Rev. Méd. Paraná, Curitiba.
2021; 79(Supl. 1): 5-7 DOI: 10.55684/79.2.1633 (disponível em 06/2022)

Artigo Original

DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE EXPERIMENTAL DE TÉCNICAS DE DESCELULARIZAÇÃO EM ARTÉRIA DE COELHO COMO ENXERTO BIOLÓGICO: ESTUDO PILOTO

DEVELOPMENT AND EXPERIMENTAL ANALYSIS OF DECELULLARIZATION TECHNIQUES IN RABBIT ARTERY AS A BIOLOGICAL GRAFT: PILOT STUDY

Fernanda Prehs **IZAR**[1], Douglas Mesadri **GEWEHR**[1,2], Cris Rangel de **ABREU**[2], Larissa de **ANDRADE**[1], Mariana Duarte Rangel **GARCIA**[1], Rebecca Skalski **COSTA**[1], Antonio Lacerda **SANTOS FILHO**[1], Carlos Hespanha **MARINHO JUNIOR**[1], Cristina Terumy **OKAMOTO**[1], Luiz Fernando **KUBRUSLY**[1,2]

REV. MÉD. PARANÁ/1633

Izar FP, Gewehr DM, Abreu CR, de Andrare L, Garcia MDR, Costa RS, Santos-Filho AL, Marinhos-Junior CH, Okamoto CT, Kubrusly LF. Desenvolvimento e análise experimental de técnicas de descelularização em artéria de coelho como enxerto biológico: estudo piloto. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2021;79(Supl. 1):5-7.

RESUMO –Doenças cardiovasculares são as causas mais comuns de óbitos no mundo. Técnicas de revascularização são utilizadas em casos avançados, porém frequentemente mostram complicações. Enxertos sintéticos, autólogos e heterólogos tradicionais, muitas vezes, não atendem às necessidades do paciente. O processo de descelularização representa uma via alternativa para enxertos heterólogos, sendo visado na engenharia de tecidos, devido à possibilidade de manter uma matriz orgânica bioativa e versátil, retirando apenas os agentes antigênicos. Este estudo teve o objetivo de desenvolver e validar, experimentalmente, protocolos de descelularização em vasos sanguíneos de animais e, posteriormente, avaliar o seu potencial de biocompatibilidade e recelularização in vivo. Foram extraídos segmentos arteriais da aorta torácica, aorta abdominal e carótidas comuns de coelho que foram submetidos a dois protocolos de descelularização: descelularização por método enzimático com tripsina 0,1% e pelo detergente aniônico Triton X-100 0,25%. Em conclusão, a descelularização permite a remoção de células antigênicas em enxertos vasculares, com capacidade de manter a integridade da estrutura do vaso.

DESCRITORES – Enxerto vascular. Enxerto biológico. Descelularização. Engenharia de tecidos.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são as causas mais comuns de óbitos em todo o mundo, com uma incidência de mortalidade anual prevista a aumentar para 23,3 milhões de indivíduos até 2030[2,6,8]. Elas levam à redução do fluxo sanguíneo e, consequentemente, nutrição insuficiente dos tecidos. As apresentações mais comuns envolvem doenças coronarianas, cerebrovasculares, doença arterial periférica e trombose venosa profunda[10].

O tratamento varia desde mudança de estilo de vida, com dietas e exercícios físicos, utilização de fármacos, até à necessidade de procedimentos cirúrgicos[10].

O desenvolvimento de procedimentos terapêuticos de revascularização continua sendo altamente relevante. Em casos complexos envolvendo doença aterosclerótica, tanto no miocárdio quanto doenças periféricas e o padrão-ouro tem sido o enxerto vascular[1]. As técnicas atuais de revascularização são a angioplastia, colocação de stent e o enxerto vascular[2]. Esses enxertos também são necessários para tratamento de doenças aneurismáticas, e, em alguns casos, até mesmo traumas[8].

A operação de enxerto vascular majoritariamente envolve a utilização de vasos autólogos, como a veia safena e a artéria torácica interna. No entanto, esses vasos exigem procedimentos altamente invasivos, gerando grande morbidade e muitas vezes acabam sendo inutilizáveis, mesmo sendo considerados o padrão-ouro para substituir vasos de pequeno diâmetro (menores de 6 mm). Cerca de 30% dos pacientes que necessitam de revascularização de membro inferior não possuem um vaso autólogo que seja adequado[2]. Ainda, 50% dos enxertos utilizando a veia safena acabam falhando no decorrer de 10 anos[10].

Como uma alternativa aos vasos autólogos, existem os enxertos sintéticos. Esses, por sua vez, têm mostrado resultados satisfatórios em longo prazo quando usados em artérias de diâmetro maior (acima de 8 mm). Entretanto, quando aplicados em artérias de pequeno diâmetro (inferior a 6 mm) apresentam limitações devido às baixas taxas de perviedade e associados à trombose como complicação[10]. Os mais utilizados são os de politereftalato de etileno, conhecido comercialmente por Dacron, politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) e o poliuretano (PU)[8].

Dentre as complicações relacionadas aos enxertos vasculares estão a formação de trombos, hiperplasia íntima, aterosclerose e infecções[10]. Com o objetivo de minimizar tais complicações, materiais sintéticos devem apresentar propriedades químicas e mecânicas semelhantes ao tecido nativo[13]. Sendo assim, pesquisadores têm se esforçado cada vez mais com o objetivo de obter uma prótese vascular que apresente características consideradas ideais.

Visto que existem variadas limitações para esses procedimentos, o desenvolvimento de um novo modelo por meio de técnicas de engenharia de tecidos é uma opção com alto potencial para o futuro da cirurgia vascular, uma vez que é possível remodelá-lo fisiologicamente, reparar in vivo, sem a necessidade de enxerto autólogo[10].

O processo de descelularização se mostra potencialmente vantajoso para a aplicação em técnicas de engenharia de tecidos devido à arquitetura natural acoplada à sua diversidade biomolecular tanto em aspectos estruturais como funcionais[10]. Há na atualidade ampla gama de técnicas que permitem obter um tecido acelular por meio de procedimentos químicos, físicos ou biológicos. Através da remoção do material celular antigênico é possível evitar reações do sistema imunológico minimizando, desta forma, possíveis complicações. Por meio deste processo, é possível ainda otimizar a estrutura e o desempenho mecânico da matriz extracelular[13]. Além disso, a literatura revela que tais propriedades mecânicas se mostram ideais para a aplicação em enxertos vasculares, o que caracteriza o procedimento como uma alternativa promissora.

O objetivo deste estudo é desenvolver e avaliar dois protocolos de descelularização, um utilizando agente químico e outro agente biológico, sendo eles o detergente aniônico Triton X-100 e a enzima tripsina, respectivamente, identificando o método mais

Trabalho realizado na [1]Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil; [2]Instituto Denton Cooley de Pesquisa, Ciência e Tecnologia, Curitiba, PR, Brasil.

Endereço para correspondência: Fernanda Prehs Izar
Endereço eletrônico: ferphiz@gmail.com

eficaz e determinando o seu potencial para o desenvolvimento de enxertos biológicos com propriedades biomecânicas e biocompatibilidade adequadas para pesquisas pré-clínicas.

MÉTODOS

Aspectos éticos

No presente estudo experimental foram respeitadas as normas estabelecidas no "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Conselho Nacional do Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O estudo teve aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná (CEUA/FEMPAR), registrado sob o protocolo n. 2620/2020.

Delineamento experimental

Foram extraídos de coelho segmentos de 0,5 cm de aorta abdominal, aorta torácica e artérias carótidas comuns, sendo eles imediatamente lavados com soro fisiológico e armazenados em potes estéreis em 10 ml de PBS e solução antibiótica, sendo divididas entre as que seriam submetidas à descelularização por Triton X-100 (TX) e à tripsina (TP), e entre as regiões de extração, constituindo: TX1: 3 aorta abdominal; TX2: aorta torácica; TX3: 4 carótidas comuns; TP 1: aorta abdominal; TP 2: aorta torácica; TP 3: carótidas comuns. Como controle, um segmento de aorta abdominal, um de aorta torácica e um de artéria carótida comum foram mantidos em solução de PBS e solução antibiótica.

Descelularização por Triton X-100

Após removidos, todos os segmentos arteriais foram enxaguados 3 vezes com PBS e incubados em PBS suplementado por antibióticos (0,5% penicilina, 0,5% estreptomicina e 0,5% anfotericina B) por 24 h[7]. Todas as soluções utilizadas em seguida para a descelularização foram suplementadas pelos mesmos antibióticos e respectivas concentrações. Os vasos foram incubados 0,25% Triton X-100, 0,25% fosfato de tri-n-butila, 0,02% EDTA a 37 °C por 48 h, mediante agitação contínua. Após este período, os vasos foram enxaguados 3 vezes com PBS e incubados em solução de 20 mg/ml ribonuclease A e 0,2 mg/ml desoxirribonuclease I a 37° C por 3 h Ollausson, 2012;)[3,4]. Após a incubação com nucleases, o tecido foi submetido a 3 lavagens com PBS e antibiótico e incubado pela mesma solução por 24 h, renovando a solução a cada 8 h. Os vasos foram mantidos em PBS a 4° C por uma semana até prosseguimento da técnica histológica por H&E, Tricrômico de Masson e Sirius Red.

Descelularização por tripsina

Após removidos, todos os segmentos arteriais foram enxaguados 3 vezes com PBS e incubados em PBS suplementado por antibióticos (0,5% penicilina, 0,5% estreptomicina e 0,5% anfotericina B) por 24 h[7]. Os vasos foram incubados em solução de PBS suplementado por 0,1% tripsina e 0,02% EDTA (solução 1) por 24 h a 37° C sob agitação contínua. Em seguida, foi realizada lavagem por PBS 3 vezes e incubação em solução de 20 µg/ml RNase I e 0,2 mg/ml DNase I por 2 h a 37° C sob agitação contínua. Após a incubação com nucleases, o tecido foi submetido a 3 lavagens com PBS e antibiótico e deixado na mesma solução, a 4° C, por uma semana[11], até prosseguimento das técnicas histológicas já referidas.

RESULTADOS

Conforme esperado, observou-se presença de endotélio e núcleos de fibroblastos e fibras musculares nas amostras dos controles, em todas as camadas arteriais e em toda a extensão de sua área. Quanto à estrutura, a lâmina elástica foi preservada, bem como a matriz extracelular da lâmina média e externa (Figuras 2A e D).

Quando analisado o grupo descelularizado por detergente Triton-X, observou-se no H&E permanência nuclear e presença de algumas células endoteliais (Figura 2B e E), indicando que a descelularização não ocorreu conforme o esperado. As 3 colorações utilizadas revelaram preservação das lâminas arteriais, com alta densidade de fibras colágenas. Observou-se, porém, distorção da forma circular de alguns vasos.

O grupo descelularizado por tripsina apresentou remoção nuclear visível e ausência de células endoteliais, que indicam que a enzima foi capaz de descelularizar as artérias (Figura 2F). Tanto em TP1, quanto TP2 e TP3, observa-se no H&E a remoção das células endoteliais quase que em sua totalidade. Quanto aos resíduos de núcleo de células da camada média, observou-se boa remoção quando comparado ao controle, porém, restaram resíduos concentrados em porções específicas, na parte média da camada média (em espessura), indicando que a tripsina não conseguiu penetrar o tecido nessas regiões. A estrutura matricial foi bem preservada em TP1 e TP2, conforme observado nas 3 colorações. Em TP3, observou-se menor densidade de fibras colágenas em relação ao grupo controle, havendo fendas na estrutura, em pequena quantidade e não presente em todas as secções.

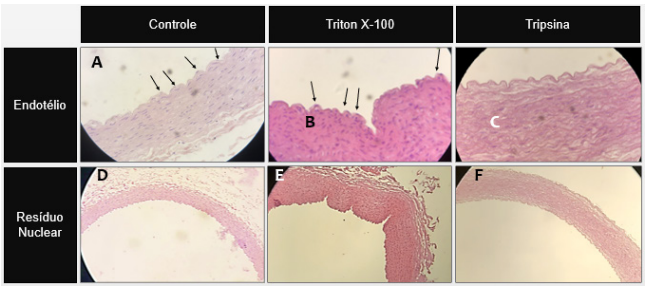

FIGURA 1 – REMOÇÃO NUCLEAR E ENDOTELIAL (SETAS INDICAM CÉLULAS ENDOTELIAIS)

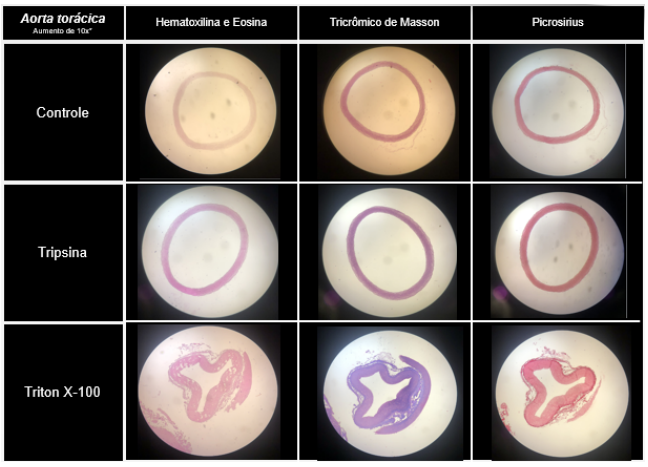

FIGURA 2 – ESTRUTURA ARTERIAL

DISCUSSÃO

No grupo descelularizado por Triton X-100, observou-se no H&E remanescência nuclear e presença de algumas células endoteliais, em menor número do que o observado no controle, indicando que a descelularização não ocorreu, utilizando Triton X-100 1% por 48 h. Ao contrário deste resultado, encontram-se

autores que obtiveram sucesso na descelularização por Triton X-100, que realizou 7 ciclos até a remoção nuclear completa[7]; autores utilizando a mesma concentração identificaram, ainda a necessidade de combiná-lo com DNase[9]. Ressalte-se que o sucesso da descelularização não depende apenas da concentração utilizada, mas também do material descelularizado. Desta forma, a concentração que foi a mesma de Olausson M, et al [7] que realizaram o procedimento em valvas, pode não ter tido efeito nos vasos devido à composição deles. Resultados satisfatórios foram relatados utilizando menor concentração de Triton X-100; porém, o material descelularizado eram valvas cardíacas[3,4]. Serão necessários mais testes para estabelecer a concentração adequada de Triton X-100 para o processo em material arterial. Assim, como neste trabalho, outros também conseguiram a remoção apenas parcial das células, utilizando o detergente aniônico, conseguindo melhores resultados combinando-o com o agente desoxilato de sódio[12].

Quanto à preservação da matriz extracelular, a coloração H&E revelou integridade da matriz colágena, com boa densidade de fibras, bem como a da lâmina elástica e adventícia. As colorações tricrômico de Masson e sirius red confirmaram a preservação das lâminas arteriais. Observou-se, nestas amostras, que o formato dos vasos perdeu a forma circular e foi distorcido, o que deverá ser confirmado posteriormente se isso ocorreu devido à técnica histológica ou à de descelularização.

O grupo descelularizado por tripsina apresentou modificações em relação aos controles, indicando que a enzima, de fato, funciona como descelularizante, apesar de ter deixado áreas em que ela não foi efetiva. Em artigo que utilizou metodologia quase idêntica e também utilizou amostras de artéria aorta[11] em porcinos, houve remoção completa dos núcleos, indicando que é possível dar continuidade a este trabalho, após ajustes. Outros autores também atingiram a descelularização completa com este método, porém incubando a amostra por 48 h em tripsina; houve danos à matriz extracelular[5]. Os resíduos de núcleo de células da camada média foram observados por H&E, tendo remoção total em algumas áreas; porém, ocorreram resíduos concentrados em porções específicas, predominantemente, na parte média da camada média (em espessura), possivelmente indicando que a tripsina não conseguiu penetrar o tecido nessas regiões. Um método de perfusão, ao contrário da simples incubação com agitação, pode ser útil para atingir os locais onde o agente não penetrou na artéria. A presença de algumas fendas na estrutura, em pequena quantidade, e não presente em todas as secções, pode ter sido causada, pela técnica histológica. Em TP2, amostra de aorta torácica, foi observado o melhor resultado quanto à descelularização e ausência de fendas, o resíduo nuclear se restringiu a uma fina camada (camada de uma única célula) de resíduos nucleares no meio da lâmina média (em espessura), enquanto que a matriz colágena e lâmina elástica foram bem preservadas, possuindo semelhança com os controles. Isso indica que o vaso de maior diâmetro teve melhores resultados, reforçando a hipótese de se utilizar método de perfusão contínua dos agentes descelularizantes.

Assim que seja possível a remoção integral nuclear das amostras, os enxertos serão implantados in vivo em ratos como forma de avaliar a biocompatibilidade do material e seu potencial como enxerto vascular, futuramente.

CONCLUSÃO

A tripsina mostrou-se, de fato, um agente descelularizante. O aumento de concentração da enzima em solução e de tempo de incubação com o reagente, pode ser fator a ser alterado para atingir os núcleos que ainda prevaleceram, é preciso atentar de que essas variáveis são diferentes na descelularização de diferentes tecidos. Além disso, métodos de perfusão de reagente, ao invés de simples imersão, podem trazer melhor resultados para a homogeneidade da descelularização. O Triton X-100, nas concentrações e tempos utilizados, não é eficaz como método de descelularização; portanto, este protocolo será revisado em trabalhos futuros.

Izar FP, Gewehr DM, Abreu CR, de Andrare L, Garcia MDR, Costa RS, Santos-Filho AL, Marinhos-Junior CH, Okamoto CT, Kubrusly LF. Development and experimental analysis of decelullarization techniques in rabbit artery as a biological graft: pilot study. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2021;79(Supl. 1):5-7.

ABSTRACT - Cardiovascular diseases are the most common causes of death in the world. Revascularization techniques are used in advanced cases, but they often show complications. Synthetic, autologous and traditional heterologous grafts often do not meet the patient's needs. The decellularization process represents an alternative route for heterologous grafts, being targeted in tissue engineering, due to the possibility of maintaining a bioactive and versatile organic matrix, removing only the antigenic agents. This study aimed to, experimentally, develop and validate decellularization protocols in animal blood vessels and, subsequently, evaluate their potential for biocompatibility and recellularization in vivo. Arterial segments were extracted from the thoracic aorta, abdominal aorta and common carotid arteries of rabbits that were submitted to two decellularization protocols: decellularization by enzymatic method with 0.1% trypsin and by the anionic detergent Triton X-100 0.25%. In conclusion, decellularization allows the removal of antigenic cells in vascular grafts, with the ability to maintain the integrity of the vessel structure.

HEADINGS – Vascular graft. Biological graft. Decellularization. Tissue engineering.

REFERÊNCIAS

1. Bornstädt, D. et al. Rapid Self-Assembly of Bioengineered Cardiovascular Bypass Grafts From Scaffold-Stabilized, Tubular Bilevel Cell Sheets. Circulation, v. 138, n. 19, p. 2130-2144, 2018.
2. Carrabba, Michele; MADEDDU, Paolo. Current Strategies for the Manufacture of Small Size Tissue Engineering Vascular Grafts. Frontiers in Bioenginerring and Biotechnology, v.6, n. 41, 2018.
3. Dijkman PE, Driessen-mol A, Frese L, Hoerstrup SP, Baaijens FPT. Biomaterials Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts. Biomaterials [Internet]. 2012;33(18):4545–54. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.015
4. Li. XYQZXSH. Enhancement of Mesenchymal Stem Cell Attachment to Decellularized Porcine Aortic Valve Scaffold by In Vitro Coating with Antibody Against CD90 : A Preliminary Study. 2009;15(1).
5. Liao J, Joyce EM, Ã MSS. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. 2008;29:1065–74.
6. Mansur, A.; Favarato, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 99, n. 2, p. 755-761, 2012.
7. Olausson M, Patil PB, Kuna VK, Chougule P, Hernandez N, Methe K, et al. Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells : a proof-of-concept study. Lancet [Internet]. 2012;380(9838):230–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60633-3
8. Schmedlen, Racheal H. et al. Tissue engineered small-diameter vascular grafts. Clinics in Plastic Surgery, v.30, n. 4, p. 507-517, 2003.
9. Simsa R, Padma AM, Heher P, Hellstro M, Teuschl A, Jenndahl L, et al. Systematic in vitro comparison of decellularization protocols for blood vessels. 2018;1–19.
10. Tala, P. ; MACNEIL, S. ; CLAEYSSENS, F. The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. Tissue engineering. Part B, Reviews, v. 22, n.1, p. 68-100, 2016.
11. Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. Tissue Engineering of Vascular Grafts : Human Cell Seeding of Decellularised Porcine Matrix. 2000;386:381–6.
12. Wolner E. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. 127(2):399–405.
13. Yuan H, Chen C, Lu T. Strategies in cell-free tissue-engineered vascular grafts. 2020;(October 2019):426–45.