesse contexto, novas opções no campo da bioengenharia tecidual, como a utilização de suportes acelulares, têm sido exploradas para suprir essa necessidade por reparo tecidual ou por um novo órgão.

Com os avanços da bioengenharia tecidual já foram obtidos com sucesso vasos sanguíneos, bexiga urinária e traqueia, tecidos que não requerem uma grande rede vascular. Aplicações em órgãos como coração, rim, fígado e pulmão estão sendo feitas, mas ainda são necessários mais estudos, devido a rede vascular mais

complexa presente nesses órgãos (ARENAS-HERRERA et al., 2013; GUYETTE et al., 2016; HOGAHOGAN; MOHAMED; TAO, 2015; MOSER; OTT, 2014). Em 2008 o primeiro órgão complexo foi descelularizado: corações de ratos foram perfundidos com agentes químicos e repovoados com células cardíacas neonatais, o órgão foi mantido em um biorreator em condições estéreis de cultura e após oito dias em cultura os corações mostraram respostas elétricas e contráteis (OTT et al., 2008). Desde então diversos protocolos para órgãos complexos tem sido testados. Em 2010 Nakayama e colaboradores descelularizaram rins de macaco Rhesus de diferentes idades com os detergentes docecil sulfato de sódio (SDS) e Triton X-100 em temperaturas de 4°C e 37°C. Perfusão com SDS a 4°C mostrou melhor preservação da arquitetura e ausência de núcleo em coloração com hematoxilina e eosina (H&E). Após três dias e cultura as células migraram aproximadamente 300µm para dentro do suporte e por análise imunohistoquímica com marcador de células renais foi demonstrado o fenótipo de células renais presente do suporte biológico (NAKAYAMA et al., 2010). Também em 2010 Ott e colaboradores também utilizando detergentes SDS e Triton X-100 descelularizou pulmão de ratos e demonstrou após a recelularização e cultura do órgão à criação de uma barreira alvéolo-capilar intacta de espessura fisiológica, regenerando a base morfológica das trocas gasosas. Após o transplante ortotópico os ratos recém transplantados demonstraram respiração sem suporte de um ventilador por várias horas até o aparecimento de secreções onde foi necessário reintubação (OTT et al., 2010). Em 2014 Pan e colaboradores, utilizando EDTA, Triton X-100 e SDS em diferentes concentrações descelularizou fígado de ratos, e as análises de imunohistoquímica e *Western blot* mostrou a preservação de componentes da matriz extracelular (MEC): laminina, fibronectina, colágeno I e III. Quando em cultura os componentes mantiveram sua função de adesão celular, migração, proliferação e transdução de sinais entre diferentes células (PAN et al., 2014).

1.4 Descelularização

A descelularização é o processo pelo qual as células são removidas dos tecidos/órgãos, com a manutenção dos componentes da MEC em um suporte estrutural (FU et al., 2014). Essa técnica minimiza problemas de biocompatibilidade, o que a torna mais vantajosa em relação ao uso de matrizes sintéticas para o desenvolvimento de órgãos bioartificiais (LU et al., 2013).

A descelularização de um órgão inteiro pode reduzir concentração de moléculas imunologicamente ativas, além de preservar a estrutura tridimensional do órgão, incluindo o sistema microvascular primitivo, podendo ser utilizada na engenharia de tecidos (FU et al., 2014; HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013).

Durante o processo de descelularização, o maior desafio é a total remoção do material celular sem que haja danos à MEC. Alguns critérios têm sido estabelecidos para o órgão descelularizado, são eles: a quantidade de DNA não deve ser maior do que 50 ng de ácido desoxirribonucleico (DNA) por mg de MEC, qualquer fragmento de DNA presente deve ser inferior a 200 pb de comprimento e a MEC não deve ter qualquer material nuclear visível (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; LONDONO; BADYLAK, 2015). Estes critérios podem ser confirmados por técnicas de extração, purificação e amplificação de DNA, além de técnicas de coloração ou fluorescência, como coloração com hematoxilina e eosina (H&E) ou 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para produzir um suporte acelular, porém todos os agentes usados atualmente alteram a composição e causam algum dano à ultraestrutura da MEC (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GRAUSS et al., 2005). Vários métodos químicos, físicos e biológicos estão sendo pesquisados com o objetivo de alcançar melhores resultados de remoção de células causando dano mínimo à matriz. Geralmente os processos mais eficazes no que se refere à remoção e preservação da MEC envolvem uma combinação desses métodos (HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013).

1.4.1 Agentes químicos

1.4.1.1 Ácidos e bases

Agentes ácidos e básicos causam hidrólise de componentes citoplasmáticos e ácidos nucleicos. O ácido peracético, também utilizado por suas propriedades antissépticas, é capaz de remover ácidos nucleicos com mínimo efeito na composição da MEC. Outro ácido que pode ser utilizado é o ácido acético, utilizado em descelularização de derme, porém este ácido remove colágeno, reduzindo a força da MEC (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; FU et al., 2014; HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013). Assim como soluções alcalinas, o ácido acético, utilizados em descelularização de derme para remoção de pêlos, não são indicadas para a descelularização de outros tecidos pois podem eliminar fatores de crescimento e colágeno, reduzindo as propriedades mecânicas da matriz (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

1.4.1.2 Soluções hipotônicas e hipertônicas

Soluções hipotônicas e hipertônicas promovem lise de células por choque osmótico e também rompem ligações DNA-proteína com mínimo efeito na MEC e na arquitetura original do órgão (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Para melhorar o efeito do choque osmótico e evitar material celular residual é comum imergir o tecido em ciclos alternados de soluções hipotônicas e hipertônicas. Soluções de HCl Tris, soluções de EDTA e NaCl são os tratamentos mais frequentemente utilizados (HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013).

1.3.1.3 Álcoois

Álcoois como metanol, etanol e glicerol podem auxiliar no processo de descelularização ao desidratar e conseqüentemente lisar as células. Também são eficientes em remover lipídios dos tecidos. Entretanto, devem ser tomadas precauções na utilização de álcoois como etanol e metanol devido a sua capacidade

em precipitar proteínas e causar dano à ultraestrutura da MEC. Além disso, esses agentes devem ser totalmente eliminados após a descclularização, pois podem causar efeitos citotóxicos durante o processo de colonização do órgão (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013).

1.4.1.4 Detergentes

Vários tipos de detergentes sejam eles iônicos, não iônicos e zwitteriônicos são usados, muitas vezes em combinação, em protocolos de descclularização. Os detergentes são utilizados para solubilizar a membrana celular, dissociar o DNA de proteínas e remover o material celular do tecido (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Detergentes não iônicos geralmente tem um efeito mínimo sobre a estrutura do tecido (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). Esses rompem as ligações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, mas mantém as ligações proteína-proteína, por isso são chamados relativamente não-desnaturantes, deixando as proteínas do órgão em uma conformação funcional (SEDDON; CURNOW; BOOTH, 2004). O mais frequente detergente não iônico usado é o Triton X-100, com variações no tempo de exposição em diferentes protocolos. Sabe-se que esse detergente causa mínima mudança na composição da MEC. Além disso, o Triton X-100 é melhor agente para eliminação de lipídios de tecidos do que detergentes iônicos como o deoxicolato (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013).

Detergentes iônicos são efetivos em solubilizar membranas citoplasmáticas e nucleares e desnaturam proteínas ao romper a interação proteína-proteína (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). O SDS, agente de descclularização iônico mais usado, é mais eficaz em remover células do que o Triton X-100, especialmente em órgãos densos, apesar de também causar mais danos à MEC, como a degradação de glicosaminoglicanos (GAGs), o que reduz a estabilidade mecânica do suporte (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013). O deoxicolato de sódio, outro detergente iônico, apesar de também remover restos celulares, causa grande ruptura da arquitetura original do tecido quando comparado ao SDS (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

O detergente zwitteriônico 3 - [(3-colamidopropil) dimetilamônio] - 1-propanossulfonato (CHAPS) é mais eficaz em remover células de tecidos finos como o pulmão, nervos e vasos sanguíneos (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013). Além disso, estudos mostraram que esse detergente não prejudica a composição de colágeno e elastina, apesar de reduzir as propriedades mecânicas do suporte acelular (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013).

1.4.1.5 Outros solventes

Solventes como acetona podem ser usados para remover lipídios durante a descclularização, porém, assim como os alcoóis, a acetona é um fixador tecidual e seu uso pode causar danos à ultraestrutura da MEC, produzindo suportes mais rígidos com propriedades mecânicas mais distantes daquelas presentes no tecido nativo (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).Tributil fosfato (TBP) é um outro solvente orgânico com características viricidas. Esse é mais efetivo do que detergentes em descclularização de tecidos densos, como tendões, porém apresenta variáveis efeitos sobre a MEC (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; FU et al., 2014).

1.4.2 Agentes biológicos

1.4.2.1 Enzimas

Enzimas utilizadas em protocolos de descclularização de tecidos incluem nucleases, tripsina, colagenase, lipase, dispase, termolisina e α -galactosidase. O uso de tratamentos somente enzimáticos remove resíduos celulares, porém é difícil a completa remoção de células além da possibilidade dessas induzirem resposta imune (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

A exposição do tecido ao agente biológico mais utilizado em descelularização, a tripsina, pode causar alteração no conteúdo de colágeno, laminina, fibronectina e GAGs. Por esse motivo o tempo de exposição do tecido ao agente é um fator crucial para a eficiência do processo de descelularização (FU et al., 2014; HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013).

1.4.2.2 Agentes não enzimáticos

Agentes quelantes como ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) e ácido etileno-glicol-tetra acético (EGTA) atuam dissociando células das proteínas da MEC por sequestrar íons metálicos, mas são geralmente usados em associação com outros agentes, pois são insuficientes para remover células superficiais (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

1.4.3 Agentes físicos

1.4.3.1 Temperatura

Congelamento e descongelamento são usados em descelularização porque formam cristais de gelo que rompem a membrana celular, causando lise nas células (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). Cuidados com a frequência de congelamento e descongelamento devem ser tomados para evitar que os cristais formados rompam a estrutura da MEC. Esse método pode ser utilizado em descelularização, porém, há necessidade de outro tipo de tratamento posterior para remover restos celulares do arcabouço (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

1.4.3.2 Força e pressão

A abrasão mecânica, principalmente quando combinada com métodos químicos, é eficiente em remover células dos órgãos. Entretanto, esse tipo de força pode causar danos à ultraestrutura (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

A pressão hidrostática, utilizada para remover células de vasos sanguíneos e córnea, pode causar danos à ultraestrutura da MEC, uma vez que promove a formação de cristais de gelo. Para evitar essa formação, pode-se aumentar a temperatura durante a descelularização, porém, elevações na temperatura também podem causar rompimento da MEC por aumento da entropia (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

1.5 Matriz extracelular

A MEC é composta por uma diversidade de componentes organizados em uma estrutura tridimensional. Essa MEC, presente em um órgão descelularizado, faz parte de um suporte que pode ser usado em medicina regenerativa, pois proporciona um ambiente natural para a modelagem de órgãos e para a investigação de mecanismos de interação célula-MEC em tecidos saudáveis e doentes (GUYETTE et al., 2014).

A MEC é composta principalmente de proteínas estruturais e funcionais, como colágeno, laminina, fibronectina, glicosaminoglicanos (GAGs) e fatores de crescimento. Esses componentes são necessários para um repovoamento de sucesso com células com propriedades regenerativas (GÁLVEZ-MONTÓN et al., 2013; HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013). Em um coração saudável, laminina, fibronectina e colágeno I compreendem cerca de 70% da proteína total no interior do coração (SULLIVAN et al., 2014).

A MEC já foi considerada apenas um suporte estrutural, porém atualmente se sabe que a mesma participa de vários processos celulares como: sinalização célula-célula, proliferação, diferenciação e migração celular (LOCKHART et al., 2011).

1.5.1 Principais componentes da MEC do coração

1.5.1.1 Colágeno

O colágeno é o componente estrutural mais abundante da MEC (GILLIES et al., 2011). Dos diversos tipos de colágeno existentes ao longo da formação do coração, o colágeno tipo I é predominante na MEC, seguido de colágenos tipo III, IV, V, VI e VII, que também existem em quantidades notáveis (LONDONO; BADYLAK, 2015). Colágeno tipo I, III, V, e VI são encontradas no miocárdio ventricular, válvulas átrio ventriculares e cordoalhas tendíneas. Enquanto que, colágeno II, IV, XI, XIII estão restritas ao desenvolvimento de estruturas de válvulas e em cordas tendíneas. Outros dois colágenos do tipo não-fibrilares, tipos XV e XVIII, são expressos no desenvolvimento do coração adulto. Além disso o colágeno também está presente na parede da aorta, e é importante para manter a elasticidade e integridade deste tecido (LOCKHART et al., 2011).

1.5.1.2 Fibronectina e Laminina

A fibronectina (FN) é a segunda molécula mais abundante na MEC e também é essencial para o processo de recelularização, pois possui vários domínios que facilitam a adesão de vários tipos de células (LONDONO; BADYLAK, 2015). É uma glicoproteína presente em todos os tecidos e durante toda a vida e variações na sua quantidade na MEC estão relacionadas a algumas doenças como glomerulopatia com depósitos de fibronectina (CASTELLETTI et al., 2008), doenças fibróticas, queloides, cicatrizes hipertróficas, doenças embrionárias do coração, dentre outras (SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010).

Sevilla e colaboradores (2010) relatam que a polimerização da FN está relacionada a co-deposição de fibras de colágeno, e a proporção das concentrações desses dois componentes está relacionada com eventos de proliferação celular e formação do tecido (SEVILLA et al., 2010).

A laminina está presente em todos os órgãos do corpo, formando uma rede estrutural para montagem da membrana basal. A laminina atua como molécula de adesão para células e outros componentes da MEC e interação célula-matriz, além de estar envolvida na organização e manutenção das estruturas vasculares (LOCKHART et al., 2011; LONDONO; BADYLAK, 2015).

1.5.1.4 Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são cadeias de polissacarídeos compostos de repetidas unidades de dissacarídeos. Têm a capacidade de reter água e se ligar a fatores crescimento e citoquinas. Influenciam na proliferação, migração e diferenciação celular (LONDONO; BADYLAK, 2015).

Existem quatro classes de GAGs: Ácido hialurônico, o mais abundante no coração em desenvolvimento; sulfato de heparina, sulfato de condroitina/sulfato de dermatina e sulfato de queratina. Esses três últimos são encontrados na matriz extracelular do coração, ligados a proteínas do núcleo de proteoglicanos, enquanto que o ácido hialurônico é sintetizado na membrana plasmática e não fica ligado a uma proteína do núcleo (LOCKHART et al., 2011). Todos os agentes usados atualmente alteram a composição e causam algum dano à ultraestrutura da MEC.

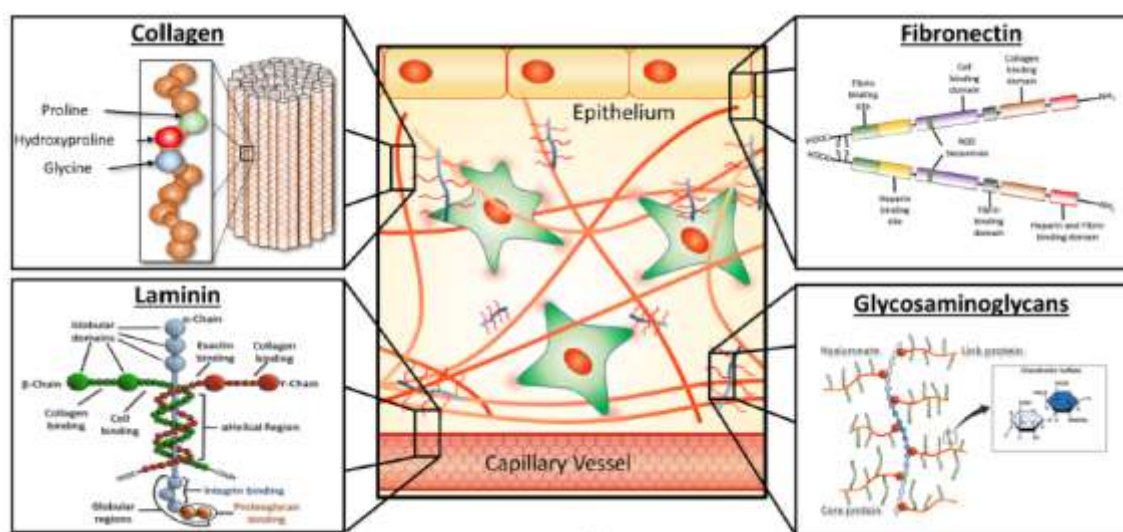


Figura 2. Composição da matriz extracelular. Fonte: (LONDONO; BADYLAK, 2015)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de arcabouço cardíaco derivado de matriz extracelular (MEC) descelularizada com uso de dois agentes e com tempo de exposição reduzidos.

2.2 Objetivos específicos

- Testar novo método para descelularizar coração de ratos para formação de arcabouço acelular;
- Testar a eficácia no processo de descelularização com uso de apenas dois agentes;
- Verificar a presença/ausência de material celular residual;
- Avaliar a composição da MEC;
- Quantificar DNA residual da MEC.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados quatorze(14) ratos Wistar, machos, com idade de dois meses pesando em média 330g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde – UFES. Os mesmos receberam água e ração livremente, tendo ciclo 12 horas claro/escuro e a temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) controlados.

Os animais foram divididos em dois grupos: sete animais para grupo controle e sete para o grupo descelularizado. Sendo um coração de cada grupo destinado à análise de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura, três corações de cada grupo para análise de microscopia óptica (histologia convencional e imunohistoquímica) e três corações de cada grupo para quantificação de DNA. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA- UFES) sob número 033/2014.

3.2 Sacrifício dos animais

Para etapa de descelularização os animais foram pesados e 15 minutos antes do sacrifício foram heparinizados com 10 unidades de Heparina sódica (Hepamax-s, Blausiegel) em seguida receberam sobredose de solução anestésica contendo Ketamina (Quetamina®, Vetnil) 90mg/Kg e Xilazina (Rompun®, Bayer) 10 mg/Kg via intraperitoneal. Cada animal foi colocado em decúbito dorsal, para retirada dos pêlos da porção torácica e, logo após foi pinçado o osso externo e abaixo desse fez-se uma incisão e corte em direção aos membros dianteiros. O coração foi exposto e com auxílio das mãos e com uma tesoura pequena, retirou-se o órgão do animal. Junto com o coração podem ir associados outros órgãos como pulmão. Após a limpeza da gordura e órgãos que vieram associados, a aorta foi exposta e o coração pesado.

3.3 Descelularização

Com auxílio de duas pinças ponta fina a aorta foi aberta e fixada com uma agulha (070x25) sem ponta e adaptada ao sistema de perfusão. Com auxílio de uma bomba peristáltica (Gilson®) o órgão foi perfundido com tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,3, para retirar o excesso de sangue, durante 15 minutos. O primeiro detergente SDS 1% foi perfundido por 8 horas, seguido por 15 minutos de lavagem com água destilada para perfusão do segundo detergente Triton-X-100 1% por 30 minutos. Por último foi feita uma perfusão com água destilada em média de 40 minutos. Após o processo o órgão foi pesado novamente e colocado nos respectivos fixadores. Fotos foram obtidas durante todo o processamento.

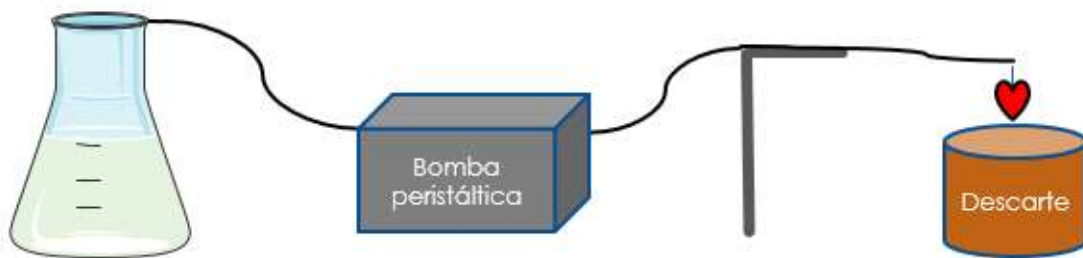


Figura 3. Esquema de um sistema de perfusão. No erlenmeyer a solução a ser perfundida passa através de cânulas através de uma bomba peristáltica até a agulha onde o órgão está inserido.

3.4 Processamento Histológico

As amostras após descelularização foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS, por no mínimo 48 horas. Posteriormente colocadas em cassetes histológicos e identificadas. As amostras controles foram colocadas em um processador automático de tecidos (LUPE®, Brasil - PT05), passando por baterias de desidratação em álcoois 70% por 12h, 80%, 90%, 100% (3 repetições) e álcool – xilol (1:1), diafanização em Xilol (3 repetições e inclusão em parafina, todos por uma hora de processamento. Para as amostras descelularizadas todo o processamento

foi feito manualmente e com tempos reduzidos para 20 minutos. O emblocamento foi feito em moldes de alumínio e os blocos foram armazenados em freezer (a -20°C) até o momento da microtomia. Foram feitos cortes histológicos em $5\ \mu\text{m}$ de espessura para histologia convencional e em $3\ \mu\text{m}$ para imunohistoquímica em micrótomo manual (LeicaBiosystems) e colocadas em lâminas comuns para coloração Hematoxilina & Eosina e Picrosírius e em lâminas silanizadas (Graulab®) para imunohistoquímica.

3.5 Coloração Hematoxilina & Eosina (H&E) e Picrosírius

A coloração iniciou-se com uma bateria de desparafinização com xilol (3 repetições), álcool - xilol (1:1), álcool para análise (PA) (3 repetições), todos com tempo de 5 minutos de processamento. Seguiu-se com uma lavagem com água corrente por 10 minutos e logo após, 10 minutos na hematoxilina, as lâminas passaram pela diferenciação com álcool- ácido por poucos segundos, e lavagem novamente em água corrente por 10 minutos. Logo em seguida passagem por eosina por 2 minutos, seguida de lavagem com água e passagens por álcool para análise (PA) (3 repetições), álcool- xilol, e xilol (3 repetições) com tempo de 5 minutos para cada. Para coloração com picrosírius após a primeira lavagem com água as lâminas foram colocadas em picrosírius por uma hora seguindo com lavagem com água para retirar o excesso, as demais etapas foram semelhantes da H&E. A montagem das lâminas foi feita em meio não aquoso utilizando DPX [p-xylene-bis (N-pyridinium bromide)] (Sigma-Aldrich).

As imagens foram capturadas utilizando um fotomicroscópio (Olympus® AX70) acoplado a uma câmera digital (Axiocam Erc5s, Zeiss®) utilizando magnificação de 200 vezes.

3.6 Imunohistoquímica (IHQ)

Para desparafinização as lâminas foram inicialmente banhadas com 3 banhos de xilol, sendo o primeiro de 20 min e os demais banhos de 15 min. Seguiu-se com 3 banhos com concentrações decrescentes etanol (100%, 90% e 70%) e 2 banhos com água destilada por 5 min, 2 banhos de 15 min em solução de bórax 3% em PBS, 1 banho de 5 min em PBS, 2 banhos de 15 min em PBS Triton X-100 0,5% pH 7,3 e lavagem com 2 banhos de 5 min com água destilada. Para inibição da peroxidase endógena 1 banho de 15 min em peróxido de hidrogênio 3% em metanol foi realizado ao abrigo da luz seguido de 2 banhos em água destilada por 5 minutos. Para a etapa de recuperação antigênica o tampão citrato pH 6,0 (Spring Bioscience® Germany) foi colocado em um recipiente juntamente com as lâminas e mantidas em banho-maria até atingir 96°C, a partir desse momento foram deixadas por 30 min e após esse tempo o recipiente foi retirado e deixado esfriar até atingir a temperatura ambiente e seguiu-se com uma lavagem em PBS por 5 min. Na etapa de bloqueio, primeiro as lâminas foram cobertas com solução de PBS-BSA 10% + gelatina 0,01% + tween 0,05% + triton X-100 0,1%:PBS + extrato de fígado de rato (v/v) por 30 min seguida de lavagem com PBS 1 banho de 5 min, seguiu-se incubação em câmara úmida com PBS-BSA 10% + gelatina 0,01% + tween 0,05% + triton X-100 0,1%:PBS + 10% soro de cabra (v/v) novamente por mais 30 min.

Os anticorpos primários Anti-Laminin (AB11575, Abcam®) e Anti-Fibronectin (AB2413, Abcam®) foram diluídos na diluição 1:100 em PBS-BSA 3% + gelatina 0,01% + tween 0,05% + triton X-100 0,1%:PBS + 1% de soro de cabra e foram incubados em câmara úmida à - 4°C overnight. Passado o tempo de incubação as lâminas foram retiradas da geladeira e deixadas até atingir a temperatura ambiente. Para lavagem foram feitos 2 banhos em PBS Tween 0,25% pH 7,3 por 5 min cada banho em seguida incubadas em câmara úmida com anticorpo secundário conjugado ao polímero HRP (Nichieri) por 1 hora e lavadas com um banho de PBS Tween 0,25% pH 7,3 por 5 min.

Para visualizar a reação, foi utilizado o substrato-cromógeno diaminobenzidina (DAB, Spring Bioscience®) diluído conforme fabricante e incubado por 15 minutos, seguido de uma lavagem em PBS Tween 0,25% pH 7,3 por 5 min e dois banhos em água destilada. Para melhor visualização foi feita contra-coloração com

Hematoxilina durante 30 segundos, seguida de lavagem em água corrente por 5 min, e então as lâminas foram mergulhadas em solução de água amoniacal 10% por 10 segundos e lavadas com água destilada por 5 min.

Para finalizar as lâminas passaram por uma bateria de desidratação em 4 banhos de etanol em concentrações crescentes (70% 90%, 100% e 100%) por 10 min cada banho seguido de uma etapa de clarificação com 3 banhos de 10 min em xilol P.A. E a montagem das lâminas foi realizada em meio não-aquoso DPX (Sigma-Aldrich). As imagens foram capturadas utilizando um fotomicroscópio (Olympus® AX70) acoplado a uma câmera digital (Axiocam Erc5s, Zeiss®) na magnificação de 200 vezes.

3.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para as análises de MET, as amostras foram fixadas logo após descélularização, em solução de glutaraldeído 2,5% + formaldeído 2% + tampão cacodilato 0,1M (ou Karnovsky) por no mínimo 24 horas. Para o processamento as amostras foram lavadas com tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2 – 7,4) (3 banhos de 30 minutos) e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em cacodilato adicionado de ferrocianeto de potássio 1,25%, por uma hora em câmara escura à temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas novamente com tampão cacodilato 0,1M (1 banho de 30 minutos) e com água destilada (2 banhos de 30 minutos) e prosseguiu-se a bateria de desidratação em acetona a temperatura ambiente 30%, 50% (30 minutos), 70% overnight (geladeira), 90% (30 minutos) e 100% (3 banhos de 30 minutos).

Para etapa de infiltração as amostras foram primeiramente mantidas em acetona + epon na proporção 2:1 por 6 horas, então foi trocada por acetona + epon (1:1) “overnight” e acetona + epon (1:2) por 6 horas. Para inclusão as amostras foram mantidas em epon puro overnight e então emblocadas em forminhas de silicone apropriadas e mantidas em estufa 60°C por 48 – 72 horas. Cortes ultrafinos de 70 nm foram feitos em ultramicrótomo (RMC Products) e foram contrastados com

acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 0,4%. As amostras foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão a 80KV (JEOL, JEM-1400, USA, Inc.).

3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para MEV até o momento da desidratação as etapas anteriores são idênticas as utilizadas em MET, podendo ser dispensada a pós- fixação com tetróxido de ósmio. As amostras foram desidratadas em banhos de etanol 30%, 50% (30 minutos), 70% *overnight* (geladeira), 90% (30 minutos) e 100% (3 banhos de 30 minutos) seguida por secagem pelo ponto crítico. As amostras foram colocadas em *stubs* e evaporado ouro nas mesmas. Imagens foram obtidas através de microscópio JEOL JSM-6610LV.

Para amostra do grupo descelularizado após fixada foi lavada com tampão cacodilato 0,1M (3 banhos de 30 minutos). Para que as amostras fossem impregnadas homoganeamente, a um pequeno volume de tampão cacodilato 0,1M foi adicionado lentamente e sempre com agitação, o crioprotetor glicerol a 30%, de forma que no final de 30 minutos o volume inicial dobrou, ou seja a concentração de glicerol passou a ser 15%. Após esse tempo o glicerol 15% foi removido e então adicionado glicerol 30% que permaneceu até o dia seguinte. Foi retirada toda a solução de glicerol e as amostras foram cortadas em pedaços de aproximadamente 2mm e congeladas em freezer -80°C, permaneceram nessa temperatura por no mínimo três horas. Após esse tempo, com auxílio de duas pinças previamente resfriadas no freezer, a amostra foi quebrada em dois pedaços menores de forma rápida para evitar o descongelamento da mesma. As etapas seguintes até o momento da obtenção das imagens são as mesmas utilizadas no órgão controle.

3.9 Análise quantitativa de DNA

Os corações foram cortados em pequenos pedaços e as amostras passaram por inclusão em etanol 30%, 50%, 70%, 90% e três banhos etanol 100%, com tempos de 15 min cada banho e então levadas para ponto crítico, após o ciclo completo do ponto crítico o peso seco foi obtido. As amostras foram colocadas em tubos cônicos de 1,5mL, foram adicionados 180 µL de tampão ATL e 20 µL de proteinase K e vortexados. Os tubos foram incubados em banho maria a 56°C overnight para completa lise do tecido. Seguiu-se com adição de 200 µL de tampão AL e foram vortexados e incubados a 56°C por 10 min. 200 µL de etanol 100% foi acrescentado e vortexados novamente. A mistura foi pipetada em uma coluna mini spin do próprio kit DNeasy (Qiagen, Germany) e coletada em tubos de 2mL, foi então centrifugada a 6000 X g por 1 min. O líquido do tubo foi descartado e inserido novo tubo de 2mL para então acrescentar 500 µL do tampão AW1 na coluna e centrifugar a 6000 X g por 1 min. Novamente o líquido restante foi descartado e um novo tubo inserido. 500 µL do tampão AW2 foi adicionado a coluna e centrifugado por 3 min a 20000 X g. A mini coluna foi transferida para um tubo cônico e o DNA foi eluído por adição de 200 µL de tampão AE ao centro da coluna e incubado a temperatura ambiente por 1 min, então foi centrifugado por 1 min a 6000 x g. As amostras foram analisadas e os quantificação de DNA residual foram feitas por nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) o gráfico da diferença estatística entre os grupos foi obtida por software GraphPad Prism 6.0.1.

3.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism Versão 6.0.1 (GraphPad Software; San Diego, Califórnia, EUA, Versão Trial). As amostras entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, utilizando teste t de Student.

4 RESULTADOS

4.1 Descelularização

Após cerca de uma hora do início da perfusão com SDS, observamos a mudança de cor no órgão, e ao final da descelularização o coração já translúcido indica a perda de material celular (Figura 4), como confirmado posteriormente por histologia.

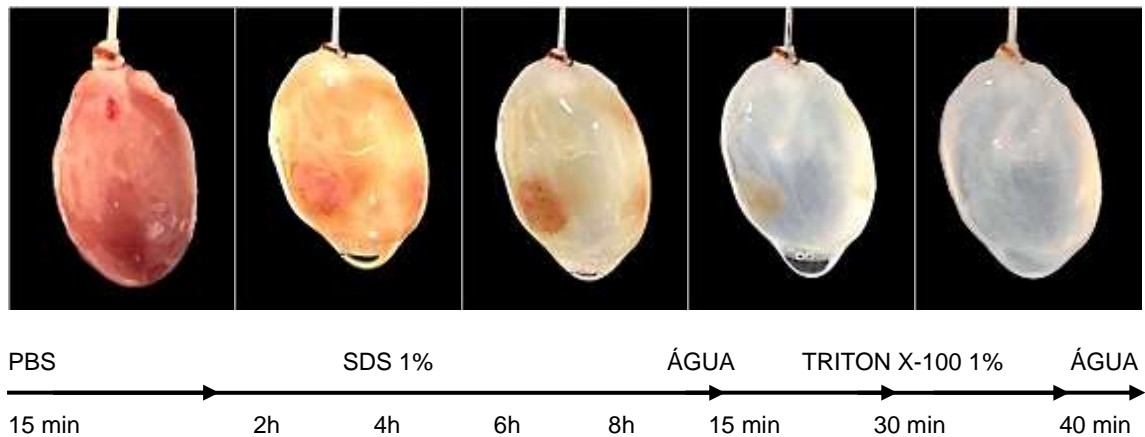


Figura 4. Imagens macroscópicas do processo de descelularização de coração de rato.

4.2 Análise histológica

4.2.1 Coloração com H&E

As amostras do grupo controle mostram a presença dos núcleos das células, como demonstrado na figura 5 (A, B e C) enquanto que as amostras do grupo descelularizado, como já esperado após o tratamento com detergentes, demonstrou ausência de material nuclear visível figura 5 (D, E e F).

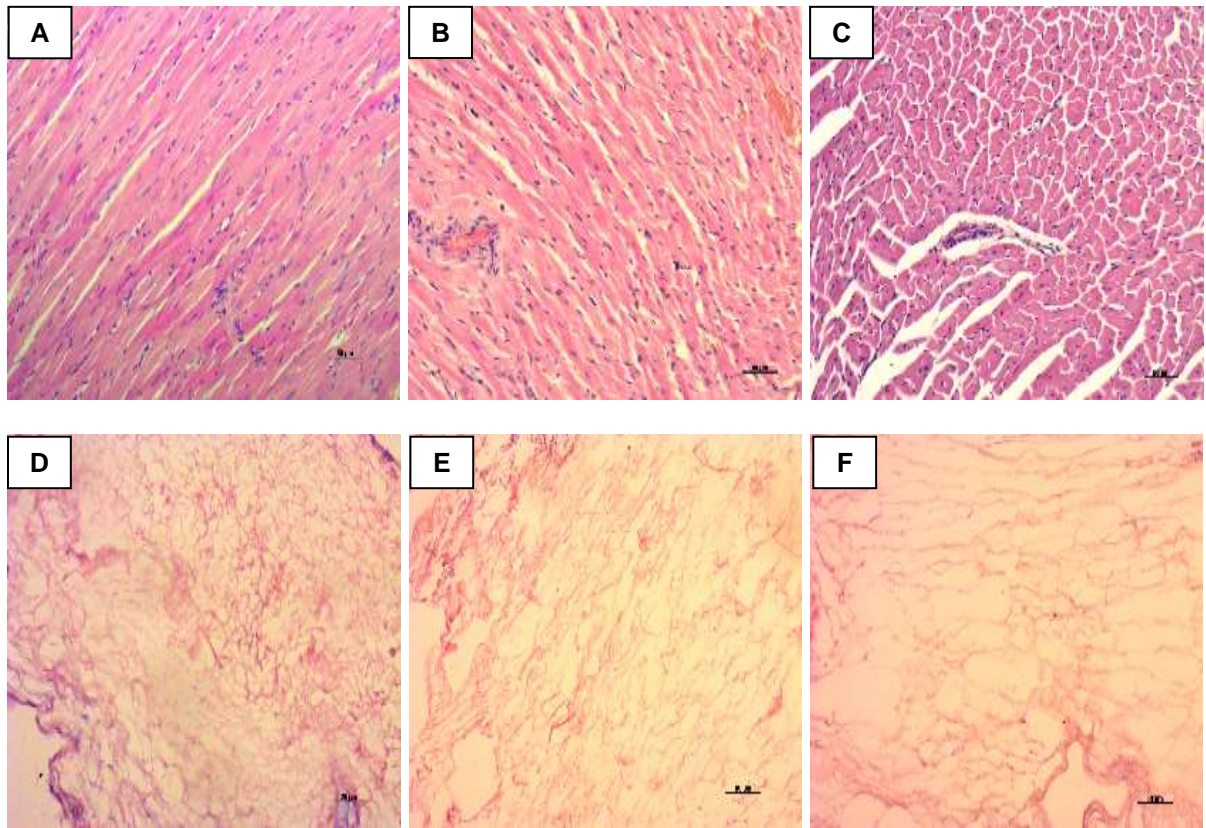


Figura 5. Imagens de microscopia óptica dos grupos controle (A, B e C) e descelularizado (D, E e F). Coloração H&E. Barra de escala: 50 µm.

4.2.2 Coloração com Picrosírius

A coloração com picrosírius marca em vermelho o colágeno e em amarelo o tecido restante. Na figura 6 (A, B e C) observa-se a presença do colágeno no tecido, enquanto que na figura 6 (D, E e F) mesmo após o processo de descelularização o colágeno, um importante componente da MEC, permaneceu no arcabouço além de não haver nenhuma marcação em amarelo demonstrando a ausência das células.

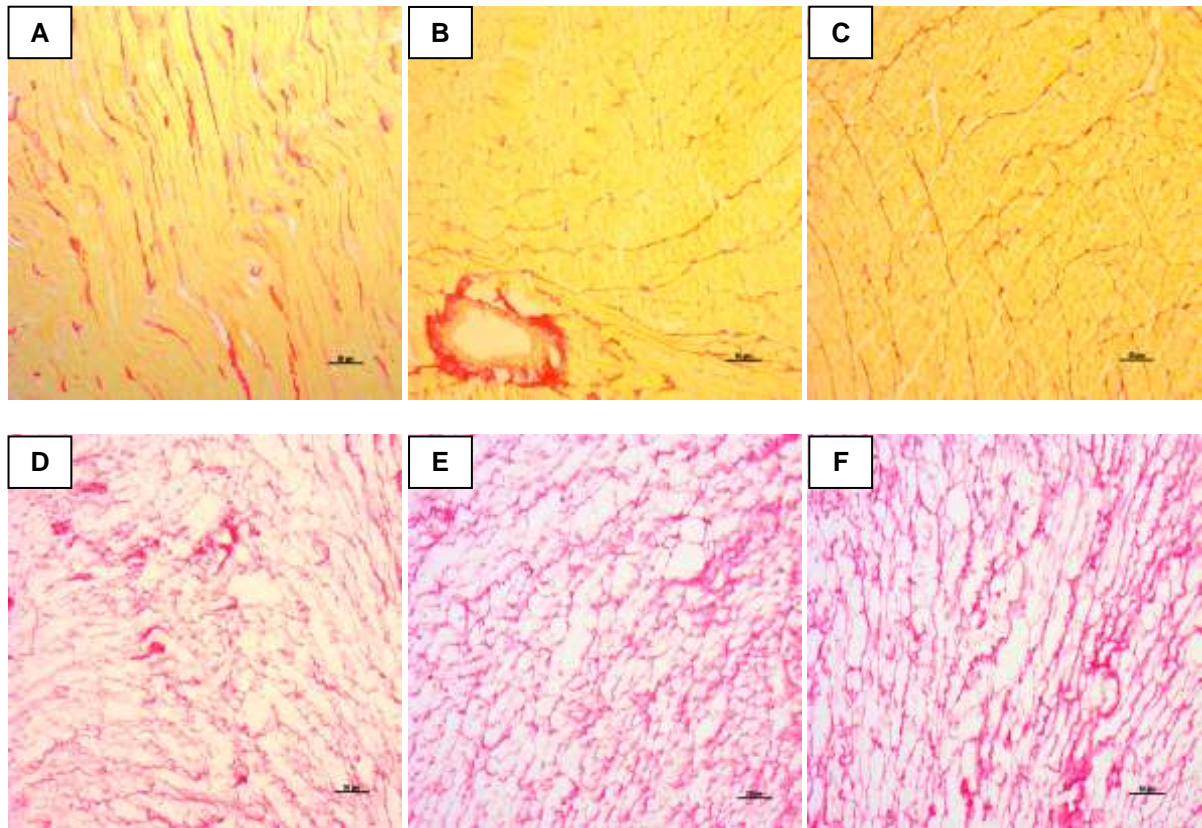


Figura 6. Imagens de microscopia óptica dos grupos controle (A, B e C) e descelularizado (D, E e F). Coloração com picosírius. Barra de escala: 50 μm .

4.2.3 Imunohistoquímica

Imagens de marcação com anticorpos anti fibronectina e anti laminina, mostram a manutenção desses componentes da MEC após o processo de descelularização (Figura 7).

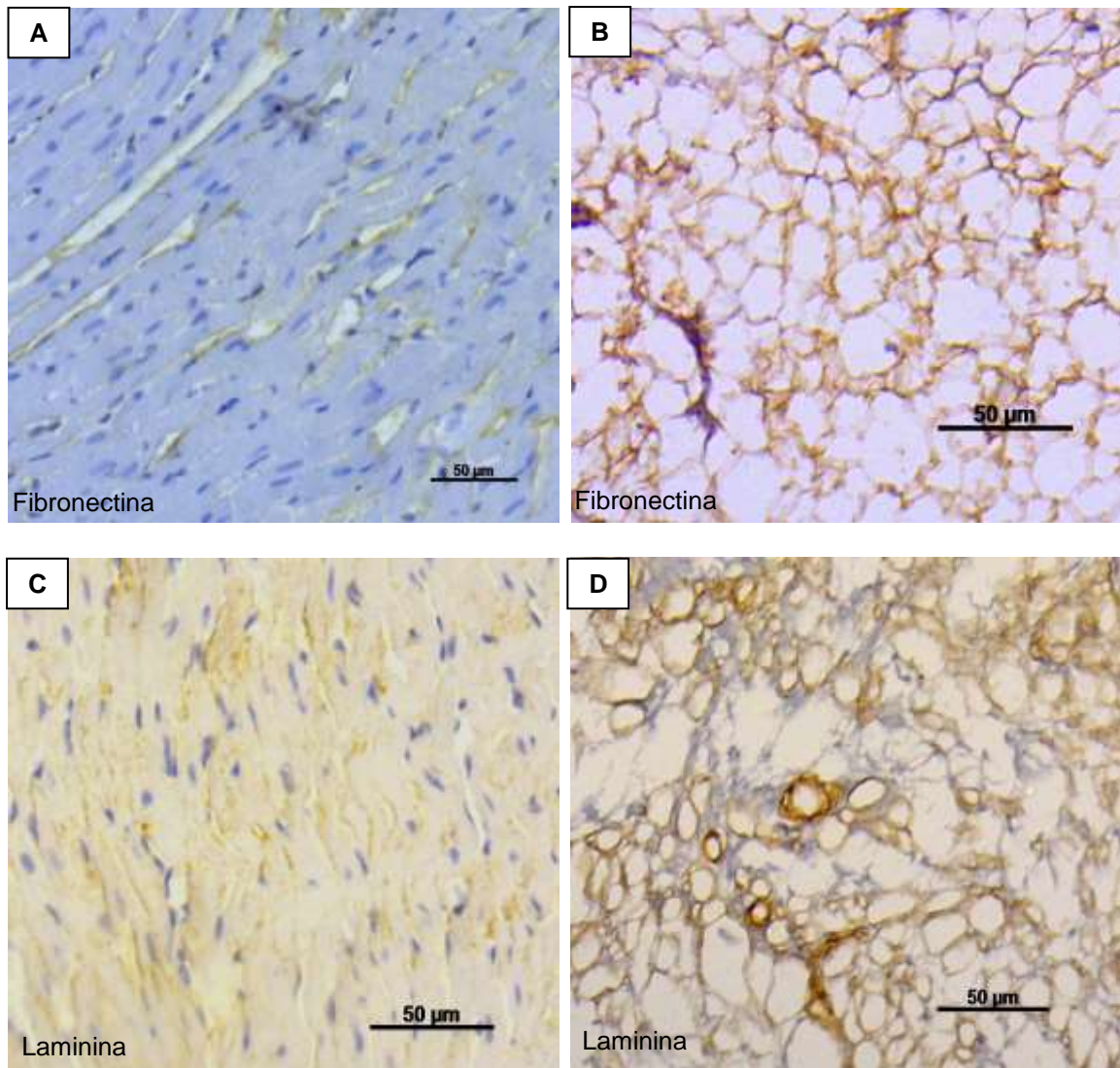


Figura 7. Figuras A e C são amostras do grupo controle, Figuras B e D amostras do grupo descelularizado, em marrom mostra a marcação com anticorpos anti laminina e anti fibronectina.

4.3 Microscopia eletrônica de transmissão

As imagens de MET mostram a presença das unidades contráteis (sarcômeros) e mitocôndrias no coração controle (Figura 8 A,B e C). No coração descelularizado a presença de fibras colágenas e a ausência de organelas citoplasmáticas confirmam a eficácia do processo no que se refere à retirada de células (Figura 8 D, E e F).

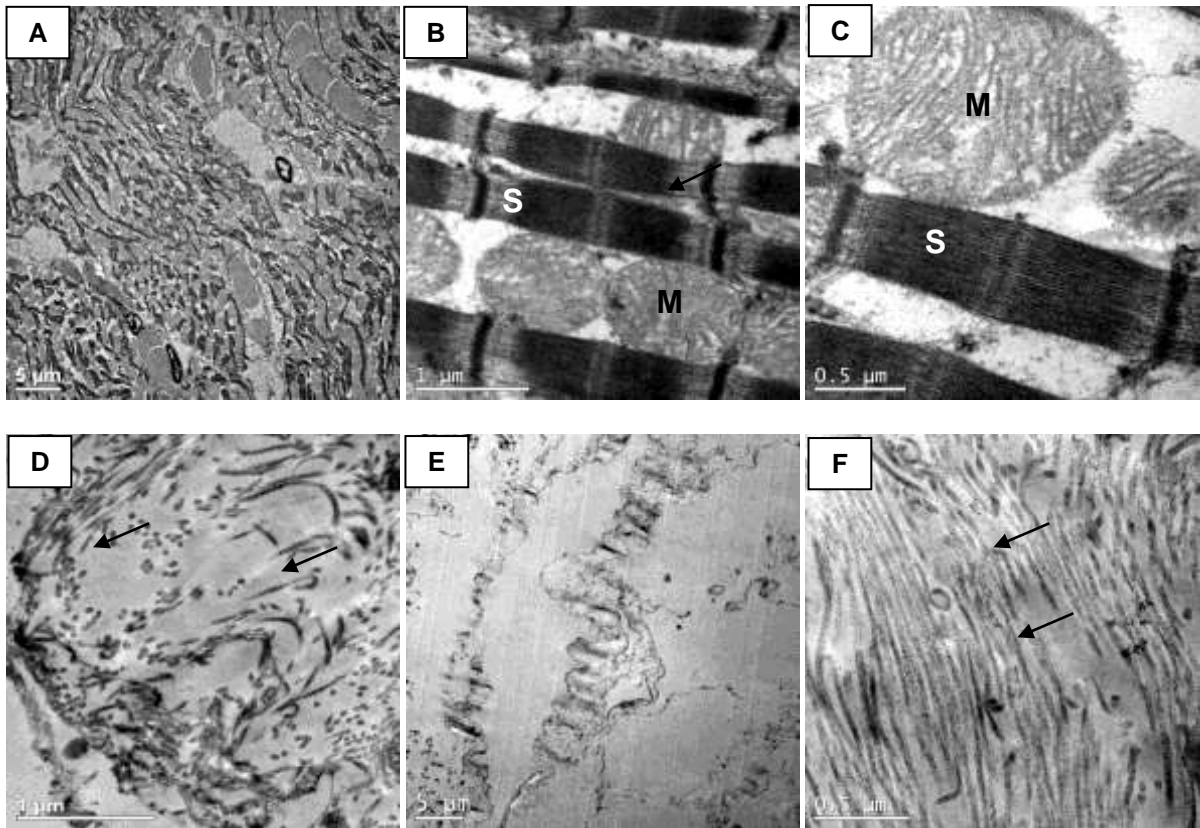


Figura 8. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Imagens A,B e C mostrando a presença de mitocôndrias e sarcômero. Imagem D, E e F setas mostram a presença de fibras colágenas. M = mitocôndria; S = sarcômero.

4.4 Microscopia eletrônica de varredura

Imagens de microscopia de varredura demonstram a disposição de forma desorganizada das fibras no arcabouço por não conter mais células (Figura 9: B e D) em comparação com a organização das mesmas no órgão controle (Figura 9: A e C).

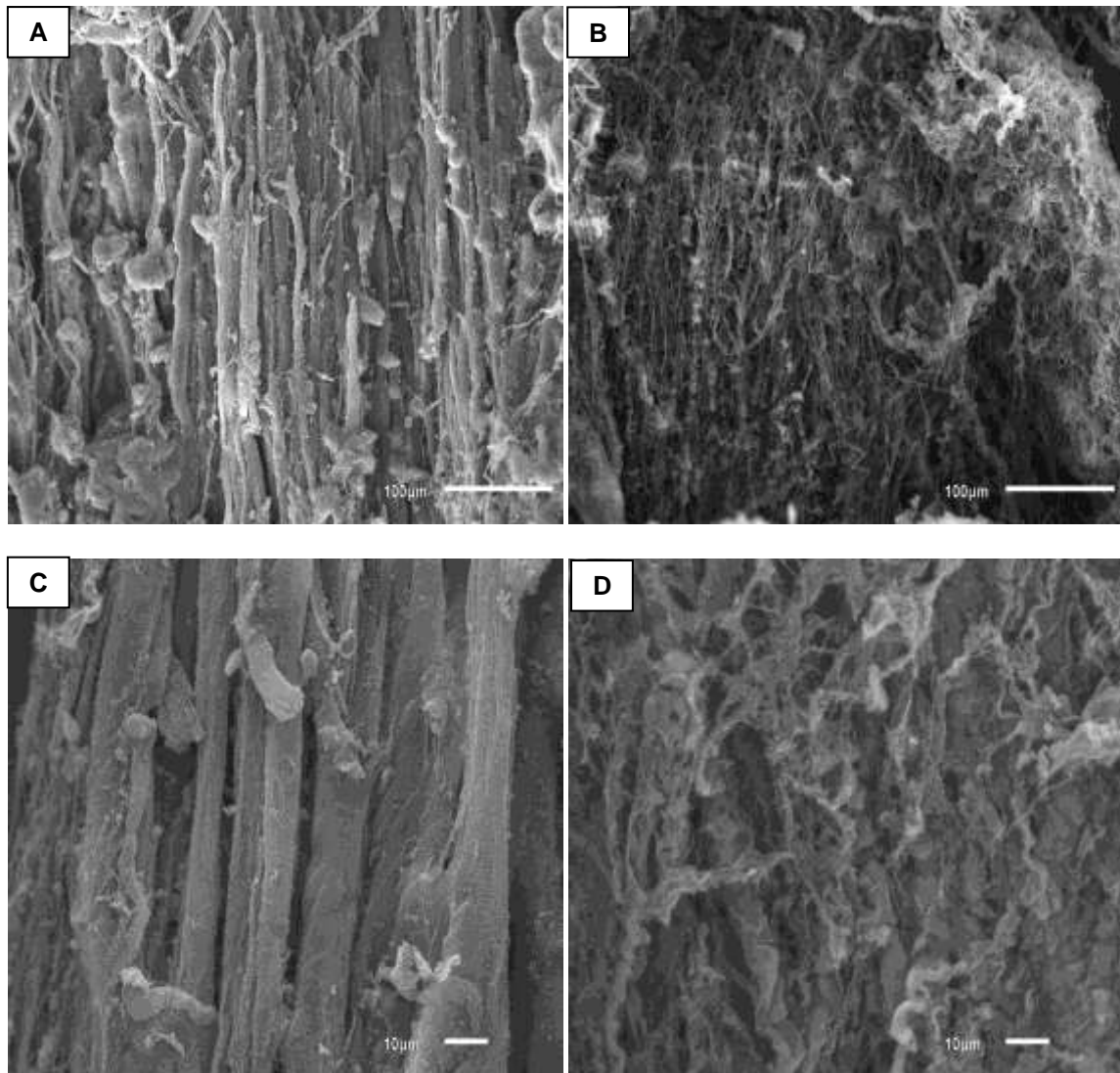


Figura 9. Imagens de microscopia eletrônica de varredura. Imagem A e C mostrando a organização das células cardíacas e das fibras da matriz extracelular, enquanto que na imagem B e D as fibras da matriz se mostram retraídas no arcabouço acelular. no arcabouço acelular.

4.5 Análise quantitativa de DNA

A figura 10 podemos observar que as amostras do grupo controle obtiveram uma média de 432,64 ng/mg de tecido enquanto que após a descélularização os valores encontrados foram para 56,06 ng/MG, tendo, portanto, uma redução de 87,04% entre os dois grupos ($p = 0,0002$).

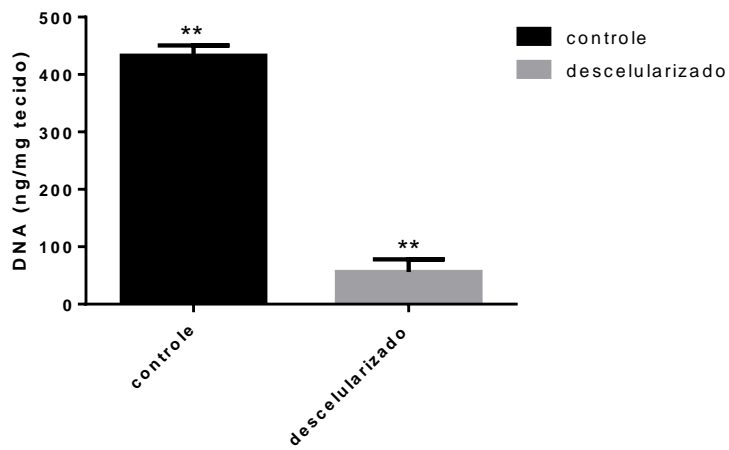


Figura 10. Concentração de DNA em ng por mg de matriz dos grupos controle (n=3) e descelularizado (n=3). Os dados estão expressos como média \pm EPM; (**p< 0,001, teste t de Student).

5 DISCUSSÃO

Estima-se que 17,5 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares no mundo no ano de 2012, o que representa 31% do total de mortes, tornando-se a principal causa de mortalidade (OMS, 2015). Mais de 50% dos pacientes com essas doenças não respondem as atuais terapias farmacológicas, e muitos desses necessitam de transplantes do coração. Estratégias específicas para esses tipos de pacientes estão sendo estudadas, como por exemplo, a descelularização de órgãos (LU et al., 2013).

Ao longo de 20 anos a terapia com células com capacidade regenerativa tem sido usada para regenerar o coração. Estudos clínicos confirmam o benefício da injeção de células. Novos procedimentos que envolvem não apenas a injeção de células com capacidade regenerativa, mas incluem fatores de crescimento, matrizes biológicas e polímeros sintéticos, tem sido utilizados é o que chamamos de bioengenharia tecidual (GÁLVEZ-MONTÓN et al., 2013).

O músculo cardíaco tem uma capacidade limitada para se regenerar. A bioengenharia tecidual surgiu como uma promessa de criar órgãos personalizados além de substituir os atuais suportes sintéticos que causam grande problema de rejeição imunológica (JALILI-FIROOZINEZHAD et al., 2016; LONDONO; BADYLAK, 2015). Utilizando diversos métodos químicos, físicos e biológicos, biomateriais compostos de MEC são formados servindo como plataforma natural para fixação, proliferação, maturação e eventual regeneração do órgão alvo (JALILI-FIROOZINEZHAD et al., 2016).

Para esse estudo foi escolhido como modelo ratos machos Wistar, onde foi retirado os corações e canulado a aorta ascendente para perfusão de todo o órgão de acordo com o protocolo modificado de Doris A Taylor, onde naquele estudo o coração foi perfundido por 12 horas com SDS (OTT et al., 2008). No presente estudo foi verificado que a perfusão por 8 horas com SDS somado a 30 minutos de Triton X-100, foi suficiente para retirada das células, visto que quanto maior o tempo de exposição ao agente maiores as chances de perda de componentes da MEC resultando em mudanças nas características estruturais (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; YE et al., 2016).

Ao final de uma descelularização o órgão deve estar translúcido demonstrando a perda de material celular, porém deve ser confirmado através de outros parâmetros (REMLINGER; WEARDEN; GILBERT, 2012). Como demonstramos neste estudo ao longo de todo o processo de descelularização foram tiradas fotos que demonstraram ao final o coração sem material celular o que foi confirmado por análise microscópica.

De acordo com KHORRAMIROUZ et al. (2014) através de colocação com H&E e DAPI métodos que utilizaram apenas detergentes para descelularização demonstraram ser mais efetivos em retirada de células e na preservação do colágeno, do que aqueles que utilizaram detergentes com associação de EDTA ou enzima (KHORRAMIROUZ et al., 2014). Em nosso estudo foi observado a eficiência da metodologia na retirada de células com uso de dois detergentes.

Para analisar os principais componentes da MEC, AKHYARI et al (2011) demonstraram através de análise imunohistoquímica detecção de laminina e colágeno por todo o órgão descelularizado como encontrado no coração nativo para todos os protocolos testados, porém quando feito análise quantitativa observaram a redução desses mesmos componentes (AKHYARI et al., 2011). Assim como observado também por GUYETTE et al. (2016) através da marcação com anticorpos para laminina, fibronectina e colágeno mostrou a manutenção dos componentes após o processo (AKHYARI et al., 2011; GUYETTE et al., 2016). Neste estudo observamos que o colágeno foi bem preservado após descelularização, apesar de que nos órgãos descelularizados a ausência de células torna a distribuição mais desorganizada no arcabouço.

O colágeno é o componente mais abundante na MEC, é uma proteína estrutural essencial e está presente em todos os tecidos e órgãos (AAMODT; GRAINGER, 2016; GILLIES et al., 2011; JOHNSON et al., 2016). Devido a sua importância YASUI et al. (2014), demonstraram que o colágeno foi bem preservado após descelularização demonstrado por microscopia eletrônica de transmissão e outras técnicas (YASUI et al., 2014). Como identificado por MET neste estudo no coração descelularizado observou-se ausência de unidades contráteis e a presença intensa de fibras colágenas.

Na análise de MEV foi demonstrada alteração na microestrutura. Assim como observado por SYEDAIN et al. (2013) cavidades onde antes estavam as células são encontradas no órgão descelularizado, certa alteração na microestrutura foi também observada, porém pode ser devido a retração da amostra durante o preparo para a análise, do que de fato uma alteração microestrutural (SYEDAIN et al., 2013).

Estudos por CRAPO; GILBERT; BADYLAK (2011); LONDONO; BADYLAK (2015) e corroborado por HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY (2013) relatam que a quantidade de DNA em um órgão descelularizado não deve ser superior a 50ng por mg de peso seco de matriz extracelular. Observamos neste estudo uma redução significativa de conteúdo de DNA de em média 432,64 ng/mg de peso seco de tecido nos órgãos controles para 56,06 ng/mg de peso seco de tecido descelularizado, uma redução de 87,04% comparando os dois grupos, valores muito próximos ao indicado por CRAPO e colaboradores.(CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013; LONDONO; BADYLAK, 2015).

6 CONCLUSÃO

O grande número de mortes por doenças cardiovasculares demonstram a importância do estudo de novas técnicas que auxiliarão na redução desses valores. Os achados neste estudo demonstraram que a utilização de detergentes, assim como encontrado na literatura, são melhores agentes para descelularização e mesmo com a redução do tempo de exposição ao SDS e com uso de apenas dois agentes de descelularização o processo se manteve eficaz na retirada de células e na preservação dos componentes da MEC: colágeno, laminina e fibronectina.

Uma retração da microestrutura foi visualizada no órgão descelularizado onde somente observamos fibras preenchendo os espaços antes ocupados por células e o processo também demonstrou uma redução significativa de DNA residual; podendo ser possível a utilização do arcabouço gerado para recelularização.

7 REFERÊNCIAS

- AAMODT, J. M.; GRAINGER, D. W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. **Biomaterials**, v. 86, p. 68–82, 2016.
- AKHYARI, P. AND A. H. et al. whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. **Idots Engineering Part C: Idots**, v. 17, n. 9, p. 915–926, 2011.
- ARENAS-HERRERA, J. E. AND K. I. K. AND A. A AND Y. J. J. et al. Decellularization for whole organ bioengineering. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 8, n. 1, p. 14106, fev. 2013.
- BACAL, F. et al. II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, p. e16–e73, 2009.
- CASTELLETTI, F. et al. Mutations in FN1 cause glomerulopathy with fibronectin deposits. **PNAS**, v. 105, n. 7, 2008.
- CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–43, 2011.
- FU, R. H. et al. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. **Cell Transplantation**, v. 23, n. 4-5, p. 621–630, 2014.
- FUNAKOSHI, S. et al. Enhanced engraftment , proliferation , and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. **Nature Publishing Group**, n. January, p. 1–14, 2016.
- GÁLVEZ-MONTÓN, C. et al. Cardiac tissue engineering and the bioartificial heart. **Revista española de cardiología**, v. 66, n. 5, p. 391–9, 2013.
- GILBERT, T. W. AND S. T. L. AND B. S. F.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675–3683, jul. 2006.
- GILLIES, A. R. et al. Method for decellularizing skeletal muscle without detergents or proteolytic enzymes. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 17, n. 4, p. 383–389, 2011.
- GRAUSS, R. W. et al. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves : matrix changes due to different decellularisation methods *. **European journal of cardio-thoracic surgery**, v. 27, p. 566–571, 2005.
- GUYETTE, J. P. et al. Perfusion decellularization of whole organs. **Nature Protocols**, v. 9, n. 6, p. 1451–1468, 2014.
- GUYETTE, J. P. et al. Bioengineering Human Myocardium on. **Circulation Research**, p. 56–72, 2016.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11^a. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- HOGAHOGAN, M.; MOHAMED, M.; TAO, Z. Thoughts and Progress. **Artificial Organs**, v. 39, n. 2, p. 165–197, 2015.
- HREBIKOVA, H. AND D. D. AND M. J.; DIAZ, D.; MOKRY, J. Chemical

decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia**, 18 out. 2013.

JALILI-FIROOZINEZHAD, S. et al. Influence of decellularized pericardium matrix on the behavior of cardiac progenitors. **Journal of Applied Polymer science**, v. 43255, p. 1–9, 2016.

JOHNSON, T. D. et al. Quantification of decellularized human myocardial matrix : A comparison of six patients. **Proteomics Clinical Applications**, v. 10, p. 75–83, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

KHORRAMIROUZ, R. et al. Effect of three decellularisation protocols on the mechanical behaviour and structural properties of sheep aortic valve conduits. **Advances in Medical Sciences**, v. 59, n. 2, p. 299–307, 2014.

LOCKHART, M. et al. Extracellular Matrix and Heart Development. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 91, n. 6, p. 535–550, 2011.

LONDONO, R.; BADYLAK, S. F. Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In vivo Remodeling. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, n. 3, p. 577–592, 2015.

LU, T.-Y. et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. **Nature Communications**, v. 4, 2013.

Ministério da Saúde - Número de óbitos para doenças do aparelho circulatório. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c08.def>> Acesso em: 30 janeiro, 2015.

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.

NAKAYAMA, K. H. et al. Decellularized Rhesus Monkey Kidney as a Three-Dimensional Scaffold for Renal Tissue Engineering. **TISSUE ENGINEERING: Part A**, v. 16, n. 7, 2010.

OTT, H. C. et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 8, p. 927–933, 2010.

OTT, H. C. AND M. T. S. AND G. S.-K. AND B. L. D. AND K. S. M. AND N. T. I. AND T. D. A et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. **Nature medicine**, v. 14, n. 2, p. 213–221, fev. 2008.

PAN, M. X. et al. An efficient method for decellularization of the rat liver. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 113, n. 10, p. 680–687, 2014.

REMLINGER, N. T.; WEARDEN, P. D.; GILBERT, T. W. Procedure for Decellularization of Porcine Heart by Retrograde Coronary Perfusion. **Journal of Visualized Experiments**, n. 70, p. 1–8, 2012.

SEDDON, A. M.; CURNOW, P.; BOOTH, P. J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** -

Biomembranes, v. 1666, n. 1-2, p. 105–117, 2004.

SEVILLA, C. A. et al. Extracellular Matrix Fibronectin Stimulates the Self-Assembly of Microtissues on Native Collagen Gels. **TISSUE ENGINEERING: Part A**, v. 16, n. 12, 2010.

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.

SULLIVAN, K. E. et al. Extracellular matrix remodeling following myocardial infarction influences the therapeutic potential of mesenchymal stem cells. **Stem cell research & therapy**, v. 5, n. 1, p. 14, 2014.

SYEDAIN, Z. H. et al. Decellularized tissue-engineered heart valve leaflets with recellularization potential. **Tissue engineering. Part A**, v. 19, n. 5-6, p. 759–69, 2013.

WHO. Cardiovascular diseases (CVDs). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>> Acesso em: 25 outubro, 2015.

WHO. The top 10 causes of death. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>> Acesso em: 25 outubro, 2015.

YASUI, H. et al. Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. **Biomaterials**, v. 35, n. 27, p. 7839–7850, 2014.

YE, X. et al. Impact of decellularization on porcine myocardium as scaffold for tissue engineered heart tissue. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 4, p. 1–8, 2016.