LETICIA LOPES GUIMARÃES

**Efeito do estímulo físico no processo de recelularização
pulmonar**

São Paulo

2020

LETICIA LOPES GUIMARÃES

Efeito do estímulo físico no processo de recelularização

pulmonar

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e

Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Prof. Dr. Renata Kelly

da Palma

De acordo:

Renata Kelly da Palma

Orientador

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3916
FMVZ

Guimarães, Leticia Lopes
Efeito do estímulo físico no processo de recelularização pulmonar / Leticia Lopes
Guimarães. – 2020.
68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Kelly da Palma.

1. Pulmões. 2. Descelularização. 3. Recelularização. 4. Células-tronco. 5. Biorreator.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estímulo físico no processo de recelularização pulmonar", protocolada sob o CEUA nº 9335060218 (ID 006218), sob a responsabilidade de **José Roberto Kfoury Júnior e equipe; Leticia Lopes Guimarães** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 07/03/2019.

We certify that the proposal "Physical stimulation in the pulmonary recellularization process", utilizing 20 Heterogenics mice (20 males), protocol number CEUA 9335060218 (ID 006218), under the responsibility of **José Roberto Kfoury Júnior and team; Leticia Lopes Guimarães** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/07/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2018** a **12/2019**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Biotério de camundongos do Instituto de Ciências Biomédicas/USP**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **6 a 8 semanas**

N: **20**

Linhagem: **C57/BL6**

Peso: **17 a 20 g**

Local do experimento: Os experimentos sera realizado no laboratório

São Paulo, 11 de março de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GUIMARÃES, LETICIA LOPES

Título: **Efeito do estímulo físico no processo de recelularização pulmonar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus, por sempre me abençoar e me dar forças nos momentos difíceis para superar as diversas barreiras e dificuldades, me capacitando à realizar meus sonhos e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Vera Lucia Lopes Guimarães e Manoel Fernandes Guimarães, que sempre serão meus primeiros exemplos de vida, que desde o início me apoiaram, me ajudaram, me incentivaram e me deram forças para continuar e nunca desistir, apesar das diversas dificuldades nessa longa jornada de estudos. Vocês são meus exemplos de força, superação, humildade, amor e respeito. Serei eternamente grata por sempre contribuírem para que eu consiga realizar todos os meus sonhos e alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos, Ezequiel Fernandes de Oliveira, Érica Oliveira Nascimento e Lucas Lopes Guimarães, que sempre me apoiaram, me deram bons conselhos e sempre estiveram do meu lado. Sei que posso contar com vocês há qualquer momento, e também serei eternamente grata ao Ezequiel que me levou para área da pesquisa no meu primeiro ano de graduação e desde então sempre está ao meu lado. Você é um exemplo para minha vida e jamais irei esquecer tudo que fez por mim.

A minha querida orientadora, Renata Kelly da Palma, que esteve comigo desde o meu primeiro ano de graduação, obrigada por confiar e acreditar em mim, por me passar com toda dedicação seus conhecimentos, por me incentivar, me apoiar, me motivar e me dar forças para não desistir. Você é como uma mãe pra mim nessa área tão grande da pesquisa, você é meu grande exemplo e sou muito grata por tê-la em minha vida, por ser uma excelente orientadora, por me ajudar alcançar meus objetivos, por ser uma amiga e mais uma vez por confiar e acreditar em mim.

A Auriléia Aparecida de Brito, que me passou seus conhecimentos, compartilhou suas idéias para o projeto e me ajudou bastante nos últimos experimentos. Obrigada pela atenção, paciência, ensinamentos e ajuda para realização desta dissertação.

A professora Ana Paula Ligeiro de Oliveira, por ter me acolhido no laboratório de Imunologia Pulmonar da Universidade Nove de Julho, por ter me

ajudado com boas idéias no final do projeto, ajudado com os materiais e por ter contribuído para realização deste trabalho.

Ao professor Luis Vicente Franco de Oliveira, por ter me dado a primeira oportunidade de entrar no ramo da pesquisa no meu primeiro ano de graduação e desde então sigo em frente com todo ensinamento que me passou.

Aos meus amigos, Andressa, Adriana, Juliana, Mayara, Ana Lidia, Tawany, Gabriela, Bruno, Tatiana, Arthur, Diogo, Ana Cluadia, Danielle, Igor, Ronaldo, Mayc, Meury, Kathelyn, Silmara, Kauan e Eduardo, obrigada por toda ajuda, todo apoio, incentivo, conselhos e pelos momentos de alegria que me deram forças para continuar. Vocês com certeza me ajudaram a chegar até aqui e sou muito grata a cada um de vocês.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela assistência durante a pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

RESUMO

GUIMARÃES, L.L. **Efeito do estímulo físico no processo de recelularização pulmonar.** 2020 .68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A Bioengenharia pulmonar pode ser uma ferramenta terapêutica em potencial para a obtenção de pulmões para transplante em pacientes em uma fase muito avançada de doenças respiratórias. No entanto, não há dados disponíveis para decifrar o papel específico desempenhado pelos diferentes estímulos biofísicos que caracterizam a fisiologia respiratória na bioengenharia pulmonar quando uma matriz pulmonar decelularizada é cultivada com células-tronco. Diante disso, o objetivo principal deste estudo foi verificar se os estímulos físicos de estiramento estático, mimetizando a fisiologia respiratória, junto ao laser de baixa intensidade, podem otimizar a recelularização pulmonar com células-tronco mesenquimais. Para isso, os pulmões passaram pelo processo de descclularização seguido da quantificação dos componentes da matriz extracelular (MEC), microscopia eletrônica de varredura, imunohistoquímica e quantificação de DNA, comprovando a eficiência da descclularização e a preservação de colágeno I, III e IV; fibronectina, laminina e elastina, além das estruturas vasculares e alveolares, comprovando também que os pulmões descclularizados respeitaram o critério de - 50 nanogramas por micrômetro de tecido. Na sequência, o isolamento e cultura de células-tronco derivadas da polpa de dente revelou a expressão de CD105 (SH2) e CD73 (SH3/4) sendo negativos para marcadores de linhagem hematopoiéticas CD34, e o cultivo com células epiteliais Beas-2B e epitelial alveolar humana A-549 foram usadas juntamente as células-tronco na recelularização de 3 pulmões descclularizados, permitindo compreender melhor os mecanismos biofísicos básicos que participam na regeneração pulmonar utilizando um gerador de fluxo contínuo com pressão positiva e um Laser de baixa intensidade. Por fim, nossos resultados demonstram que as terapias com laser e CPAP, modularam os níveis de citocina e previniram a contaminação.

Palavras-chave: Pulmões, descclularização, recelularização, células-tronco, biorreator.

ABSTRACT

GUIMARÃES, L, L .**Effect of physical stimulation in the lung recellularization process**.2020. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Lung bioengineering can be a potential therapeutic tool for obtaining lungs for transplantation in patients at a very advanced stage of respiratory diseases. However, there is no data available to decipher the specific role played by the different biophysical stimuli that characterize respiratory physiology in pulmonary bioengineering when a decellularized pulmonary matrix is cultured with stem cells. Therefore, the main objective of this study was to verify whether the physical stimuli of static stretching, mimicking respiratory physiology, together with low-level laser, can optimize pulmonary recellularization with mesenchymal stem cells. For this, the lungs went through the decellularization process followed by the quantification of the components of the extracellular matrix (MEC), scanning electron microscopy, immunohistochemistry and DNA quantification, proving the efficiency of decellularization and the preservation of collagen I, III and IV; fibronectin, laminin and elastin, in addition to the vascular and alveolar structures, also proving that the decellularized lungs met the criterion of - 50 nanograms per micrometer of tissue. Following, the isolation and culture of stem cells derived from tooth pulp revealed the expression of CD105 (SH2) and CD73 (SH3 / 4), being negative for hematopoietic lineage markers CD34, and culturing with Beas-2B and epithelial cells A-549 human alveolar epithelial cells were used together in the recellularization of 3 decellularized lungs, allowing a better understanding of the basic biophysical mechanisms that participate in pulmonary regeneration using a continuous flow generator with positive pressure and a low intensity Duo Laser. Finally, our results demonstrate that therapies with laser and CPAP, modulated cytokine levels and prevent contamination.

Keywords: Lung, decellularization, recellularization, stemcell, biorreactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma, demonstração de coleta das amostras	28
Figura 2 - Processo de descelularização	29
Figura 3 - Laser Duo de baixa intensidade	34
Figura 4 - Cultivo de rMSCs nos pulmões descelularizados	34
Figura 5 - Esterilização e proliferação celular	35
Figura 6 – Pressão positiva contínua nas vias aéreas (CPAP)	35
Figura 7 ilustração de mensuração do intercepto linear médio (Lm)	36
Figura 8 - Pulmão antes e após o processo de descelularização	38
Figura 9 - Análise microscópica dos pulmões de camundongos antes e após a descelularização	39
Figura 10 - Análise por meio da Microscopia eletrônica de varredura	40
Figura 11 - Análise de Imunohistoquímica	41
Figura 12 - Isolamento e cultura de células-tronco derivadas da polpa de dente	42
Figura 13 - Cultivo celular de Beas-2B	43
Figura 14 - Cultivo celular de A-549	43
Figura 15 - Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de dente	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 16 – Efeito do CPAP e do laser de baixa intensidade na recelularização 45 pulmonar sobre os níveis de IL-6 24hs, IL-8 24hs, IFN- γ 24hs e IL-10 24 hs no sobrenadante de cultivo celular de linhagem celular de BEAS, A549 e célula-tronco de polpa de dente.

Figura 17- Efeito do CPAP e do laser de baixa intensidade na recelularização pulmonar sobre os níveis de IL-6 12hs, IL-6 24hs , IL-6 48hs e IL-6 7 dias no 46 sobrenadante de cultivo celular.

Figura 18 - Efeito do CPAP e do laser de baixa intensidade na recelularização pulmonar sobre os níveis de IL-8 12hs , IL-8 24hs , IL-8 48hs e IL-8 7 dias no 47 sobrenadante de cultivo celular.

Figura 19 - Efeito do CPAP e do laser de baixa intensidade na recelularização pulmonar sobre os níveis de IFN- γ 12hs , IFN- γ 24hs, IFN- γ 48hs e IFN- γ 7 48 dias no sobrenadante de cultivo celular.

Figura 20 - Efeito do CPAP e do laser de baixa intensidade na recelularização pulmonar sobre os níveis de IL-10 12hs , IL-10 24hs , IL-10 48hs e IL-10 7 dias 49 no sobrenadante de cultivo celular

Figura 21- Análise microscópica dos pulmões de camundongos antes e após a 50 revascularização sobre a contagem de células

Figura 22- Efeito do CPAP e do laser de baixa intensidade na recelularização pulmonar sobre o diâmetro alveolar médio (Lm) 51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise da quantificação de DNA nos pulmões descelularizados	42
Gráfico 2 – Análise da contagem das células	50
Gráfico 2 – Análise da quantificação do diâmetro alveolar média (Lm)	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Potencial da Bioengenharia de Pulmão nas Doenças Respiratórias	17
2.2	Técnicas de descelularização pulmonar	17
2.3	O uso potencial de células-tronco na engenharia de pulmões	19
2.4	Células tronco são moduladas por estímulos físicos	20
2.5	Laser de Baixa Intensidade (LBI) na inflamação pulmonar	23
3	OBJETIVO GERAL	27
3.1	Objetivos Específicos	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Coleta das amostras	28
4.2	Preparação de substrato para cultura celular com matriz pulmonar	28
4.3	Análise histológica das amostras	30
4.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	30
4.5	Imunohistoquímica	30
4.6	Quantificação de DNA nos pulmões descelularizados	31
4.7	Isolamento e cultura de células-tronco derivadas da polpa de dente	32
4.8	Cultivo celular de Beas-2B	32
4.9	Cultivo celular de A-549	33
4.10	Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de dente	33
4.11	Cultivo de rMSCs nos pulmões descelularizados	33
4.12	Avaliação dos níveis de citocinas por ELISA	36
4.13	Mensuração do intercepto linear médio (Lm)	36
4.14	Análise estatística	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Preparação de substrato para cultura celular com matriz pulmonar	38
5.2	Análise histológica das amostras	39
5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	40
5.4	Imunohistoquímica	40
5.5	Quantificação de DNA nos pulmões descelularizados	42
5.6	Isolamento e cultura de células-tronco derivadas da polpa de dente	42
5.7	Cultivo celular de Beas-2B	43

SUMÁRIO

5.8	Cultivo celular de A-549	43
5.9	Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de dente	43
5.10	Quantificação dos níveis de citocinas por ELISA	44
5.11	Análise contagem das células	50
5.12	Quantificação do diâmetro alveolar média (Lm)	51
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	59
8	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A bioengenharia de órgãos e tecidos tem se mostrado um campo de consideráveis avanços voltado para o desenvolvimento de abordagens clinicamente viáveis com intuito de recriar ou melhorar os órgãos e tecidos mantendo a sua estrutura e função do órgão nativo (PRAKASH ET AL., 2015). Diante deste contexto, a bioengenharia pulmonar se torna uma técnica promissora que utiliza diversas abordagens por meio dos processos de descelularização, cujo processo visa remover todo o conteúdo celular mantendo uma matriz extracelular intacta e translúcida resultando em um *scaffold* biológico com a capacidade de retomar as funções fisiológicas do pulmão nativo (GILPIN et al., 2016).

Entretanto, uma vez que um *scaffold* é produzido, a recelularização é necessária para obter um órgão funcional para transplante. Além disso, os princípios da recelularização incluem a obtenção de uma fonte renovável de células, dessa forma, a maioria dos protocolos de recelularização tem usado células endoteliais, (WELMAN T et al., 2015) porém, trabalhos recentes mostraram benefícios potenciais com células-tronco mesenquimal (MSCs) que podem ser isoladas de um paciente, de fontes como polpa de dente e expandidas em cultura para números fisiologicamente relevantes, além de sua plena capacidade de se diferenciar em vários tipos de células, com isso, a expectativa e os esforços de pesquisa nos últimos anos vem aumentando consideravelmente, tornando ainda mais desafiadora a bioengenharia com células-tronco mesenquimal MSCs. Outros estudos demonstraram que as MSCs se ligam a estruturas pulmonares independentemente do método de descelularização, método de esterilização, tempo de armazenamento ou estado de doença, sugerindo que as MSCs tenham ampla gama de aplicação na recelularização (BONENFANT NRet al., 2013; SCARRITT ME et al., 2014) tornando-se então uma fonte celular fisiologicamente relevante neste processo.

Por sua vez, este projeto objetivou-se em verificar se estímulos físicos mimetizando a fisiologia respiratória otimiza a recelularização pulmonar com células mesenquimais, para melhor conhecimento sobre as tecnologias específicas envolvidas em biorreatores para a medicina regenerativa e

conhecimento científico básico no desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas ferramentas terapêuticas na medicina respiratória.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Potencial da Bioengenharia de Pulmão nas Doenças Respiratórias

As doenças do sistema respiratório tais como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), (enfisema e bronquite crônica), fibrose pulmonar idiopática, hipertensão arterial pulmonar primária, doença intersticial pulmonar, fibrose cística e a deficiência de α -1-antitripsina resultam em danos pulmonares estruturais irreversíveis, tendo o transplante pulmonar como indicação terapêutica quando a doença atinge uma progressão avançada (SHIN'OKA et al., 2001). Infelizmente, o sucesso do transplante pulmonar é limitado, principalmente devido à escassez do número de doadores de órgãos e incidência de bronquiolite obliterante resultante de uma resposta aloimune provocada pelas disparidades entre o doador e os antígenos do receptor. A taxa de sobrevivência de 50% após o transplante de pulmão está confinada a aproximadamente cinco anos (YUSEN et al., 2010).

As atuais limitações em relação às doações requerem estratégias no sentido de aumentar a disponibilidade de órgãos para transplante. Necessidade esta, reforçada pelo envelhecimento progressivo da população, o que aumenta a lista de espera de pacientes com doenças respiratórias graves incapacitantes terminais. Por exemplo, a DPOC está prevista para ser a terceira principal causa de morte no ano de 2020 (LOPEZ et al., 2006; EISNER et al., 2010).

Neste contexto, a bioengenharia de pulmões é considerada uma alternativa terapêutica em potencial, porém as pesquisas se encontram em estágios preliminares e esforços científicos mais intensos são necessários (NICHOLS et al., 2009; PRAKASH ET AL., 2015).

2.2 Técnicas de descelularização pulmonar

Devido à grande complexidade estrutural de órgãos completos, a abordagem atual para a engenharia de órgãos é baseada na utilização da matriz extracelular (MEC) natural do pulmão descelularizado como partida para a reconstrução do órgão por recelularização em um biorreator (PETERSEN et al., 2010; PRICE et al., 2010; OTT et al., 2010; GILPIN et al., 2016).

A matriz de órgãos descelularizados potencialmente mantém a arquitetura tridimensional e a composição bioquímica, bem como a microvasculatura do tecido original. Estas propriedades únicas tornam o pulmão descelularizado natural, muito promissor para a fabricação bioartificial de pulmões funcionais, uma vez que proporciona uma melhor recriação do microambiente in vivo. A técnica de descelularização, foi utilizada para a engenharia de uma diversidade de tecidos, incluindo ossos, esôfago, artérias, bexiga, traqueia e coração (PRICE et al., 2010; OTT et al., 2008; BADYLAK., 2002; GILBERT et al., 2006; BADYLAK et al., 2009; GILBERT et al., 2008; GILBERT et al., 2008; MACCHIARINI et al., 2008).

Comparado a outros órgãos, a estrutura pulmonar é particularmente complexa, dificultando o processo de bioengenharia. Apesar dessa complexidade, tem sido demonstrado que com a utilização de protocolos adequados, o pulmão pode ser completamente descelularizado para obter uma estrutura acelular preservada (CORTIELLA et al., 2006; GUYETTE et al., 2014). A descelularização com detergentes biológicos é uma abordagem frequentemente utilizada e pode ser aplicada tanto por perfusão vascular quanto por via traqueal. O método de descelularização por perfusão ocorre por meio da rede vascular intrínseca sendo a forma mais eficiente de distribuir os agentes descelularizantes, até mesmo para tecidos mais espessos, uma vez que diminui consideravelmente a distância da difusão do agente descelularizante, preservando a macroestrutura e microestrutura 3D (OTT et al., 2008).

Melo e colaboradores (2014), observaram que a descelularização por perfusão com detergentes SDS ou CHAPS não induziu alterações significativas nas propriedades micromecânicas de pulmões acelulares. Além disso, estudos anteriores demonstraram que esse método por perfusão não comprometeu a arquitetura de vias aéreas ou estrutura vascular de pulmões descelularizados (PETERSEN et al., 2010; CORTIELLA et al., 2010; SONG et al., 2011). Em estudo realizado por Palma e colaboradores (2015) foi demonstrado uma comparação de fluxo constante vs pressão constante ao longo do processo de descelularização pela via vascular e não houveram diferenças significativas nas estruturas pulmonares. Num outro estudo realizado por Bellezia e colaboradores (2018) também não houveram alterações nas estruturas

pulmonares em *scaffolds* descelularizados sob diferentes taxas de fluxo intrataqueal e vascular. Entretanto a via da artéria pulmonar foi mais eficaz na obtenção de *scaffolds* descelularizados, quando submetidos a diferentes taxas de fluxo. A preservação das redes vasculares intactas e outras arquiteturas essenciais dos órgãos após o processo de descelularização provê uma base ideal para recelularização (MELO et al., 2014). Price e colaboradores (2010) relataram que o pulmão descelularizado pode ser recelularizado com células fetais pulmonares submetidas à ventilação simulada. Além disso, Ott e colaboradores (2010) e Petersen e colaboradores (2010) recelularizaram estruturas descelularizadas de pulmões de roedores com células epiteliais e alveolares para obter um pulmão através bioengenharia mostrando a funcionalidade das trocas gasosas a curto prazo, após a implantação in vivo.

Embora todos esses trabalhos representem um marco no progresso da bioengenharia pulmonar, qualquer aplicação futura da abordagem realizada pelos autores poderia estar prejudicada pela dificuldade de usar células diferenciadas, dada a sua limitada disponibilidade e capacidade de proliferação.

2.3 O uso potencial de células-tronco na engenharia de pulmões.

Como mencionado por Ott e colaboradores (2010) e Petersen e colaboradores (2010), a utilização de células indiferenciadas para semear uma MEC pode ser uma estratégia mais prática para bioengenharia pulmonar devido a possibilidade de expansão destas células e sua capacidade de se diferenciar em diferentes fenótipos. Esta abordagem, no entanto, exige células-tronco para serem diferenciadas em fenótipos pulmonares necessários nos locais específicos dentro da estrutura do órgão.

Uma prova de conceito da viabilidade potencial desta abordagem foi publicada por Cortiella e colaboradores (2010) demonstrando que após cultivar células-tronco embrionárias murinas em pulmões descelularizados, as estruturas formadas pela diferenciação das células-tronco secretaram os componentes da MEC ausentes no pulmão anteriormente acelular (CORTIELLA et al., 2010; SMITH et al., 2018).

Além disso, em culturas de 21 dias de pulmão, a diferenciação local-específica de células-tronco foi evidenciada pela geração de discretos focos de células expressando α -actina de músculo liso, citoqueratina-18 e CC10 em regiões de traquéia e brônquios. Os autores detectaram camadas de células ao longo da superfície interna da traqueia e dos brônquios que expressaram marcadores de células epiteliais como TTF-1, citoqueratina-18, ou CC10, que também incluiu algumas células ciliadas (CORTIELLA et al., 2010). Estes dados descritos acima sugerem que o pulmão descelularizado preserva os sinais biológicos mediados pela estrutura pulmonar descelularizada, suficientes para direcionar as células-tronco a linhagens específicas de pulmão e orientar o desenvolvimento de tecido pulmonar específico *in vitro*, demonstrando a capacidade dos sinais da MEC em influenciar a diferenciação das células-tronco embrionárias de forma local específica.

No entanto, é notável que estes resultados promissores tenham sido obtidos por uma estrutura de pulmão recelularizado que não foi submetido aos estímulos físicos associados com os principais processos no pulmão: ventilação e perfusão.

2.4 Células tronco são moduladas por estímulos físicos

Os estímulos físicos mais notáveis experimentados pelas células do pulmão são: a) um substrato do microambiente com variada viscoelasticidade e estrutura tridimensional (3D) nos diferentes locais do pulmão; b) estiramento cíclico causado pela mudança contínua do volume pulmonar durante a respiração; c) tensão de cisalhamento devido à circulação de fluidos pelas vias aéreas e vasos; d) existência de uma interface ar-líquido no epitélio das vias aéreas e e) diferentes níveis de pressão parcial de oxigênio sobre as várias seções da arquitetura das trocas gasosas (por exemplo, vias aéreas superiores e inferiores, alvéolos, lados arterial e venoso do capilar).

Estes estímulos físicos, quando aplicados isoladamente ou em combinação com fatores solúveis pró-diferenciação, demonstram modular o compromisso de células-tronco em células-tronco embrionárias *in vitro* (BADYLAK et al., 2012).

As propriedades físicas do substrato (estrutura 3D e viscoelasticidade) determinam a diferenciação de células-tronco. Atualmente é bem aceito que alguns aspectos da dinâmica do ambiente 3D de células desempenham um papel importante em liberar todo o potencial das células-tronco associada com a renovação, diferenciação e montagem/reunião de células-tronco em tecidos nativos (GARRETA et al., 2006; BURDICK et al., 2009; DEQUACH et al., 2010; SMITH et al., 2018). A rigidez do substrato em que as células-tronco mesenquimais são cultivadas pode controlar a sua função, além de também poder contribuir para sua diferenciação (ENGLER et al., 2006; SMITH et al., 2018). Dados anteriores mostram também que o desenvolvimento de cardiomiócitos depende da rigidez do substrato (JACOT et al., 2010).

O estiramento cíclico, que pode ser aplicado em diferentes frequências para simular vários ambientes de células respiratórias (TREPAT et al., 2006; TREPAT et al., 2004; PUIG et al., 2005), regula a α -actina da musculatura lisa, reorienta fibras de actina e leva à diferenciação em fenótipo de células musculares lisas, sem qualquer adição de fator de crescimento (GHAZANFARI et al., 2009). Os efeitos na diferenciação do estiramento cíclico dependem, no entanto, do protocolo aplicado em ambos os microambientes celulares, 2D (bidimensional) e 3D (BOONEN et al., 2010).

A existência de uma interface ar/líquido para imitar as condições das vias aéreas é outro fator que pode afetar consideravelmente o destino de células-tronco em fenótipos de pulmão (CORAUX et al., 2004; VAN HAUTE et al., 2009; NONAKA et al., 2016). Van haute e colaboradores (2009) descreveu um protocolo para a obtenção de tecidos epiteliais do pulmão por células-tronco embrionárias humanas utilizando um sistema de interface ar- líquido para imitar as condições das vias aéreas. O papel desempenhado pela pressão parcial de oxigênio na diferenciação de células-tronco tem sido analisado com particular interesse (WION et al., 2009). De fato, enquanto a maioria das pesquisas tem sido realizada em sala com condições de cultura de células em ar ambiente, é bem documentado que, in vivo, ambos os tecidos embrionários e adultos e, especificamente, os diferentes compartimentos de pulmão, mantêm a pressão parcial de oxigênio muito abaixo aos correspondentes a uma concentração de O₂ de 21% em ar ambiente (WION et al., 2009).

Tem sido relatado que a taxa de diferenciação de células-tronco

embrionárias humanas in vitro depende de oxigenação (EZASHI et al., 2005). Além disso, dado que a embriogênese é fortemente influenciada por gradientes de oxigênio, pequenas mudanças na tensão de oxigênio estimulam a diferenciação em muitos tipos de células: os neurônios dopaminérgicos, cardiomiócitos, condrócitos, células progenitoras hematopoéticas e, mais particularmente, as células endoteliais (PRADO-LOPEZ et al., 2010) e condrócitos. Células-tronco mesenquimais também mostraram diferenciação dependentes do oxigênio (ANNABI et al., 2003; XU et al., 2007).

Assim, as evidências experimentais existentes apoiam a ideia de que o microambiente físico contribui significativamente para a modulação da diferenciação de células-tronco mesenquimais, podendo ser isoladas e expandidas em cultura para números fisiologicamente relevantes.

Estudos demonstraram que as MSCs se diferenciaram em relação às linhagens epiteliais pulmonares quando cultivadas em pulmões de rato decelularizados (MENDEZ et al., 2014), assim como outros grupos têm *scaffolds* pulmonares cultivados com MSCs demonstraram aderência e confluência em cultura (DALY et al., 2011; NICHOLS et al., 2013; O'NEILL et al., 2013). Além de sua plena capacidade de se diferenciar em vários tipos de células, as MSCs estão envolvidas na reparação tecidual e podem fornecer suporte estromal através da secreção de citocinas e quimiocinas, um papel que provavelmente facilitará uma melhor integração dos órgãos cultivados ao transplante (QIAN et al., 2008). Esse tipo celular também podem se ligar a estruturas pulmonares independentemente do método de descclularização, método de esterilização, tempo de armazenamento ou estado de doença, sugerindo que as MSC tenham ampla gama de aplicação na recelularização (BONENFANT et al., 2013; SCARRITT ME et al., 2014). Portanto tornando-se uma fonte celular fisiologicamente relevante neste processo.

A propósito, Uriate e colaboradores (2014) publicaram um estudo onde foi avaliado as propriedades mecânicas dos pulmões de ratos descclularizados após esterilização por irradiação gama, sendo que um grupo foi esterilizado em temperatura ambiente e o outro grupo esterilizado ainda congelados à -20° em gelo seco. Na avaliação, os pulmões descclularizados e esterilizados por irradiação apresentou alterações quando comparadas aos pulmões do grupo controle não irradiados, com redução nos espaços alveolares e dano aparente

da superfície da pleura. Além disso, os dois grupos descelularizados e esterilizados por irradiação gama, ou seja, tanto o grupo congelado quanto o grupo à temperatura ambiente, apresentaram valores mecânicos significativamente maiores após a irradiação, tanto na resistência e elastância quanto nas elastâncias estáticas e dinâmicas que também apresentaram valores maiores após a irradiação, ou seja, houve alteração das propriedades mecânicas dos pulmões nos dois métodos de esterilização por meio da irradiação gama, sendo assim, é necessário uma nova ferramenta e metodologia para esterilização sem alterar as propriedades mecânicas dos pulmões descelularizados. Nesse sentido, o laser de baixa intensidade pode surgir como uma alternativa potencial de tratamento.

2.5 Laser de Baixa Intensidade (LBI) na inflamação pulmonar.

A luz solar é utilizada como terapia desde a antiguidade (PINHEIRO; JR, 1998). Miserendino e Pick (1995) afirmam que em 1400 a.C, os indianos foram os primeiros a utilizar a fotoquimioterapia através de um fotossensibilizador extraído de plantas (Psoralens), utilizando-o na forma tópica de maneira a ser absorvido pela luz solar, resultando assim em um efeito terapêutico no tratamento do vitiligo. Com o intuito de tratar o leucoedema, os egípcios também se beneficiaram do uso dessa substância (MISERENDINO; PICK, 1995). Com o tempo, os cientistas identificaram fontes de luz, porém não entendiam como essa luz era gerada.

Já Einstein (1915 – 1916) postulou sua teoria sobre a emissão estimulada de luz, baseada na teoria quântica proposta por Plank (1900) que analisava as relações entre a quantidade de energia liberada por processos atômicos. Einstein afirmou que um fóton poderia penetrar na matéria, onde colidiria com um átomo. Como todos os átomos possuem elétrons, um elétron seria ejetado do átomo pela energia do fóton, com grande velocidade. Em 1917, em *Zur Theorie der Strahlung* (Teoria do Comprimento de Onda), afirmou que quando existe a inversão da população entre os níveis de energia superior e inferior entre os sistemas de átomos, é possível obter radiação estimulada amplificada, ou seja, luz laser (EINSTEIN, 1917). A

emissão de radiação electromagnética estimulada tem a mesma frequência (comprimento de onda) e fase (coerência) que a radiação incidente (MISERENDINO; PICK, 1995).

A geração da luz laser ocorre dentro de uma cavidade conhecida como cavidade de Perot- Fabry, que consiste de uma câmara contendo um meio ativo. O meio ativo consiste em um material que pode ser sólido, líquido, gasoso ou semiconductor. No instante em que o meio ativo é excitado, ele faz com que os elétrons contidos na cavidade óptica ganhem e liberem energia para formação da radiação laser. O tamanho e a forma da câmara variam de acordo com o meio ativo e a potência do aparelho laser. Dois espelhos com níveis de reflexão diferentes estão posicionados em cada uma das extremidades da câmara. Um dos espelhos totalmente reflexivo (100%) e o outro parcialmente reflexivo (98%). A diferença de capacidade de reflexão dos espelhos permite a saída da radiação de dentro da cavidade, formando assim a luz laser. A fonte energética pode ser elétrica ou luminosa, e é o que alimenta o sistema de três maneiras: continuamente (CW), pulsada, que origina ondas pulsadas e desencadeadas ou Q-switched (MISERENDINO; PICK, 1995).

LASER ("light amplification by stimulate demission radiation") é um acrônimo o qual significa "amplificação da luz por emissão estimulada de radiação" (BASFORD, 1995; MALUF *et al.*, 2006). Dos materiais mais comumente utilizados na laserterapia, pode-se citar a mistura gasosa de Hélio e Neônio (He-Ne), o semiconductor diodo Arseneto de Gálio e Alumínio (Ga-Al-As), ou Alumínio-Gálio-Índio-Fósforo (Al-Ga-In- P). Esses materiais produzem radiação na faixa entre 630 nm e 950 nm (BAGNATO; PAOLILLO, 2014). Desta maneira, o laser adquire três características principais: feixe de luz monocromático (apresenta uma cor correspondente a um único comprimento de onda do espectro eletromagnético), colimado (a luz caminha na mesma direção, favorecendo a transmissão de uma grande quantidade de energia a um alvo) e coerente (todos os raios do laser apresentam coerência temporal e espacial) (BAGNATO; PAOLILLO, 2014; KARU; PIATIBRAT; KALEND, 1987).

Os lasers são classificados como de alta intensidade e baixa intensidade. O laser de alta intensidade ou cirúrgico (HighIntensity Laser Treatment – HILT) tem efeitos de ablação sendo indicado para procedimentos cirúrgicos como cortes, coagulação e cauterização. O laser de baixa

intensidade (Low-level Laser Therapy – LLLT) é utilizado para fins terapêuticos e bioestimulantes. A indicação dos tipos de laser é caracterizada pelos diferentes comprimentos de onda (determinantes da profundidade de penetração) e pela potência (operam na faixa de 50 a 300 mW) (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

A terapia com laser de baixa intensidade (LBI) foi destacada como uma modalidade de fisioterapia não invasiva, sem efeitos colaterais, disponível e econômica, com efeitos antioxidantes e antiinflamatórios, cujo comprimento de onda está dentro da região do espectro vermelho ao infravermelho próximo na faixa de 600 a 1000 nm. (KASHANSKAIA; FEDOROV, 2009; DE LIMA *et al.*, 2011; OLIVEIRA MC *et al.*, 2014; AHRABI *et al.*, 2019). Trabalhos apontam para um papel anti-inflamatório da terapia com LBI sobre a inflamação pulmonar, observaram que a fototerapia com LBI entregue na dose de 7,5 J/cm² e comprimento de onda de 660 nm foi capaz de aliviar a inflamação das vias aéreas induzida por LPS através de um mecanismo que envolve a redução do nível IL-1 β das citocinas pró-inflamatórias (AIMBIRE *et al.*, 2008). Representa um importante efeito do LBI, pois a IL-1 β tem um papel fundamental nos processos inflamatórios (ROSE *et al.*, 1994).

Um importante estudo publicado por Khorsandi e colaboradores (2020) revelou que as células mostraram aumento da proliferação quando irradiadas com terapia a laser de baixa intensidade ou terapia de fotobiomodulação, que induz a ativação de cromóforos intracelulares e extracelulares e o início da sinalização celular. Outro estudo publicado por Ahrabi e colaboradores (2019) também mostraram que o laser de baixa intensidade aumentou a auto-renovação e a sobrevivência das células-tronco da polpa dentária, essas células têm morfologia fibroblástica e auto-renovação e são capazes de se diferenciar em diferentes tipos de células. O mesmo estudo apresentou também a capacidade do LBI em melhorar a expressão de óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) nas células endoteliais, promovendo assim a proliferação e migração das células endoteliais, que desempenham um papel importante na angiogênese.

Portanto, analisando todos esses resultados positivos e negativos, esse estudo pretende avaliar a eficácia do laser de baixa intensidade, bem como a interação entre elas em um modelo experimental de recelularização, e a

utilização do laser para esterilização do pulmão. Nós acreditamos que os estímulos físicos do estiramento estático e do LBI podem otimizar o processo de recelularização além de ser bastante benéfico nessa linha de pesquisa, uma vez que conseguimos obter um biorreator capaz de aplicar condições de ventilação e oxigenação, facilitando a migração, adesão célula-MEC, proliferação e diferenciação das células-tronco semeadas em um *scaffold* acelular do pulmão.

3 OBJETIVO GERAL

Verificar se os estímulos físicos de estiramento estático, mimetizando a fisiologia respiratória, junto ao laser de baixa intensidade, pode otimizar a recelularização pulmonar com células tronco mesenquimais.

3.1 Objetivos Específicos

- ≡ Estabelecer um protocolo de descelularização pulmonar;
- ✓ Verificar as proteínas presentes na matriz extracelular após a descelularização (colágeno I, III e IV; fibronectina, laminina e elastina);
- ≡ Isolar e caracterizar as células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente;
- ≡ Esterelizar o pulmão descelularizado;
- ≡ Cultivar as células mesenquimais na matriz extracelular associado a estímulo físico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Como descrito na figura 1, foram utilizados 9 camundongos machos da raça C57BL/6, com peso de 17-20 g, acondicionados no Biotério de Matrizes de Camundongos ICB-USP e mantidos em ambiente limpo e seco, com luminosidade natural, respeitando o ciclo claro/escuro de 12h, temperatura e umidade relativa do ar adequadas. A ração e a água permaneceram *ad libitum* e monitoramento diário para troca de palha e água, até o momento do experimento.

Figura 1. Fluxograma, demonstração de coleta das amostras

4.2 Preparação de substrato para cultura celular com matriz pulmonar.

Os pulmões foram obtidos a partir de camundongos machos da raça C57/BL6, com peso de 17 a 20g. Inicialmente, os camundongos foram anestesiados com Xilazina e Quetamina (1 mg/kg, intraperitoneal), de acordo com protocolo padrão adotado pelo laboratório e posteriormente eutanasiados por exsanguinação da aorta (CARRERAS et al., 2010). Imediatamente após a eutanásia, a região do diafragma foi perfurada e a caixa torácica rebatida para a visualização dos pulmões.

Os pulmões dos camundongos 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.

Na sequência, a traqueia, o esôfago, o coração e os pulmões foram retirados e os tecidos limpos para remover o esôfago, tecidos linfáticos e conjuntivos anexos. O protocolo de descelularização dos pulmões inclui as etapas de coleta, limpeza, congelamento e descongelamento, lavagem com 1% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e PBS, como descrito anteriormente (da PALMA et al., 2015).

Os pulmões foram armazenados a -140°C até que iniciasse o processo de descelularização, 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, as mesmas foram conectadas ao sistema experimental de descelularização adotando a seguinte sequência de meios descelularizantes, perfundidos através da artéria pulmonar, com uma pressão constante de $\text{PPA}=20\text{ cmH}_2\text{O}$, (1) PBS 1x durante 30 minutos, (2) água deionizada durante 15 minutos, (3) 1% de SDS durante 120 min e (4) PBS durante 30 minutos. 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 $10\text{ cmH}_2\text{O}$, insuflando os pulmões a um volume fisiológico e evitando atelectasias.

Figura 2. Processo de descelularização. Desenho Experimental do Sistema de descelularização.

4.3 Análise histológica das amostras

Amostras de pulmões (controle e descelularizado) foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 48h e posteriormente desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Posteriormente foram confeccionados cortes de 5µm com auxílio do micrótomo (RM2265, Leica—Nussloch, GE) e submetidas as colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) e Ferro coloidal para a localização de possíveis núcleos celulares remanescentes na MEC. A contagem dos núcleos centrais foi realizada por meio do programa ImageJ (versão 1.39u), utilizando o plugin “cell counter”.

4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras do pulmão controle e descelularizado foram preparadas para análise no microscópio eletrônico de varredura, seguindo um protocolo padrão na preparação das amostras de tecido. As amostras foram fixadas com paraformaldeído 4% por 48 horas em temperatura ambiente, em seguida, lavadas com Água destilada em uma lavadora ultra-sônica computadorizada (UltraSonicCleaner), e desidratadas em diferentes concentrações de álcool 70% por 24h, depois álcool 80%, 90%, 100% por 10min cada, seguido de desidratações a seco em ponto crítico (Balzers CPD 020). Posteriormente o material foi colocado em um suporte metálico para revestimento em ouro (“sputtering” Emitech K550). Para observar os resultados foi utilizado o microscópio eletrônico ME Leo 435VP.

4.5 Imunohistoquímica

As amostras dos pulmões (controle e descelularizado) de camundongos foram submetidas a técnica de imunohistoquímica, incluídas em parafina, seccionadas em micrótomo (# RM2265, Leica) e transferidas para lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina (# p8920, Sigma - Saint Louis, EUA). Em seguida, as lâminas serão reidratadas e o passo de recuperação do antígeno será realizado por microondas nas lâminas em alta potência 4 vezes durante 5 minutos em tampão citrato (1,83 mM de ácido cítrico monohidratado e 8,9 mM de citrato de sódio desidratado tribásico, pH 6,0). A peroxidase endógena será

bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio em água destilada durante 30 minutos no escuro. A interação da proteína não específica será bloqueada com 2% de albumina de soro bovino, em solução tampão de fosfato (PBS, NaCl 136,9 mM, KCl 4, 8 mM, 14,8 mM de KH₂PO₄ e NaOH 8,7 mM, pH 7,2) durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas serão incubadas com anticorpos primários: anti-colágeno I (# 600-401-103S, 1: 100, Rockland - Limerick, EUA), anti-colágeno III (# sc-8779, 1: 100, Santa Cruz Biotechnology - Dallas, EUA), anti-colágeno IV (# 1-CO083-0, 1: 100, Quartett - Berlim, GE), subunidade anti-laminina alfa-2 (# bs-8561R, 1: 100, BiossAntibodies - Woburn, EUA) e anti-fibronectina (# NBP1-91258, 1: 200, NovusBiologicals - Littleton, EUA) durante a noite em câmara úmida a 4 graus Celsius. Para os controles negativos, será utilizado IgG anti-camundongo irrelevante (# M5284, Sigma) ou IgG anti-coelho (# ab27478, Abcam-Cambridge, Reino Unido) nas mesmas condições, para substituir o anticorpo primário. A reação será detectada por um kit Dako Advance HRP que incluirá o anticorpo secundário (# K6068, Dako - Carpinteria, EUA) e a cor desenvolvida com DAB (# K3468, Dako). As lâminas foram ligeiramente contra-coradas com hematoxilina. Entre cada passo após a incubação do anticorpo, as lâminas serão lavadas em PBS contendo 0,2% de BSA. Finalmente, as lâminas serão montadas e visualizadas em um microscópio Nikon Eclipse80I.

4.6 Quantificação de DNA nos pulmões descelularizados.

A coloração DAPI foi utilizada para verificar a ausência de núcleos ou DNA após o processo de descelularização. Para a coloração com DAPI, uma solução estoque de DAPI (5 mg/mL; 14,3mm para o dicloridrato ou 10,9 mm para o dilactato) foi feita pela dissolução de 10 mg de DAPI em 2 mL de água deionizada, seguindo de sonicação por 2 h.

As imagens dessas amostras mostraram que as diversas áreas da amostra estão livres de células após descelularização (URIATE JJ et al., 2018). Além disso, a quantidade de DNA restante nas amostras decelularizadas foi extraída como descrito previamente (da PALMA et al., 2015). As amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose LMP 3% com brometo de etídio a 60V por 1h, e observado com transiluminação ultravioleta.

4.7 Isolamento e cultura de células-tronco derivadas da polpa de dente.

As células-tronco derivadas da polpa dentária foram obtidas a partir de pacientes saudáveis, cedidas pela Prof. Dra. Auriléia Aparecida de Brito. Após a extração do dente, o mesmo foi mantido em um recipiente com PBS 1x uma solução de armazenamento constituído de 3 mL α MEM (Minimum Essential Medium Eagle – α modification, Sigma®, M4526) com 2% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco®, A5955), 10% de soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum, Gibco®, 10437028) e 2mM L- Glutamina (GlutaMAX™, Gibco®, 35050061) (GRONTHOS *et al.*, 2000; CAMPAGNOLI *et al.*, 2001; FRANZISKA E. UHL *et al.*, 2020). Logo após foi realizado a extração da polpa dentária, as MSCs foram separadas e purificadas por centrifugação de gradiente e transferidas para uma placa de cultura com meio constituído de α MEM (Sigma®, M4526) suplementado com 1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco®, A5955), 10% de soro fetal bovino (Fetal Clone® III, Hyclone®, SH 30109.03), 100 μ M de ácido ascórbico e 2mM L-glutamina (GlutaMAX™, Gibco®, 35050061) e mantidos em estufa incubadora a 37°C, em tensão de 5 % de CO₂ e 95% de ar atmosférico (FRANZISKA E. UHL *et al.*, 2020). O crescimento celular foi observado diariamente através de um microscópio invertido para observar suas características morfológicas, até atingirem 80% de confluência para o subcultivo e o meio de cultivo foi monitorado e trocado a cada 24 horas para a proliferação celular.

4.8 Cultivo celular de Beas-2B

As células foram cultivadas a partir da sétima passagem com meio RPMI 1640 suplementado com 15% SFB, 2mM glutamina e 1% penicilina-estreptomicina, e mantidos em estufa incubadora a 37°C, em tensão de 5 % de CO₂ e 95% de ar atmosférico (FRANZISKA E. UHL *et al.*, 2020). O crescimento celular foi observado diariamente através de um microscópio invertido para observar suas características morfológicas, até atingirem 80% de confluência para o subcultivo e o meio de cultivo foi monitorado e trocado a cada 24 horas para a proliferação celular.

4.9 Cultivo celular de A-549.

As células foram cultivadas a partir da sétima passagem com meio RPMI 1640 suplementado com 15% SFB, 2mM glutamina e 1% penicilina- estreptomicina, e mantidos em estufa incubadora a 37°C, em tensão de 5 % de CO₂ e 95% de ar atmosférico (FRANZISKA E. UHLet *al.*, 2020). O crescimento celular foi observado diariamente através de um microscópio invertido para observar suas características morfológicas, até atingirem 80% de confluência para o subcultivo e o meio de cultivo foi monitorado e trocado a cada 24 horas para a proliferação celular.

4.10 Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de dente.

Na quarta passagem as células foram retiradas para análise do grau de pureza, os resultados garantiram a caracterização fenotípica por análise de citometria de fluxo dessas células-tronco, a qual revelou a expressão de CD105 (SH2) e CD73 (SH3/4) sendo negativos para marcadores de linhagem hematopoiéticos CD34.

4.11 Cultivo de rMSCs nos pulmões descelularizados.

A recelularização pulmonar, foi realizada em três pulmões descelularizados, por um período de 7 dias, contendo, pulmão 1) Laser + 1 x 10⁶ de células-tronco, Beas- 2B e A-549; pulmão 2) CPAP + 1 x 10⁶ de células-tronco, Beas-2B e A-549; pulmão 3) CPAP + 1 x 10⁶ de células-tronco, Beas-2B e A-549 + Laser, demonstrados na figura 4. Inicialmente os pulmões foram esterilizados com álcool 70% por 60min, as células rMSCs juntamente as células Beas-2B e A-549 totalizando 1 x 10⁶ foram suspensas em 1ml de meio RPMI 1640 suplementado com 15% SFB, 2mM glutamina e 1% penicilina-estreptomicina (BONENFANT NR et al., 2013), filtradas por meio de um filtro de células de 40um para remover aglomerados de células e injetadas nos brônquios direto e esquerdo dos pulmões descelularizados utilizando um cateter de calibre 20. Os pulmões foram colocados com meio em um tubo falcon de 25mL tamanho ideal na simulação de uma caixa torácica demonstrados na figura 54, e novamente foram esterilizados com um Laser Duo de baixa intensidade por meio da irradiação em comprimento de onda de

luz vermelha 808nm, sendo aplicada por uma dose de 3 joules (30 segundos cada) demonstrado na figura 3 e 5, que também é capaz de induzir a proliferação celular, em comprimento de onda de luz infravermelho 660nm, sendo aplicada na mesma dose de 3 joules (30 segundos cada) em seguida foram deixados em uma estufa incubadora para permitir que as células sejam cultivadas a 37°C em tensão de 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico em meio de diferenciação pulmonar, totalmente selada e estéril, permanecendo por um período de cultura de 7 dias (GILPIN SE et al., 2016), mantendo um método de ventilação por pressão positiva constante de 20cmH₂O, 90% de O₂, demonstrado na figura 6 (RAREDON et al., 2016; FRANZISKA E. UHLet al., 2020). No decorrer da recelularização,.2ml de meio foram retirados e acrescentado meio novo na mesma quantidade a cada 12, 24, 48h e 7 dias para serem avaliados por meio do ELISA.

Figura 3. Laser Duo de baixa intensidade.

Figura 4. Cultivo de rMSCs nos pulmões descelularizados. **Pulmão 1)** Recelularização com Laser (●); **Pulmão 2)** Recelularização com CPAP (■); **Pulmão 3)** Recelularização com CPAP + Laser (□).

Figura 5. Esterilização e proliferação celular. Esterilização por meio da irradiação em comprimento de onda luz vermelha e proliferação celular por meio da irradiação em comprimento de onda de luz infravermelho.

Figura 6. Pressão positiva contínua nas vias aéreas (CPAP)

4.12 Avaliação dos níveis de citocinas por ELISA.

Os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ e IL-10, foram avaliados através do kit Biolegends e R&D Systems. O ELISA é abreviatura para Enzyme Linked Immunonorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática), teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos.

4.13 Mensuração do intercepto linear médio (Lm)

O intercepto linear médio é um índice do diâmetro médio dos espaços aéreos distais. Foram contados 15 campos por lâmina com aumento de 200X. Utilizando o retículo sobreposto ao parênquima pulmonar nas regiões mais periféricas do parênquima (figura 10), foram contados o número de vezes que os interceptos cruzavam as paredes dos alvéolos. Foi feita uma média dos quinze campos para cada lâmina e calculado o Lm através da seguinte equação: $Lm = 2500 \mu m / \text{média do número de vezes que os interceptos cruzaram as paredes dos alvéolos}$. O valor de 2500 μm foi obtido através da aferição do retículo utilizado, por meio de uma régua da fabricante Zeiss. O tamanho de cada segmento de reta foi medido utilizando-se a régua em um microscópio com o retículo em um aumento de 200X. A somatória de todos os segmentos do retículo resultou no valor 2500 μm .

Figura 7 ilustração de mensuração do intercepto linear médio (Lm)

4.14 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no software GraphyPad Prisma. Todos os valores foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). Os valores de comparação do grupo controle e descelularizado foram avaliados pelas médias do testes-t pareado. Foi utilizada ANOVA nas avaliações comparando grupo CPAP, LASER e CPAP+Laser durante o processo de recelularização. A significância estatística foi considerada quando o valor de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Preparação de substrato para cultura celular com matriz pulmonar.

A descellularização dos pulmões foi realizada com sucesso de acordo com o protocolo descrito nos métodos, do qual teve a duração de aproximadamente 3 a 4h. Por meio deste processo, pode-se constatar alteração na coloração do órgão, o qual passou de uma coloração avermelhada para uma coloração translúcida, (Figura 7). Os pulmões foram monitorados durante todo o processo de descellularização assegurando que a pressão constante de PPA=20 cmH₂O dos reagentes foi mantida, assim como, a pressão traqueal (transpulmonar) de 10 cmH₂O. Vale ressaltar que a descellularização foi do órgão inteiro, o que pode proporcionar a preservação da traqueia que será utilizada na conexão do biorreator para futurarecelularização.

Figura 8. Pulmão antes e após o processo de descellularização. Em **A**, pulmão nativo, em **B** pulmão após o processo de descellularização, em **C** pulmão durante o processo de descellularização.

5.2 Análise histológica das amostras.

Por meio da análise microscópica pode-se observar que após a descélularização com 1% de SDS houve a remoção de todo o material celular e que os componentes relevantes da matriz extracelular como glicosaminoglicanos e colágenos mantiveram-se preservados (Figura 8). Além disso, as estruturas alveolares e vasculares também foram preservadas.

Figura 9. Análise microscópica dos pulmões de camundongos antes e após a descélularização. Na coloração de HE, representando pulmão controle, em **A** observa-se bronquios (→), estruturas alveolares (•) e núcleos celulares (•); Na coloração de Ferro coloidal, em **B** observa-se a presença de citoplasma celular (→ em amarelo), glicosaminoglicanos (• azul) e colágeno (• roxo); Na coloração de HE, em **C** nota-se o pulmão de camundongo após a descélularização com grande remoção de núcleos celulares (→); Na coloração de Ferro coloidal, em **D** evidencia-se a presença de glicosaminoglicanos (→ azul) e colágenos (• roxo).

5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Por meio da MEV constatou-se que a integridade do septo alveolar e do parênquima pulmonar continuaram preservados e não apresentou alterações estruturais após a descelularização (Figura 9).

Figura 10. Análise por meio da Microscopia eletrônica de varredura. Em **A** pode ser observado no pulmão controle bastante preenchimento com núcleos celulares (→); Em **B** após o processo de descelularização nota -se uma grande remoção de células e ausência de núcleos celulares (→) e parênquima pulmonar preservado.

5.4 Imunohistoquímica

A análise de imunohistoquímica (Figura 10) foi realizada em amostras de pulmão de camundongo dos grupos controle e descelularizado, com intuito de avaliar a presença das proteínas presentes na matriz extracelular que se mantiveram preservadas após a descelularização (colágeno I, III e IV; fibronectina, laminina e elastina).

Figura 11. Análise de Imunohistoquímica. Em **A** e **B**, presença de colágeno I; em **C** e **D**, presença de colágeno III; em **E** e **F**, presença de colágeno IV; em **G** e **H**, presença de fibronectina; em **I** e **J**, presença de laminina; e em **K** e **L**, presença de elastina.

5.5 Quantificação de DNA nos pulmões descelularizados.

Por meio deste resultado, podemos afirmar que as diversas áreas da amostra do grupo descelularizado estão livres de células após descelularização e que evidentemente respeitou o critério de 50 nanogramas por micrômetro de tecido.

Gráfico 1. Análise da quantificação de DNA nos pulmões descelularizados

5.6 Isolamento e cultura de células-tronco derivadas da polpa de dente.

O crescimento celular foi observado diariamente através de um microscópio invertido para observar suas características morfológicas, até atingirem 80% de confluência para o subcultivo e o meio de cultivo foi monitorado e trocado a cada 24 horas para a proliferação celular (figura 12).

Figura 12. Isolamento e cultura de células-tronco derivadas da polpa de dente. Em **A** cultivo de 0 dias; em **B** cultivo de 7 dias; em **C** cultivo de 14 dias.

5.7 Cultivo celular de Beas-2B

O crescimento celular foi observado diariamente através de um microscópio invertido para observar suas características morfológicas, até atingirem 80% de confluência para o subcultivo e o meio de cultivo foi monitorado e trocado a cada 24 horas para a proliferação celular (figura13).

Figura 13. Cultivo celular de Beas-2B. Em **A** cultivo de 0 dias; em **B** cultivo de 7 dias; em **C** cultivo de 14 dias.

5.8 Cultivo celular de A-549

O crescimento celular foi observado diariamente através de um microscópio invertido para observar suas características morfológicas, até atingirem 80% de confluência para o subcultivo e o meio de cultivo foi monitorado e trocado a cada 24 horas para a proliferação celular (figura14).

Figura 14. Cultivo celular de A-549. Em **A** cultivo de 0 dias; em **B** cultivo de 7 dias; em **C** cultivo de 14 dias

5.9 Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de poupa de dente

Na análise de citometria de fluxo após o cultivo celular conseguimos garantir a caracterização fenotípica por citometria de fluxo dessas células-tronco, a qual revelou a expressão de CD105 (SH2) e CD73 (SH3/4) sendo negativos para marcadores de linhagem hematopoiéticos CD34 (figura 15).

Figura 15. Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de dente decíduo (CTMDD). Foi utilizado a passagem 4 do cultivo e o fenótipo das células mostraram que foram positivas para os marcadores mesenquimais, CD90 e CD73 (histogramas superiores), mas não expressaram os marcadores hematopoiéticos, como o CD34 (histograma inferior).

5.10 Quantificação dos níveis de citocinas, mediadores inflamatórios e quimiocinas por ELISA.

Os resultados referentes à quantificação dos níveis de IL-6, IL-8, IFN- γ e IL-10 estão representados nos gráficos abaixo. Previamente as citocinas foram avaliadas nas células isoladas e tratadas com laser. Notamos que os níveis de IL-6 ficaram estáveis durante os sete dias de cultivo, os níveis de IL-8 apresentaram redução significativa no grupo com recel+laser e aumento no grupo recel+laser+CPAP quando comparados ao grupo recel+CPAP. Os níveis de IFN- γ demonstraram diferença significativa no grupo recel+laser e recel+laser+CPAP na avaliação de 24 horas. Os níveis de IL-10 oscilaram durante as análises, em 12 horas observamos aumento no grupo recel+laser e diminuição no grupo de recel+laser+CPAP, em 24 horas houve diferença significativa apenas no grupo recel+laser+CPAP demonstrada pelo nível reduzido, em sete dias os grupos irradiados com laser apresentaram aumento nos níveis de IL-10.

Figura 16. Efeito do CPAP e do laser de baixa intensidade na recelularização pulmonar sobre os níveis de IL-6 24hs, IL-8 24hs, IFN-γ 24hs e IL-10 24 hs no sobrenadante de cultivo celular de linhagem celular de BEAS, A549 e célula-tronco de polpa de dente.

Figura 17. Efeito do CPAP e do laser de baixa intensidade na recelularização pulmonar sobre os níveis de IL-6 12hs (A), IL-6 24hs (B), IL-6 48hs (C) e IL-6 7 dias (D) no sobrenadante de cultivo celular. Valores expressos com média e desvio padrão. ** $p < 0,01$ quando comparados ao grupo Recel+CPAP.

Figura 18. Efeito do CPAP e do laser de baixa intensidade na recelularização pulmonar sobre os níveis de IL-8 12hs (A), IL-8 24hs (B), IL-8 48hs (C) e IL-8 7 dias (D) no sobrenadante de cultivo celular. Valores expressos com média e desvio padrão. ^φ $p < 0,001$ quando comparados ao grupo Recel+CPAP; ^{*} $p < 0,05$ e ^{***} $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Recel+laser.

Figura 19. Efeito do CPAP e do laser de baixa intensidade na recelularização pulmonar sobre os níveis de IFN- γ 12hs (A), IFN- γ 24hs (B), IFN- γ 48hs (C) e IFN- γ 7 dias (D) no sobrenadante de cultivo celular. Valores expressos com média e desvio padrão. ϕ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Recel+CPAP; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Recel+laser.

Figura 20. Efeito do CPAP e do laser de baixa intensidade na recelularização pulmonar sobre os níveis de IL-10 12hs (A), IL-10 24hs (B), IL-10 48hs (C) e IL-10 7 dias (D) no sobrenadante de cultivo celular. Valores expressos com média e desvio padrão. ϕ $p < 0,001$, Δ $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo Recel+CPAP; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo Recel+laser.

5.11 Contagem das células

Como demonstrado na figura 15, em relação à contagem de células, os grupos não apresentaram diferenças.

Figura 21. Análise microscópica dos pulmões de camundongos antes e após a revascularização sobre a contagem de células. Na coloração de HE.

Gráfico 2. Análise da contagem de células

5.12. Quantificação do diâmetro alveolar médio (Lm).

Os resultados da quantificação do intercepto linear médio estão representados na Figura 17. Podemos observar que todos os grupos apresentam diâmetro alveolar regulares.

Gráfico 3. Análise da quantificação do diâmetro alveolar médio (Lm).

Figura 22. Efeito do CPAP e do laser de baixa intensidade na recelularização pulmonar sobre o diâmetro alveolar médio (Lm). Valores expressos como média e desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

A produção de biomateriais tem se mostrado uma técnica promissora, por meio das diversas abordagens nos processos de descelularização, hoje pode-se afirmar que diante da bioengenharia de órgãos e tecidos é possível obter um *scaffold* biológico com a capacidade de retomar as funções fisiológicas e adequadas para consequentemente realizar um transplante (GILPIN et al., 2016).

Considerando que nos últimos anos as doenças pulmonares, principalmente a doença pulmonar obstrutiva crônica DPOC vem sendo uma das principais causas para o transplante pulmonar no mundo, representando aproximadamente um terço de todos os transplantes de pulmão realizados (ROBERT et al., 2018) a bioengenharia pulmonar é uma alternativa com muita potencialidade. Entretanto, existem algumas limitações como rejeição celular e o número de candidatos na lista de espera que ultrapassam a oferta de pulmões disponíveis, porém, estas limitações podem ser reduzidas significativamente com os grandes avanços na medicina regenerativa, devido a capacidade de fornecer uma grande fonte de órgãos. (YAMADA et al., 2018; WELMAN et al., 2015).

Dessa forma, conseguimos obter um *scaffold* biológico por meio das técnicas de descelularização que temos descritos na literatura, através da traqueia (NONAKA et al., 2014) e da artéria pulmonar (da PALMA et al., 2015), ambos os métodos são eficientes, porém o protocolo de descelularização utilizado neste estudo foi realizado através da artéria pulmonar devido a agilidade no processo em que pode ser finalizado com uma média de 3 a 4 horas, além disso, este protocolo permite o controle da pressão de perfusão na artéria pulmonar, podendo impedir que ocorra um barotrauma no arcabouço pulmonar. Acrescenta-se também a fácil regulação da pressão, a qual foi mantida em uma pressão fisiológica de 20cmH₂O (da PALMA et al., 2015).

Notavelmente os pulmões foram descelularizados com eficiência, resultando em *scaffolds* biológicos com todo conteúdo celular removido e uma matriz extracelular preservada e translúcida com a perfusão do agente químico SDS, cujo detergente iônico com a capacidade de remover as células sem induzir alterações significativas nas propriedades micromecânicas de pulmões

acelulares (MELO et al., 2014).

Após o processo de descelularização, foram realizadas as análises dos *scaffolds* pulmonares bem como dos pulmões nativos, podendo observar e comprovar a efetividade do processo, com ausência de núcleos celulares e a preservação dos componentes relevantes da matriz extracelular, sendo eles, colágeno I, III e IV; fibronectina, laminina e elastina, além de identificar glicosaminoglicanos e estruturas alveolares e vasculares dos pulmões. Ambos foram analisados por meio de colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) e Ferro coloidal, Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Imunohistoquímica. Além disso, temos também os resultados da quantificação de DNA que nos confirmou que diversas áreas da amostra do grupo descelularizado estão livres de células após descelularização, cujo resultado evidentemente respeitou o critério de -50 nanogramas por micrômetro de tecido. Estes resultados estão dentro dos critérios sugeridos para uma descelularização bem sucedida, incluindo ausência de conteúdo celular (URIATE JJ et al., 2018).

Trabalhos recentes mostraram benefícios potenciais com células-tronco mesenquimal (MSCs) que podem ser isoladas de um paciente, de fontes como polpa de dente e expandidas em cultura para números fisiologicamente relevantes, além da sua morfologia fibroblástica e auto-renovação, e de sua plena capacidade de se diferenciar em vários tipos de células, e de demonstrarem também que as MSCs se ligam a estruturas pulmonares independentemente do método de descelularização, método de esterilização, tempo de armazenamento ou estado de doença, sugerindo que as MSCs tenham ampla gama de aplicação na recelularização (BONENFANT NR et al., 2013; SCARRITT ME et al., 2014; SMITH LR et al., 2018) tornando-se então uma fonte celular fisiologicamente relevante neste processo.

Some-se a isto os estudos que mostraram bons resultados na recelularização com célula epitelial pulmonar, assim como células humanas em pulmões de rato descelularizados, apresentando capacidade de semear diferentes compartimentos (vias aéreas x vasculatura), além de contribuir fornecendo importantes informações quanto ao biorreator (URIATE JJ et al., 2018; SCARRITT ME et al., 2018). Nesse caso, acrescenta-se as células epiteliais Beas-2B e epitelial alveolar humana A-549 que foram usadas juntamente as células-tronco na recelularização dos pulmões.

Acrescenta-se também os estudos apresentando excelentes resultados com laser de baixa intensidade, capaz de modular o crescimento, viabilidade e diferenciação celular, assim como induzir o aumento da proliferação celular, auto-renovação, sobrevivência e angiogênese, além de auxiliar na interação em um modelo experimental de recelularização, bem como a esterilização do pulmão, além de induzir a ativação de cromóforos intracelulares e extracelulares e o início da sinalização celular. Esses efeitos quando irradiados pelo laser de baixa intensidade apresentam resultados bastante benéficos e promissores na recelularização (AHRABI B et al., 2019; KHORSANDI K et al., 2020).

Sendo assim, por meio destes dados, realizamos a recelularização pulmonar com esperança de uma menor probabilidade de rejeição. A simulação de um biorreator foi feita com base no que já temos descritos na literatura, apresentando pequenas modificações, mas ainda capaz de aplicar condições de ventilação, perfusão e oxigenação, facilitando a migração, adesão célula-MEC, proliferação e diferenciação das células-tronco sementeadas em um *scaffold* acelular do pulmão (NONAKA PM et al., 2016; MICHELLE E. SCARRITT et al., 2018).

A recelularização pulmonar, foi realizada em três pulmões descelularizados, por um período de 7 dias, contendo, pulmão 1) Laser + 1×10^6 de células-tronco, Beas- 2B e A-549; pulmão 2) CPAP + 1×10^6 de células-tronco, Beas-2B e A-549; pulmão 3) CPAP + 1×10^6 de células-tronco, Beas-2B e A-549 + Laser. Durante a recelularização, os pulmões ficaram submersos no meio de cultura celular, fornecendo nutrientes para as células durante todo o processo, recebendo uma pressão positiva contínua nas vias aéreas (CPAP) de 20cmH₂O por meio de um cateter nasal, que foi dividido para os dois pulmões (Recelularização + CPAP e Recelularização + CPAP + Laser) assim acreditamos que houve uma melhor suspensão e viabilidade de células nos pulmões (SCARRITT ME et al., 2018; GILPIN SE et al., 2016). Devido a dificuldades de esterilização relatadas por alguns autores, ainda não se tem um protocolo eficiente de esterilização, porém acreditamos que o LBI possa além de auxiliar na proliferação celular por meio da irradiação em comprimento de onda de luz infravermelho, também possa auxiliar na esterilização por meio da irradiação em comprimento de onda de luz vermelha, então os pulmões foram

esterilizados com álcool 70% e por meio do laser de baixa intensidade, sendo aplicados nos grupos (Recelularização com CPAP + Laser e Recelularização com laser). Portanto produzimos um *scaffold* viável para a recelularização, e utilizamos coletas seriadas do meio de cultura presente para análise de citocinas inflamatórias.

As evidências experimentais existentes apoiam a ideia de que o microambiente físico contribui significativamente para a modulação da diferenciação de células-tronco. Para que essas células sejam levadas a um destino apropriado, é necessária a coordenação de sinais indutivos, e vários fatores físicos - especificamente a suavidade ou rigidez do microambiente, que também podem contribuir para a diferenciação. Importante ressaltar que as células-tronco mesenquimais humanas foram as primeiras células-tronco usadas para demonstrar a influência *in vitro* da rigidez da matriz na diferenciação de células-tronco, elas também podem reorganizar e sintetizar sua MEC, o que cria um nicho local e adiciona heterogeneidade mecânica.

Nos tecidos, os componentes da MEC geralmente interagem com as células epiteliais, servindo como ligantes para transmitir sinais para regular a adesão, migração, proliferação, apoptose, sobrevivência ou diferenciação. Além disso, eles podem liberar fatores de crescimento e outras moléculas de sinalização que regulam o comportamento das células, assim como as proteínas existentes na MEC também conferem estrutura e mecânica, e ela também atua como depósito de fatores de crescimento semi-solúveis, alguns dos quais dependem das propriedades mecânicas da MEC para liberação, além de poder recuperar totalmente sua forma e exibir elasticidade. Para que as células sintam seu microambiente mecânico, elas devem aplicar uma força nesse ambiente, essas forças celulares são geradas, pelo menos em parte, pelos mini-filamentos de miosina II, que puxam o citoesqueleto de actina e as aderências para impulsionar a contração celular e da MEC, sempre lembrando que a composição e a topografia da MEC pulmonar mudam ao longo do desenvolvimento do pulmão e são muito heterogêneas, dependendo da localização (por exemplo, próximas aos brônquios, no septo alveolar, na pleura etc.) e do estágio de desenvolvimento (por exemplo, estágio sacular x septação alveolar precoce vs pulmão adulto maduro), (SMITH LR et al., 2018; MOURAUX SMD et al., 2018).

De fato, sabemos que a MEC é submetida a remodelação dinâmica durante o desenvolvimento, inflamação, cicatrização de feridas e doenças, mas ainda assim, o que devemos levar em consideração para evitar uma suposta rejeição ? Foi sugerido como resposta que a célula T própria do hospedeiro reconheceria o antígeno apresentado pelo órgão transplantado, porém não existe reconhecimento de antígeno se não houver compatibilidade entre TCR (receptor de célula T) e MHC (complexo principal de histocompatibilidade). Para que uma célula seja ativada e regulada via reconhecimento antigênico é necessário que o antígeno e o MHC sejam reconhecidos pela célula T. Entretanto em transplantes sem relação sanguíneo é extremamente difícil encontrar essa compatibilidade entre TCR e MHC (SCARRITT ME et al., 2018; ITO JT et al., 2019).

Nós não reconhecemos a MHC de outras pessoas, é a ausência de reconhecimento da MHC que ativa as células T, ou seja, a célula T é ativada independente da apresentação de antígeno, pois ela não o reconhece. Para haver reconhecimento é necessário haver MHC próprio e antígeno estranho, a presença de Ag próprio no MHC próprio e não ativa RI. A presença de MHC estranho ao TCR gera resposta. Não existe reconhecimento de TCR com um MHC diferente dos nossos MHC próprios. Por isso que esse é o principal mecanismo de rejeição, é a incompatibilidade dos alelos de MHC ou os tipos de MHC circulantes, por essa razão as primeiras opções de transplantes são sempre parentais (os MHC são as únicas moléculas do sistema imune que são expressas no fenômeno de codominância, ou seja, tanto o alelo materno quanto o paterno são expressos no indivíduo. A rejeição é baseada na ausência de reconhecimento de TCR com o MHC do órgão transplantado. Não havendo essa compatibilidade ocorre a rejeição. A imunologia do transplante vai levar em consideração a compatibilidade imunogenética entre doadores e receptores.

O MHC é denominado no ser humano como Sistema HLA (humanleukocyteantigen) MHC (ou HLA) é o principal responsável pela rejeição de transplantes. Está envolvido nos mecanismos de reconhecimento celular e regulação da resposta imunológica, ou seja, a rejeição é o reflexo da resposta imunológica envolvendo, na maioria das vezes, os antígenos HLA do órgão transplantado. As glândulas submucosas mantêm seu MHC apesar da

descelularização, contribuindo para a proliferação de células T. Já a recelularização provoca um processo imunomodulador ativo envolvendo células T reguladoras de CD4+CD25+Foxp3. A presença de MSC, TEC ou ambos permitiram prolongar a integridade da cartilagem. A compreensão dos mecanismos subjacentes à interação entre o sistema imunológico e os aloenxertos descelularizados e recelularizados será importante para a aplicação clínica de estes andaimes biológicos sem a necessidade de terapias imunossupressoras.

Como já descrito na literatura, a fotobiomodulação tem o potencial de diminuir a gravidade da doença através da regulação positiva da liberação de IL-10. Dessa maneira, alguns autores sugerem que as células T Foxp3+ parecem ser as responsáveis pela diminuição da gravidade da doença observada em camundongos que receberam terapia de luz. De fato, alguns estudos apontam que um possível mecanismo para efeitos moduladores do LBI no pulmão, via liberação de IL-10. Trabalhos do nosso grupo com laser e células-tronco mesenquimais em modelo experimental de DPOC, apresentaram tanto a expressão como os níveis de IL-10 aumentados no pulmão (PERON et al., 2015; MORAES et al., 2018). Os resultados do atual trabalho demonstraram a atividade da citocina IL-10 aumentada após a irradiação com laser. No presente estudo notamos que após 7 dias esse fenômeno foi observado em ambos os grupos onde o laser foi aplicado.

As células-tronco mesenquimais também ganharam evidência terapêutica, pelo seu potencial em atenuar a inflamação, diminuindo os níveis de mediadores inflamatórios, tais como LTB₄, TNF- α , IL-8, redução da apoptose, melhora na reparação do parênquima e aumento na perfusão pulmonar, além disso diferentes moléculas como citocinas, fatores de crescimento e componentes da própria MEC podem influenciar a atividade dessas células (HUH et al., 2011; ITO JT et al., 2019). As células epiteliais das vias aéreas humanas A-549 também se destacam, pois são capazes de produzir fator de crescimento nervoso (NGF), o efeito da citocina pró-inflamatória IL-1B na secreção de NGF foi estudado e quantificado por Pons e colaboradores (2001) por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA) e comprovado que as células A-549 produziram e segregaram NGF. Corroborando com os estudos da literatura, nossos resultados em ambos os

tratamentos, com LBI, MSCs ou associados, mostraram tentativa de reparo no tecido pulmonar devido a atividade dessas citocinas. Os resultados demonstraram através das citocinas inflamatórias uma resposta satisfatória da recelularização.

Alguns trabalhos mostraram que as CTMs são capazes de diminuir a inflamação, remodelamento e promover o reparo epitelial das vias aéreas, levando a melhora em função pulmonar, em modelo experimental de asma. Sugerindo que um dos possíveis mecanismos de ação das células-tronco, seria via o aumento na liberação de mediadores anti-inflamatórios, como IFN- γ e IL-10. Corroborando com esses resultados nossos dados demonstraram a atividade desses mediadores nos pulmões recelularizados. Estudos complementares devem ser realizados para elucidar novas hipóteses que surgiram nesse estudo.

7 CONCLUSÕES

Por fim, podemos concluir com a padronização do protocolo de descelularização dos pulmões de camundongos com detergente iônico SDS 1% resultando em *scaffolds* biológicos com todo conteúdo celular removido e uma matriz extracelular preservada, translúcida e sem alterações significativas nas propriedades da matriz extracelular (colágeno I, III e IV; fibronectina, laminina e elastina) de pulmões acelulares, respeitando o critério de - 50 nanogramas por micrômetro de tecido. Estes resultados estão dentro dos critérios sugeridos para uma descelularização bem sucedida, incluindo ausência de conteúdo celular.

O isolamento e cultura de células-tronco derivadas da polpa de dente revelou a expressão de CD105 (SH2) e CD73 (SH3/4) sendo negativos para marcadores de linhagem hematopoiéticos CD34, por meio da análise de citometria de fluxo, o cultivo com células epiteliais Beas-2B e epitelial alveolar humana A-549 que foram usadas juntamente as células-tronco na recelularização dos 3 pulmões descelularizados, nos permitindo compreender melhor os mecanismos biofísicos básicos que participam na regeneração pulmonar utilizando um gerador de fluxo contínuo com pressão positiva e um Laser duo de baixa intensidade que participam na regeneração pulmonar utilizando um biorreator.

Os resultados obtidos estão fornecendo o conhecimento científico básico e contribuindo para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas ferramentas terapêuticas na medicina respiratória, além de aprimorar o nosso conhecimento sobre as tecnologias específicas envolvidas em biorreatores para a medicina regenerativa.

Por fim, nossos resultados demonstram que as terapias com laser e CPAP, modularam os níveis de citocina e previniram a contaminação. Um possível mecanismo poderia ser o aumento de IL-10 no pulmão, dados que merecem atenção em análises futuras, ressaltamos a importância do uso da fotobiomodulação para esterilização do pulmão e modulação das citocinas na remodelação pulmonar.

8 REFERÊNCIAS

AHRABI B, TAVIRANI MR, KHORAMGAH MS et al. The Effect of Photobiomodulation Therapy on the Differentiation, Proliferation, and Migration of the Mesenchymal Stem Cell: A Review. J Lasers Med Sci. 2019 Autumn; 10(Suppl 1): S96–S103.

ANNABI B, LEE Y, TURCOTTE S et al. Hypoxia Promotes Murine Bone-Marrow-Derived Stromal Cell Migration and Tube Formation. Stem Cells. 2003;21:337–347.

BADYLAK SF, FREYTES DO, GILBERT TW. Extracellular matrix as a biological *scaffold* material: Structure and function. Acta Biomaterialia 2009; 5:1–13.

BADYLAK SF, TAYLOR D, UYGUN K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix *scaffolds*. Annual review of biomedical engineering 2011;13:27-53.

BADYLAK SF. The extracellular matrix as a *scaffold* for tissue reconstruction. Cell & Developmental Biology 2002; 13: 377–383.

BADYLAK SF, WEISS DJ, CAPLAN A et al. Engineered whole organs and complex tissues. Lancet 2012; 379 (9819): 943-52.

BELLEZZIA MA, CRUZ FF, MARTINS V et al. Impact of different intratracheal fluxes during pulmonary decellularization on the composition and mechanics of the extracellular matrix. Regen Med. 2018; 13 (5): 519-530.

BONENFANT NR, SOKOCEVIC D, WAGNER DE ,et al. The effects of storage and sterilization on decellularized and recellularized whole lung. Biomaterials 2013; 34:3231–3245.

BOONEN KJ, Langelaan MLP, Polak RB et al. Effects of a combined mechanical stimulation protocol: Value for skeletal muscle tissue engineering. *J Biomech.* 2010; 43: 1514-21.

BURDICK JA, Vunjak-Novakovic G et al. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue Eng Part A.* 2009;15:205-19.

CARRERAS A, Rojas M, Tsapikouni T et al. Obstructive apnea induce early active ation of mesenchyma lstem cells and enhancement of endothelial wound healing. *Respir Res.* 2010;11:91.

CORAUX C, Nawrocki-Raby B, Hinnrasky J et al. Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol.*2004;32:87-92.

CORTIELLA J, Nichols JE, Kojima K et al. Tissue-engineered Lung: An in Vivo and in Vitro Comparison of Polyglycolic Acid and Pluronic F-127 Hydrogel/Somatic Lung Progenitor Cell Constructs to Support Tissue Growth. *Tissue Eng* 2006 May;12(5):1213-25.

CORTIELLA J, Niles J, Cantu A, et al. Influence of Acellular Natural Lung Matrix on Murine Embryonic Stem Cell Differentiation and Tissue Formation. *Tissue Eng Part A.* 2010 Aug;16(8):2565-80.

DALY AB, Wallis JM, Borg ZD, et al. Initial Binding and Recellularization of Decellularized Mouse Lung Scaffolds With Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(1-2):1-16.

DA PALMA RK, CAMPILLO M, URIARTE JJ et al. Pressure- And Flow-Controlled Media Perfusion Differently Modify Vascular Mechanics in Lung Decellularization. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015 Sep;49:69-79.

DEQUACH JA, Mezzano V, Miglani A et al. Simple and High Yielding Method for Preparing Tissue Specific Extracellular Matrix Coatings for Cell Culture. *PLoSOne.* 2010;5(9):e13039.

EISNER MD, Anthonisen N, Coultas D et al. An Official American Thoracic Society Public Policy Statement: Novel Risk Factors and the Global Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010;182(5):693-718.

ENGLER AJ, Sen S, Sweeney HL et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126:677-89.

EZASHI T, Das P, Roberts RM. Low O₂ Tensions and the Prevention of Differentiation of hES Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 29;102(13):4783-8.

GARRETA E, Genové E, Borrós S et al. Osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts in a three-dimensional self-assembling peptide *scaffold*. *Tissue Eng*. 2006;12:2215-27.

GHAZANFARI S, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA. Effects of Cyclic Stretch on Proliferation of Mesenchymal Stem Cells and Their Differentiation to Smooth Muscle Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 23;388(3):601-5.

GILBERT TW, Gilbert S, Madden M et al. Morphologic Assessment of Extracellular Matrix Scaffolds for Patch Tracheoplasty in a Canine Model. *Ann Thorac Surg* 2008;86:967–74.

GILBERT TW, NIEPONICE A, SPIEVACK AR, et al. Repair of the Thoracic Wall With an Extracellular Matrix Scaffold in a Canine Model. *J Surg Res*. 2008 Jun 1;147(1):61-7.

GILBERT TW, SELLARO TL, BADYLAKA SF. Decellularization of Tissues and Organs. *Biomaterials* 2006; 27:3675–3683.

GILPIN SE, Charest JM, Ren X et al. Bioengineering lungs for transplantation.

Thorac Surg Clin 2016;26:163-171.

GILPIN SE, Charest JM, Ren X et al. Regenerative potential of human airway stem cells in lung epithelial Engineering. Biomaterials 2016;108:111-119.

GIRARD ED, Jensen TJ, Vadasz SD et al. Automated procedure for biomimetic de-cellularized lung *scaffold* supporting alveolar epithelial transdifferentiation. Biomaterials 2013;34(38):10043-55.

GUYETTE JP, Gilpin SE, Charest JM et al. Perfusion decellularization of whole organs. Nat Protoc 2014;9(6):1451-68.

HAUTE LV, BLOCK G, LIEBAERS I et al. Generation of Lung Epithelial-Like Tissue From Human Embryonic Stem Cells Respir Res. 2009;10:105.

Ito JT, Lourenço JD, Righetti RF et al. . Extracellular Matrix Component Remodeling in Respiratory Diseases: What Has Been Found in Clinical and Experimental Studies? Cells 2019, 8, 342;

JACOT JG, Martin JC, Hunt DL. Mechanobiology of Cardiomyocyte Development. J Biomech. 2010;43:93-8.

JENSEN T, Roszell B, Zang F et al. A rapid lung de-cellularization protocol supports embryonic stem cell differentiation in vitro and following implantation. Tissue EngPart C Methods 2012; 18:632–646.

KHORSANDI K, HOSSEINZADEH R, ABRAHAMSE H et al. Biological Responses of Stem Cells to Photobiomodulation Therapy Curr Stem Cell Res Ther. 2020 Feb 4.

LOPEZ AD, Shibuya K, Rao C et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. Eur Respir J. 2006 Feb;27(2):397-412.

MACCHIARINI P, Jungebluth P, Go T et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. Lancet 2008;372:2023-30.

MELO E, Garreta E, Luque T, et al. Effects of the decellularization method on the local stiffness of acellular lungs. Tissue Eng Part C Methods 2014;20(5):412-22.

MENDEZ JJ, GHAEDI M, STEINBACHER D et al. Epithelial cell differentiation of human mesenchymal stromal cells in decellularized pulmonary arteries. *Tissue Eng Part A*. 2014 Jun; 20 (11-12): 1735-46.

NICHOLS JE, CORTIELLA J. Engineering of a Complex Organ: Progress Toward Development of a Tissue-Engineered Lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Aug 15;5(6):723-30.

NICHOLS JE, NILES J, RIDDLE M et al. Production and evaluation of decellularized human lung and porcine *scaffolds*. *Tissue Eng Part A*. 2013 Sep; 19 (17-18): 2045-62.

NONAKA PN, URIARTE JJ, CAMPILLO N et al. Mechanical Properties of Mouse Lungs Along Organ Decellularization by Sodium Dodecyl Sulfate. *Respir Physiol Neurobiol*. 2014 Aug 15;200:1-5.

NONAKA PN, URIARTE JJ, CAMPILLO N et al. Lung bioengineering: physical stimuli and stem/progenitor cell biology interplay towards biofabricating a functional organ. *Respiratory Research* (2016) 17:161

O'Neill JD, Anfang R, Anandappa A et al. Decellularization of human lung and swine tissues for lung tissue engineering. *Ann Thorac Surg*. Setembro de 2013; 96 (3): 1046-55

OTT HC, Clippinger B, Conrad C et al. Regeneration and Orthotopic Transplantation of a Bioartificial Lung. *Nature medicine* 2010;16(8):927-33.

OTT HC, Matthiesen TS, Goh S et al. Perfusion-decellularized Matrix: Using Nature's Platform to Engineer a Bioartificial Heart. *Nature medicine* 2008;14(2):213-21.

PETERSEN TH, Calle EA, Zhao L et al. Tissue engineered lungs for in vivo implantation. *Science* 2010;329(5991):538- 41.

PONS F, Freund V, Kuissu H et al. Nerve Growth Factor Secretion by Human Lung Epithelial A549 Cells in Pro- And Anti-Inflammatory Conditions. *Eur J Pharmacol*. 2001 Oct 12;428(3):365-9.

POPOV BV, Serikov VB, Petrov NS et al. Lung Epithelial Cells Induce Endodermal Differentiation in Mouse Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells by Paracrine Mechanism. *Tissue Eng*. 2007 Oct;13(10):2441-50.

PRADO-LOPEZ S, Conesa A, Armiñán A et al. Hypoxia Promotes Efficient Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Functional Endothelium. *Stem Cells*. 2010;28:407-18.

PRAKASH YS, TSCHUMPERLIN DJ, STENMARK KR. Bioengineering the Lung: Molecules, Materials, Matrix, Morphology, and Mechanics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309: L625–L638, 2015.

PRICE AP, England KA, Matson AM et al. Development of a Decellularized Lung Bioreactor System for Bioengineering the Lung: The Matrix Reloaded *Tissue engineering Part A*. 2010;16(8):2581-91.

PUIG F, Rico F, Almendros I et al. Vibration enhances interleukin-8 release in a cell model of snoring- induced airway inflammation. *Sleep*. 28:1312-1316,2005.

QIAN H, Yang H, Xu W et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Rat Acute Renal Failure by Differentiation Into Renal Tubular Epithelial-Like Cells. *Int J Mol Med*. Setembro de 2008; 22 (3): 325-32.

RAREDON MSB, ROCCO KA, GHEORGHE CP et al. Biomimetic Culture Reactor for Whole-Lung Engineering. *Bio Research*. 2016 abr 1;5(1):72-83.

REED RM, CABRAL HJ, DRANSFIELD MT et al. Survival of lung transplant candidates with COPD. *Chest* 2018;153(3):697-701.

SCARRITT ME, BONVILLAIN RW, BURKETT BJ, et al. Hypertensive rat lungs retain hallmarks of vascular disease upon decellularization but support the growth of mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2014 May; 20 (9- 10): 1426-43.

SCARRITT ME, PASHOS NC, MOTHERWELL JM et al. Re-endothelialization of Rat Lung Scaffolds Through Passive, Gravity-Driven Seeding of Segment-Specific Pulmonary Endothelial Cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12: e786–e806.

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.

SMITH LR, CHO S, DISCHER DE. Stem Cell Differentiation Is Regulated by Extracellular Matrix Mechanics. *Physiology (Bethesda)*. 2018 Jan 1;33(1):16-25.

SONG JJ, KIM SS, LIU Z et al. Enhanced in vivo function of bioartificial lungs in rats. *Ann Thorac Surg*.2011;92(3):998-1005.

STOLBERG S, McCloskey KE. Canshear stress direct stemcellfate? *Biotechnol Prog*. 2009; 25:10-9.

TAN W, DESAI TA. Microscale multilayer cocultures for biomimetic blood vessels. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Feb 1;72(2):146-60.

TREPAT X, GRABULOSA M, PUIG F, et al. Viscoelasticity of Human Alveolar Epithelial Cells Subjected to Stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 287: L1025-34.

TREPAT X, PUIG F, GAVARA N et al. Effect of Stretch on Structural Integrity and Micromechanics of Human Alveolar Epithelial Cell Monolayers Exposed to Thrombin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290:L1104-10.

URIATE JJ, E UHL FE, ENES SER et al. Lung bioengineering: advances and challenges in lung decellularization and recellularization. WoltersKluwer Health, Inc. All rights reserved. 2018;1087-2418.

URIATE JJ, NONAKA PN, CAMPILLO N et al. Mechanical properties of acellular mouse lungs after sterilization by gamma irradiation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 40 (2014) 168–177.

WAGNER DE, BONENFANT NR, SOKOCEVIC D et al. Three-dimensional Scaffolds of Acellular Human and Porcine Lungs for High Throughput Studies of Lung Disease and Regeneration. *Biomaterials* 2014 Mar;35(9):2664-79.

WAGNER DE, NICHOLAS R, BONENFANT R et al. Comparative decellularization and recellularization of normal versus emphysematous human lungs. *Biomaterials* 2014;35(10):3281-97.

WANG H, RIHA GM, YAN S, et al. Shear Stress Induces Endothelial Differentiation From a Murine Embryonic Mesenchymal Progenitor Cell Line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:1817–1823.

WANG Y, SUN Z, QIU X et al. Roles of Wnt/beta-catenin Signaling in Epithelial Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Dec 25;390(4):1309- 14.

WELMAN T, Michel S, Segaren N et al. Bioengineering for Organ Transplantation: Progress and Challenges. *Bioengineered* 2015;6:5, 257-261.

WION D, SANDEN BVD, DHOB M, François Berger, et al. PO(2) matters in stem cell culture. *Cell Stem Cell.* 2009;5:242-3.

WIPFF PJ, MAJD H, ACHARYA C et al. The covalent attachment of adhesion molecules to silicone membranes for cells stretching applications.

Biomaterials. 2009 Mar;30(9):1781-9.

XU Y, MALLADI P, CHIOU M, et al. In Vitro Expansion of Adipose-Derived Adult Stromal Cells in Hypoxia Enhances Early Chondrogenesis. Tissue Eng. 2007;13:2981–2993.

YAMADA Y, LANGNER T, INCI I et al. Impact of Human Leukocyte Antigen Mismatch on Lung Transplant Outcome. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2018 May 1;26(5):859-864.

YUSEN RD, Shearon TH, Qian Y et al. Lung transplantation in the United States, 1999–2008. Am J Transplantation 2010;10(2):1047–106.