UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

WONER MION

Descelularização de traqueia suína utilizando equipamento multifuncional

São Carlos
2020

WONER MION

Descelularização de traqueia suína utilizando equipamento multifuncional

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Mion, Woner

Descelularização de traqueia suína utilizando equipamento multifuncional / Woner Mion; orientador Francisco Eduardo Gontijo Guimarães - versão corrigida -- São Carlos, 2020.

97 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Traqueia. 2. Descelularização. 3. Equipamento multifuncional. 4. Photodithazine. I. Guimarães, Francisco Eduardo Gontijo, orient. II. Título.

Há uma frase que diz que “Atrás de um grande
homem existe uma grande mulher”.

Creio que na verdade só existi um homem se ele
tiver uma grande mulher.

Muito obrigado pela paciência, compreensão,
carinho e pelo apoio incondicional para terminar
este trabalho. Te amo Vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida e pela possibilidade de finalizar mais uma etapa da minha vida, assim como faço justos agradecimentos aos Orixás, em especial a São Cosme, Damião e Doum.

Em especial agradeço minha mãe pelo grande esforço que fez para proporcionar-me a vida. Por isso dedico essa frase em homenagem ao seu esforço: *“Vim, vi, venci”*.

Agradeço ao meu amigo Carlos e sua mãe Adelina pelo incentivo árduo do meu ingresso em da faculdade até a pós-graduação.

Meus sinceros agradecimentos:

A Profa. Dra. Elenice Deffune que acreditou na minha pessoa e proporcionou a realização deste trabalho, além de exercer com maestria a função de ensinar.

Ao Prof. Vanderlei Bagnato, juntamente com o Prof. Dr. Ney Lemke, que sempre estiveram dispostos a me auxiliar nas dificuldades.

Aos colegas da IV turma de Física-Médica, em especial a Angelo Biasi Govone, o qual participou conjuntamente nesta pesquisa e a Thiago Revers Dreyer que me aturou estes anos de convívio.

A Equipe do Laboratório de Engenharia Celular – Tata, Daniel, Renan, agradeço pela imensa colaboração de todos no desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, não menos importante, agradeço ao meu pai que mesmo de longe sempre depositou sua confiança a mim. Por isso dedico essa frase a ele: *“Quem não compreende um olhar, tampouco compreenderá uma longa explicação.”*

A persistência é o caminho do êxito.

Charlie Chaplin.

RESUMO

MION, W. **Descelularização de traqueia suína utilizando equipamento multifuncional.** 97 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Problemas traqueais oriundos de estenoses adquiridas ou congênitas, processos traumáticos, câncer e infecção continuam sendo um grande problema para medicina. A produção de órgãos descelularizados por bioengenharia tecidual e Medicina Regenerativa vêm crescendo como uma tentativa de solucionar esta problemática. O objetivo desta pesquisa foi elaborar um equipamento multifuncional para realização de todos os processos de descelularização com intuito de garantir arcabouços com padrões de qualidade aceitáveis e reprodutíveis, quanto as características mecânicas e físico-químicas, para futura semeadura de células e implante. Foram realizados 9 protocolos de descelularização em traqueias de suínos (*Large White*) com 15 cm dos quais 4 cm foram reservados como grupo controle. Os grupos foram divididos segundo exposição ou não a luz LED ($450\text{nm} \pm 20\text{nm}$ - 90 J/cm^2), com tratamento ou não de Photodithazine (PDZ) ($5\mu\text{g/ml}$ ou $20\mu\text{g/ml}$), submetidos a 1 ciclo (24hs) ou 2 ciclos (48hs) de descelularização. Todos grupos foram submetidos a tratamento com detergente iônico (SDS a 4%) e ultrassom (52kHz) durante os ciclos. Os resultados com 48 horas foram superiores aos de 24 horas. A associação da ação luz com tratamento de PDZ, em 1 ciclo, não foi superior ao emprego apenas do fotossensibilizador sendo que ambos os testes tiveram valores similares quanto a redução do DNA no tecido traqueal, 61,3 e 60,81%. O mesmo foi evidenciado com 2 ciclos, redução de DNA de 76,79% para associação da ação da luz com tratamento de PDZ e somente tratamento de PDZ, com redução em 70,67%. O tratamento com PDZ a $20 \mu\text{g/ml}$, com 1 ciclo, apresentou resultados mais expressivos com queda de 75,09% de DNA. Com isto inferimos que o fotossensibilizador possui papel determinante na descelularização celular com caráter dose dependente. Não observamos em nenhum protocolo diferença na concentração de colágeno e glicosaminoglicanos, além dos grupos manterem as propriedades biomecânicas. O equipamento multifuncional se mostrou eficaz, com ensaios reprodutíveis para a descelularização de traqueias suínas, como modelo para traqueias humanas, sendo que a associação de processos físicos e químicos despontam como melhores opções para a produção de tecidos descelularizados.

Palavras-chave: Traqueia. Descelularização. Equipamento multifuncional. Photodithazine.

ABSTRACT

MION, W. **Decellularization of swine trachea using multifunctional equipment.** 97 p. Ph D. Thesis (Doctor in Sciences) - São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, 2020.

Tracheal problems originated from congenital or acquired stenosis, traumatic processes, cancers, or infections are still a major issue for medical care. The production of decellularized organs by biotechnical engineering and regenerative medicine has been growing as an attempt to solve this problem. The goal of this study was to develop multifunctional equipment for the performance of all the decellularization processes while assuring acceptable and reproducible quality standards, regarding the mechanical and physical-chemical characteristics, for future cell planting and implants. Nine decellularization protocols were carried out on 15 cm swine trachea (Large White) of which 4 cm were reserved for control. The groups were divided according to exposure or non-exposure to LED light ($450\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ — $90\text{ J} / \text{cm}^2$), with or without treatment or without photodithazine (PDZ) ($5\text{ }\mu\text{g} / \text{ml}$ or $20\text{ }\mu\text{g} / \text{ml}$), with 1 cycle (24 hours) or 2 cycles (48 hours) of decellularization. All groups underwent treatment with ionic detergent (4% SDS) and ultrasound (52kHz) during the cycles. Results at 48 hours were superior in comparison with 24 hours. The association with the action of the light with PDZ treatment in one cycle was not superior to the use of only photosensitization, while both tests had similar values in terms of DNA reduction in tracheal tissue, 61.3 and 60.81%. The same was evidenced for two cycles: DNA reduction of 76.79% for the association of the action of light with PDZ treatment and a reduction of 70.67% for the use of only PDZ. Treatment with PDZ at $20\text{ }\mu\text{g} / \text{ml}$, with 1 cycle, showed more expressive results with a 75.09% decrease of DNA. Thus, it can be inferred that the photosensitizer has a determining role in cell decellularization with dose-dependent features. It could be observed no protocol difference in the concentration of glycosaminoglycan, despite the maintenance of the biomechanical properties in the groups. The multifunctional equipment proved to be effective, with reproducible tests for the decellularization of swine trachea, as a plausible model for human trachea with an association of physical and chemical processes emerging as good options for the production of decellularized tissues.

Keywords: Trachea. Decellularization. Multifunctional equipment. Photodithazine.