



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Thaiane Cristine Evaristo

**Avaliação histológica e funcional do enxerto de neotraqueia
de coelho desenvolvido por bioengenharia**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Bases Gerais
da Cirurgia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Cristina Cataneo

Coorientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Botucatu
2015

Thaiane Cristine Evaristo

Avaliação histológica e funcional do enxerto de
neotraqueia de coelho desenvolvido por bioengenharia

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Bases Gerais
da Cirurgia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Cristina Cataneo

Coorientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Botucatu

2015

Thaiane Cristine Evaristo

Avaliação histológica e funcional do enxerto de neotraqueia de coelho desenvolvido por bioengenharia

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção de título de Doutorado

Orientador: Prof (a). Dr (a). Daniele Cristina Cataneo

Comissão examinadora

Prof. Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Prof (a). Dr (a). Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves

Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas

Prof. Dr. Luiz Felipe Júdice

Universidade Federal Fluminense

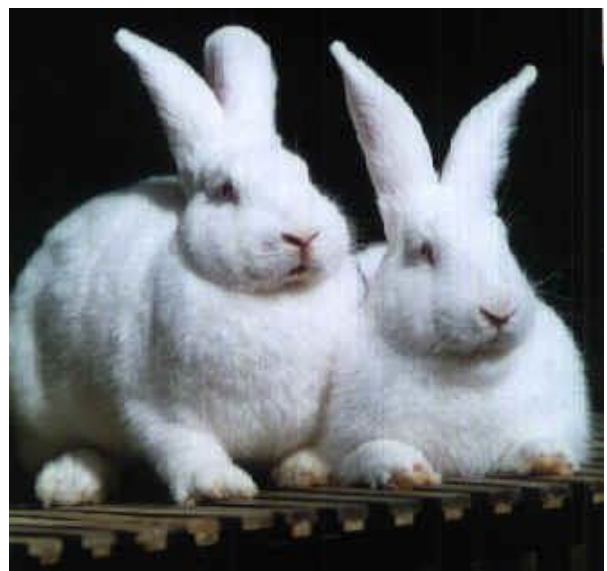
Prof (a). Dr (a). Érica Nishida Hasimoto

Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Botucatu, 24 de junho de 2015.

Aos que fizeram parte desta trajetória e me ajudaram na realização deste importante projeto. Vocês foram meus professores, ensinando através do silêncio, gestos e olhares desconfiados, a ter paciência, ensinando-me o que não estava escrito nos livros, o imprevisível. Aprendi a contornar os obstáculos e superar meus próprios limites. Neste momento, agradeço cada instante de compreensão, mesmo aqueles não compreendidos; cada olhar confuso quando não podiam entender o porquê dos apertos e agulhadas. Obrigada por me ensinarem um pouco mais da vida!

Adaptado de autor desconhecido.



Agradecimentos

À Dra. Daniele Cristina Cataneo, minha orientadora, pela oportunidade e credibilidade! Obrigada por ter me acolhido sem conhecer meu trabalho, por me dar autonomia na hora de tomar decisões, e por acreditar no futuro deste projeto. Obrigada por me induzir a pensar criticamente!

À Dra. Elenice Deffune, minha coorientadora, pela dedicação e incansável ajuda! Obrigada por me mostrar a nobre função da pesquisa: produzir novos conhecimentos! Sua genialidade no trabalho se compara à sua generosidade como pessoa. Obrigada pelos ensinamentos diários e por promover o meu amadurecimento!

À Dra. Rosana Rossi-Ferreira, pela compreensão, carinho e paciência. Obrigada pelos preciosos conselhos e pelo sorriso e bom humor constantes!

Ao Dr. Alexandre Todorovic Fabro, obrigada pelo incentivo, generosidade e por sempre estar disposto a ajudar!

Ao Professor Carlos Roberto Padovani, pelo seu auxílio indispensável com a análise estatística do trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Engenharia Celular: Ana Cláudia Simões, Ana Livia de Carvalho Bovolato, Andrei Moroz, Aparecida Vitória Gonçalves de Souza, Camila Juliane Sena Maleski, Fernanda Albuquerque, Helga Caputo Nunes, Heloísa Vicente Garcia, Henrique de Souza Vieira, Isabele Silveira Rosa Vanni, Josy Campanhã Vicentini de Oliveira, Juliana Ravelli Baldassarre Martins, Ondina Silvia Cotrim, Priscila Murador, Natália Melo de Carvalho e Woner Mion.

À Aparecida Vitória Gonçalves de Souza, pelo seu ânimo inabalável, pela sua disposição em ajudar, pela sua generosidade e perseverança. Este trabalho só pôde ser concluído graças a sua contribuição.

À Josy Campanhã Vicentini de Oliveira, pela sua amizade e sua calma. Obrigada pelo conforto nos momentos difíceis e por sempre ter um sábio conselho.

Às funcionárias responsáveis pela limpeza e organização dos laboratórios: Natália e Gislaine.
A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, em especial: Dra. Maria Inês Pardini, Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto e Dra. Adriana Camargo Ferrasi.

A toda equipe do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, em especial: Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado, Dra. Márjorie de Assis Golim, Aline Braz Rosso, e Caroline Mitiká Watanabe.

A todos os funcionários do Hemocentro da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, que mesmo indiretamente, contribuem para a pesquisa. O aprendizado em cada laboratório foi importante para o meu crescimento.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.

A todos os funcionários do Biotério – UNIPEX da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, em especial: Ednelson Henrique Bianchi, pela amizade, dedicação e por sempre me ajudar com os animais! Não teria sido possível a realização deste trabalho sem a sua contribuição.

A toda equipe do Laboratório de Neogene da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, em especial: Dra. Patrícia Pintor dos Reis e Márcio de Carvalho.

A toda equipe do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, em especial: Dra. Flávia Karina Delella, banca da Qualificação, por apresentar idéias novas que contribuíram muito para a conclusão deste trabalho.

A toda equipe do Departamento de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, em especial: Tiago Tardivo.

A todos os funcionários da Biblioteca da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, por sempre me atender com muito respeito, paciência e dedicação.

A toda equipe da pós-graduação da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.

A toda equipe do INCOR, pelo incentivo e parceria. Obrigada por todo conhecimento compartilhado!

À FAPESP, nosso órgão de fomento, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho. Nº do processo 2010/50155-2.

Aos meus pais, Odasilo Evaristo e Celestina Scaioni Evaristo, meu porto seguro. Obrigada pai, pelo exemplo de honestidade, humildade e persistência! A minha vitória é reflexo da sua luta. Obrigada mãe, por sempre me apoiar e ser meu alicerce! Obrigada por ser exemplo de bondade e força!

Às minhas irmãs, Thais Cristina Evaristo e Tatiane Evaristo, meus colos confessionários. Obrigada pelos conselhos, pela preocupação, pelo carinho e pela compreensão! União sem fim, sem tamanho e sem comparação. Somos ricas porque somos três e não uma só!

À Cidinha, obrigada por todo carinho e por sempre cuidar de mim! Você já faz parte da minha família.

Ao meu namorado, Ênio da Costa Souza, pelo incentivo e companheirismo incondicionais! Obrigada pela paciência, generosidade, cuidado e por colocar cor no meu dia-a-dia.

A toda minha família e amigos!

Agradeço a Deus por poder citar todas essas pessoas neste momento tão importante! Obrigada por tê-las colocado tão caprichosamente em minha vida.

“Ele teve essa ideia, como a ideia de um virologista, ele acreditava que podia curar racismo e ódio, literalmente curar, apenas injetando música e amor na vida das pessoas. Um dia ele ia dar um show num comício pela paz, pistoleiros foram até a casa dele e atiraram nele. Dois dias depois, ele subiu naquele palco e cantou! Alguém perguntou: Por quê?, e ele disse: As pessoas que tentam tornar este mundo pior não tiram um dia de folga. Como é que eu vou tirar?

Uma luz na escuridão.”

Sobre Bob Marley, no filme Eu Sou A Lenda.

Lista de abreviaturas

3D	tridimensional
AcMn	Anticorpos Monoclonais
BMP-4	Bone morphogenetic protein 4
CD	<i>clusters of differentiation</i>
CERs	Células Epiteliais Respiratórias
CMLs	Células de Músculo Liso
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTMs	Células-Tronco Mesenquimais
DECH	Doença do Enxerto contra Hospedeiro
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DS	Deoxicolato de Sódio
EV	Endovenosa
ET	Engenharia de Tecidos
GAG	Glicosaminoglicana
HE	Hematoxilina Eosina
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
MC	Meio de Cultura
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TA	Tecido Adiposo
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1

Lista de tabelas

Tabela 1 - Média e desvio padrão das variáveis do ensaio de tração das traqueias <i>in natura</i> e das traqueias descelularizadas com cinco e 10 ciclos	55
--	----

Lista de figuras

Figura 1 - Traqueia	17
Figura 2 - Reprodução de um corte transversal da mucosa traqueal com o epitélio respiratório e a lâmina própria.....	19
Figura 3 - Células caliciformes produtoras de muco.....	19
Figura 4 - Componentes básicos da Engenharia de Tecidos	23
Figura 5 - Diferenciação das CTMs	25
Figura 6 - Pesquisa bibliográfica utilizando as principais palavras-chave referentes ao tema.....	30
Figura 7 - Publicações por ano utilizando a palavra-chave <i>Tracheal reconstruction</i> durante o período de 1947 – 2015.....	31
Figura 8 - Protocolo de descelularização das traqueias.....	35
Figura 9 - Avaliação da toxicidade das traqueias descelularizadas.....	37
Figura 10 - Traqueia sendo tracionada	38
Figura 11 - Obtenção das CTMs a partir do TA do coelho	39
Figura 12 - Contagem celular em câmara de Neubauer	39
Figura 13 - Frasco T25 cm ² com os fragmentos traqueais (seta) e MC apropriado	42
Figura 14 - Esquema ilustrativo do processo de rescelularização das traqueias	44
Figura 15 - Transplante traqueal.....	46
Figura 16 - Grupos da primeira etapa dos transplantes traqueais utilizando cinco ciclos de descelularização.....	47
Figura 17 - Grupos da segunda etapa dos transplantes traqueais utilizando 10 ciclos de descelularização.....	47
Figura 18 - Traqueias pré e pós-descelularização	49
Figura 19 - Histologia das traqueias pré e pós-descelularização com cinco ciclos.....	50
Figura 20 - Histologia das traqueias pré e pós-descelularização com 10 ciclos.....	51

Figura 21 - Análise quantitativa de DNA das traqueias <i>in natura</i> e das traqueias após cinco ciclos e 10 ciclos de descelularização.....	52
Figura 22 - Avaliação da toxicidade das traqueias após descelularização com detergente deoxicolato de sódio em diferentes períodos da cultura	53
Figura 23 - Avaliação da viabilidade celular em dois períodos diferentes de cultura....	53
Figura 24 - Avaliação da apoptose e necrose celular em dois períodos diferentes de cultura.....	54
Figura 25 - Evolução da cultura celular das CTMs	56
Figura 26 - Resultado da citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti-CD90 (<i>anti-rat</i>) da Caltag Laboratories®	57
Figura 27 - Resultado da citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti-CD90 (<i>anti-rat cross reacting with rabbit</i>) - Biolegend®	58
Figura 28 - Caracterização das CTMs por citometria de fluxo	58
Figura 29 - Caracterização das CTMs pelas diferenciações	59
Figura 30 - Diferenciação condrogênica	60
Figura 31 - Diferenciação em músculo liso.....	60
Figura 32 - Cultura de CERs pela técnica de fragmentos traqueais	61
Figura 33 - Cultura de CERs pela técnica de raspados traqueais	62
Figura 34 - Cultura de CERs com visualização das células epiteliais ciliadas.....	63
Figura 35 - Caracterização das CERs por imunocitoquímica.....	63
Figura 36 - Contaminação nas culturas de CERs em diferentes aumentos: 5x, 10x e 20x respectivamente	64
Figura 37 - Presença das células aderidas (setas) às traqueias previamente descelularizadas coradas com HE.....	65
Figura 38 - Validação da rescelularização pela Microscopia Eletrônica de Varredura	65
Figura 39 - Presença das células aderidas (setas) às traqueias previamente descelularizadas visualizadas pela microscopia de fluorescência.....	66
Figura 40 - Dados pós-transplante dos animais da primeira etapa	66

Figura 41 - Análise macroscópica das traqueias da primeira etapa após 10±2 dias do transplante	67
Figura 42 - Análise histológica das traqueias da primeira etapa após 10±2 dias do transplante.....	67
Figura 43 - Histologia das traqueias da primeira etapa após 10±2 dias do transplante.....	68
Figura 44 - Histologia das traqueias da primeira etapa após 10±2 dias do transplante.....	70
Figura 45 - Dados dos animais pós-transplante da segunda etapa	71
Figura 46 - Análise macroscópica das traqueias da segunda etapa após 46±4 dias do transplante	72
Figura 47 - Análise histológica das traqueias da segunda etapa após 46±4 dias do transplante.....	72
Figura 48 - Histologia das traqueias da segunda etapa após 46±4 dias do transplante.....	73
Figura 49 - Correspondência Idade do coelho <i>versus</i> Idade humana	80
Figura 50 - Transplantes traqueais em coelhos	82
Figura 51 - Imunofluorescência para visualização de colágeno.....	85

Resumo

EVARISTO, T. C. **Avaliação histológica e funcional do enxerto de neotraqueia de coelho desenvolvido por bioengenharia.** 2015. 120f. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

Tendo em vista o desafio do tratamento de injúrias traqueais e o progresso na produção desse órgão por técnicas de engenharia de tecidos, faz com que o interesse nessa área cresça de forma considerável, já que ainda não há um tratamento padrão descrito na literatura acerca das lesões traqueais que acometem 50% do comprimento total do órgão de um adulto ou 30% da traqueia de uma criança. Assim, este estudo tem como objetivo a construção de modelo de traqueia para enxerto utilizando técnicas de engenharia de tecidos. Para tanto, foram realizados cinco e 10 ciclos de descclularização nas traqueias de coelhos doadores seguindo etapas: congelamento/descongelamento sem adição de nenhum crioprotetor, banho ultrassônico no aparelho *Ultrasonic cleaner (Unique model USC 1400®)* na frequência de 40 Khz durante 10 minutos, irradiação utilizando diodo de emissão de luz (LED) azul com comprimento de onda de $450\text{nm} \pm 20\text{nm}$ na dose de 90 J/cm^2 totalizando 60 minutos de exposição, adição do detergente deoxicolato de sódio a 4% sob agitação a 180 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)* durante 48 horas. Paralelamente, foram realizadas expansão e caracterização das células-tronco mesenquimais dos coelhos receptores com posterior diferenciação dessas células em condrócitos e células de músculo liso. Finalmente, foi realizada a recelularização das traqueias com aplicação das células-tronco mesenquimais, dos condrócitos e das células de músculo liso dos coelhos receptores nas superfícies externas dos arcabouços produzidos para os transplantes traqueais. Após cinco ciclos repetidos do protocolo de descclularização utilizado, ainda é possível observar células epiteliais respiratórias e condrócitos remanescentes nas traqueias dos coelhos doadores. Porém, a repetição de 10 ciclos do mesmo protocolo de descclularização remove completamente as células epiteliais respiratórias e reduz a quantidade de condrócitos visíveis na cartilagem traqueal. Os animais que foram transplantados com as traqueias descclularizadas com cinco ciclos vieram a óbito após 10-12 dias devido à rejeição pela presença das células epiteliais dos coelhos doadores. Os animais que foram transplantados com as traqueias descclularizadas com 10 ciclos não apresentaram sinais de rejeição, porém, vieram a óbito após 40-90 dias devido à falta de regeneração epitelial. Concluímos que o processo de descclularização utilizado é capaz de remover as células epiteliais da traqueia de coelhos após 10 ciclos, o que evita o processo de rejeição pós-transplante, porém, posteriormente, a presença do epitélio respiratório é essencial para que não ocorra a obstrução do enxerto durante a cicatrização. Sendo assim, será necessário realizar outras investigações na área, a fim de se prolongar a vida útil desses enxertos *in vivo*.

Palavras-chave: Reconstrução de traqueia; Engenharia de Tecidos; Descclularização; Células-Tronco Mesenquimais.

Abstract

EVARISTO, T. C. **Histological and functional evaluation of rabbit neotrachea graft constructed by bioengineering**. 2015. 120f. Thesis (Doctorate in General Basis of Surgery) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

There is no standard treatment yet described in the literature for tracheal lesions whose length is more than 50% in adults and a third of the trachea in small children. Given the challenge of tracheal injuries treatment and the organ generation progress by tissue engineering techniques the interest in this area is growing considerably. Thereby this study aims to produce tracheal model for graft using tissue engineering techniques. Were performed five and 10 cycles of decellularization on donor rabbit's tracheae following the steps: freezing/defreezing without addition of any cryoprotectant; sonication in Ultrasonic cleaner (Unique model USC 1400[®]) with 40 Khz for 10 minutes; blue light-emitting diode (LED) irradiation with wavelength of 450nm \pm 20nm along a dose of 90 J/cm² at a total exposure of 60 minutes; addition of sodium deoxicholate detergent 4% during 48 hours under 180 rpm agitation in the C24 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific). Meanwhile, expansion and characterization of mesenchymal stem cells of rabbits' receptors were performed with subsequent differentiation of these cells into chondrocytes and smooth muscle cells. Finally, it was realized the tracheal recellularization by the application of the mesenchymal stem cells, chondrocytes and smooth muscle cells from receptors rabbits in the outer face of the produced scaffolds for tracheal transplantation. After five repeated cycles of decellularization protocol used, it is still possible to observe respiratory epithelial cells and chondrocytes remaining in the tracheae of the donor rabbits. However, after 10 cycles of the same decellularization protocol the respiratory epithelial cells are completely removed and the tracheal cartilage chondrocytes are reduced. Animals that have been transplanted with five cycles decellularized tracheae had died after 10-12 days due to rejection by the presence of donor rabbit's epithelial cells. Animals that have been transplanted with 10 cycles decellularized tracheae showed no signs of rejection; however, they had died after 40-90 days due to lack of epithelial regeneration. We conclude that the decellularization process used is capable of removing the epithelial cells of the rabbits' tracheae after 10 cycles, which avoids the process of post-transplantation rejection; however, subsequently, the presence of respiratory epithelium is essential so there is no obstruction of the graft during healing. Therefore, it will be necessary further investigation in this area, in order to extend the life of these grafts *in vivo*.

Key word: Trachea reconstruction; Tissue engineering; Decellularization; mesenchymal stem cells.

Sumário

1 Introdução	17
1.1 Traqueia	17
1.2 Matriz extracelular	20
1.3 Transplantes traqueais	20
1.4 Engenharia de Tecidos	22
1.5 Células-Tronco Mesenquimais	24
1.6 Protocolos de Descelularização	26
1.7 Justificativa	30
1.8 Relevância do tema	30
2 Objetivos	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3 Materiais e Métodos	33
3.1 Animais	33
3.2 Obtenção das traqueias	34
3.2.1 Descelularização das traqueias	34
3.2.2 Quantificação de DNA das traqueias	35
3.2.3 Avaliação da toxicidade residual das traqueias descelularizadas	36
3.2.4 Ensaio Biomecânicos das traqueias	37
3.3 Obtenção das CTMs	38
3.3.1 Caracterização das CTMs por citometria de fluxo	40
3.3.2 Caracterização das CTMs por diferenciação: osteogênica, adipogênica e condrogênica	40
3.3.3 Diferenciação das CTMs em músculo liso	41
3.4 Expansão <i>ex vivo</i> das células epiteliais respiratórias	42
3.4.1 Caracterização das CERs por imunocitoquímica	43
3.5 Montagem das neotraqueias	43
3.6 Transplantes	45
3.7 Análise Estatística	48
4 Resultados	49
4.1 Obtenção das traqueias	49

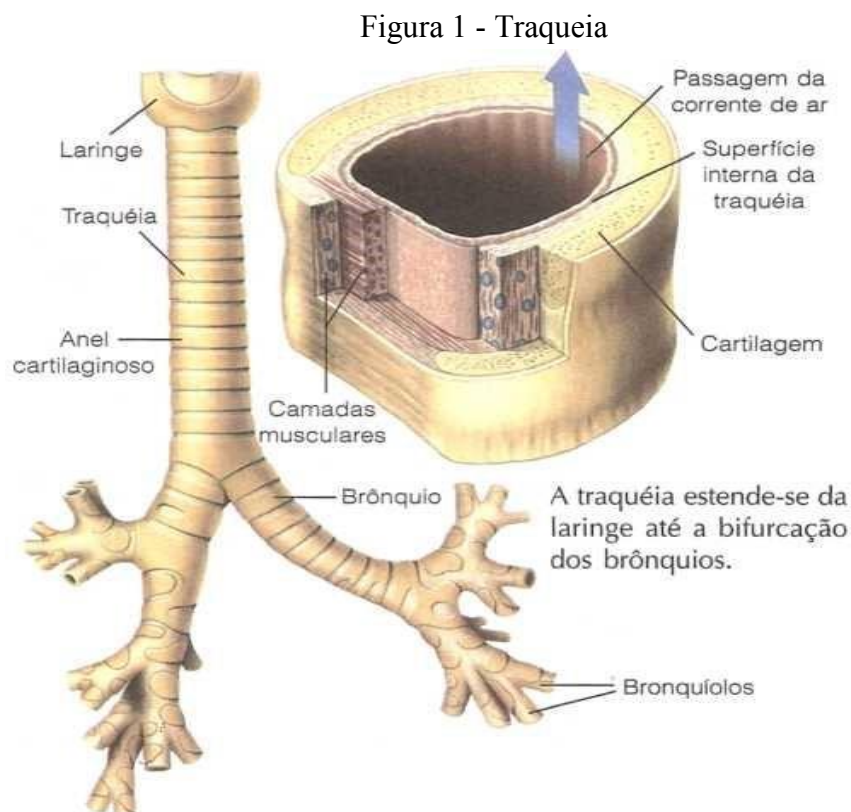
4.1.1 Descelularização das traqueias	49
4.1.2 Quantificação de DNA das traqueias	52
4.1.3 Avaliação da toxicidade residual das traqueias descelularizadas.....	52
4.1.4 Ensaios Biomecânicos das traqueias	54
4.2 Obtenção das CTMs	55
4.2.1 Caracterização das CTMs por citometria de fluxo	56
4.2.2 Caracterização das CTMs por diferenciação: osteogênica, adipogênica e condrogênica	59
4.2.3 Diferenciação das CTMs em músculo liso.....	60
4.3 Expansão <i>ex vivo</i> das células epiteliais respiratórias.....	61
4.3.1 Caracterização das CERs por imunocitoquímica	63
4.4 Montagem das neotraqueias	64
4.5 Transplantes.....	66
5 Discussão.....	74
5.1 Limitações do estudo	80
6 Conclusões	83
Perspectivas.....	84
Referências	86
ANEXO A - Certificado de aprovação do trabalho pelo COBEA.....	95
Apêndice A - Artigo - <i>Characterization of tracheal scaffold decellularized with tissue engineering techniques.....</i>	96

1. Introdução

1.1. Traqueia

A traqueia é um órgão tubular que conecta a laringe na cartilagem cricoide e se estende até a carina na bifurcação dos brônquios principais direito e esquerdo.^{1,2} A traqueia humana apresenta extensão de 11-12 cm, diâmetro de 2,0-2,5 cm e é formada por 15-20 anéis cartilagosos.^{2,3} A traqueia dos coelhos tem aproximadamente 30 anéis cartilagosos medindo aproximadamente 6,0 cm.⁴ Além de ligar a via aérea superior a inferior, a traqueia libera as secreções bronquiais e é capaz de se deformar durante a respiração.^{5,6}

A parede da traqueia é formada por anéis de cartilagem hialina incompletos e em forma de C que proporcionam rigidez suficiente para o impedimento do colapso do órgão durante a respiração.² Esses anéis são ligados entre si por um tecido conjuntivo fibroelástico, o qual promove flexibilidade à traqueia e permite seu alongamento durante a inspiração.² As extremidades desses anéis são unidas por músculo liso capaz de diminuir o diâmetro da luz traqueal por meio de contrações, auxiliando o deslocamento de partículas estranhas e muco durante a tosse (Figura 1).²



Fonte: <http://www.coladaweb.com/biologia/corpo-humano/traqueia>

A camada mucosa da traqueia é formada pelo epitélio respiratório (epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado), pela lâmina própria (tecido conjuntivo frouxo subepitelial) e por um feixe de fibras elásticas que separam a mucosa da submucosa.²

O epitélio respiratório é responsável pelo transporte de íons e fluidos e pela limpeza mucociliar.⁷⁻⁹ É composto por seis tipos celulares:

1. Células caliciformes (30% do epitélio) produtoras do muco que protege e lubrifica o epitélio.
2. Células cilíndricas ciliadas (30% do epitélio) contendo cílios e microvilos que por seus movimentos ciliares possuem a função de deslocamento do muco até a nasofaringe para eliminação após deglutição ou expectoração.
3. Células basais (30% do epitélio) que estão localizadas na membrana basal e não chegam à superfície apical do epitélio; são células indiferenciadas que se proliferam e produzem as outras células após suas mortes.
4. Células em escova (3% do epitélio) que não possuem funções conhecidas, mas estão associadas a terminações nervosas.
5. Células serosas (3% do epitélio) que contêm um fluido seroso de composição desconhecida.
6. Células do sistema neuroendócrino difuso (3-4% do epitélio) com a capacidade de monitorar os níveis de oxigênio e dióxido de carbono no lúmen das vias aéreas.^{1,2}

A lâmina própria é composta por um tecido conjuntivo fibroelástico frouxo que contém nódulos linfáticos, glândulas mucosas e seromucosas, cujos ductos se abrem na luz traqueal (Figura 2).² As fibras elásticas formam uma camada densa que separa a lâmina própria da submucosa.²

Figura 2 - Reprodução de um corte transversal da mucosa traqueal com o epitélio respiratório e a lâmina própria



Fonte: Hib J. Sistema respiratório. In: Histologia – Texto e Atlas. 1th ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2003. p. 307-25.

A submucosa é formada por um tecido conjuntivo denso fibroelástico contendo numerosas glândulas mucosas e seromucosas e elementos linfóides.² A adventícia é a camada traqueal externa constituída por um tecido conjuntivo denso, rico em fibras elásticas, vasos linfáticos e sanguíneos.²

Quando o epitélio respiratório é exposto cronicamente a algum fator irritante, como por exemplo, a fumaça de cigarro, ocorre um processo reversível chamado de metaplasia associado a um aumento no número de células caliciformes em relação às células ciliadas.² O aumento no número de células caliciformes (Figura 3) produz uma camada espessa de muco para a remoção do fator irritante porém, na ausência das células ciliadas, não há eliminação deste muco podendo ocorrer congestão.²

Figura 3 - Células caliciformes produtoras de muco



Fonte: <http://www.mundoeducacao.com/biologia/epitelio-glandular.htm>

1.2. Matriz extracelular

Os tecidos são compostos por células e macromoléculas não vivas produzidas pelas células e exportadas por elas para o meio externo formando a matriz extracelular (MEC)¹⁰ que possui diversas funções no tecido: formar os elementos estruturais do mesmo, modificar a morfologia e as funções celulares como modular a sua sobrevivência, influenciar no desenvolvimento celular, regular a sua migração, direcionar a atividade mitótica e formar associações juncionais com outras células.¹⁰ A MEC do tecido conjuntivo é formada por uma substância fundamental que resiste a forças de compressão e por fibras que resistem a forças de tensão.¹⁰

A substância fundamental é semelhante a um gel amorfo formada de glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas.¹⁰ As glicosaminoglicanas (GAGs) são longas cadeias polissacarídicas, negativamente carregadas, que têm a capacidade de se ligar a grandes quantidades de água tornando a matriz hidratada, o que auxilia na resistência à compressão.¹⁰ As proteoglicanas constituem uma família de macromoléculas e possuem várias funções como resistir a forças de compressão e auxiliar na migração celular.¹⁰ As glicoproteínas adesivas às células têm sítios de ligação para vários componentes da MEC e também para moléculas de integrina da membrana plasmática que facilita a fixação das células à MEC.¹⁰

As fibras de colágeno e elastina possuem diferentes propriedades bioquímicas e mecânicas e proporcionam resistência a forças de tensão e elasticidade do tecido.¹⁰

1.3. Transplantes traqueais

Transplantes traqueais têm sido tema de pesquisas por mais de quarenta anos sem sucesso.¹¹ Os grandes defeitos traqueais são um problema na prática cirúrgica pois apresentam dificuldades para o tratamento e não há uma terapia padrão;¹¹⁻¹⁴ a traqueotomia não é isenta de riscos e os transplantes necessitam de doadores.¹⁴ As ressecções da traqueia com reparo primário são as únicas opções de tratamento dos pacientes que apresentam lesões benignas ou malignas,^{11,15} porém, nem sempre são viáveis.

As ressecções traqueais seguidas de anastomoses término-terminais apenas são possíveis nos casos de lesões menores do que 50% (6,0 cm) do comprimento da traqueia de um adulto e 30% da traqueia de uma criança.^{1,5,7,11,14-32} Entretanto, muitas patologias traqueais acometem grandes extensões do órgão, o que impossibilita a reconstrução cirúrgica, pois não há tecido adjacente suficiente para a realização das anastomoses como ocorre em tumores, estenoses e deformidades congênitas.^{7,15,20,21,33}

Essas lesões exigem tratamento curativo^{11,15-21} e em muitos casos são necessárias terapias endoluminais, seguidas por vários procedimentos operatórios, acarretando elevados custos para o sistema de saúde.^{17,34} Além disso, pacientes que apresentam lesões longas são tratados com válvulas e tubos, e apresentam infecções recorrentes¹ com alta taxa de mortalidade.³⁵ Sendo assim, ainda não há uma terapia ideal para o tratamento de danos traqueais extensos^{27,36} que reduz a qualidade de vida desses pacientes, pois eles apresentam dificuldades para respirar, falar, e engolir.⁶ Esse quadro mudaria se fosse possível a construção de um substituto traqueal que apresentasse as propriedades anatômicas, fisiológicas e biomecânicas similares à traqueia nativa.³⁰

A traqueia é um dos órgãos do corpo humano de mais difícil substituição, pois não se trata apenas de um órgão oco, na verdade, trata-se de um órgão bastante complexo capaz de realizar diversas funções³⁷ tais como, ventilação, aquecimento, umidificação e limpeza das vias aéreas.¹ Um substituto traqueal deve ser capaz de realizar todas essas funções, apresentando aspectos estruturais, morfológicos e mecânicos específicos.⁶

Apesar das intensas tentativas clínicas, ainda não há na literatura um substituto traqueal adequado que apresente as seguintes características: rigidez lateral, flexibilidade longitudinal, hermeticidade, biocompatibilidade, integração tecidual, não-imunogênico, não tóxico, não carcinogênico, resistente à colonização bacteriana, sem necessidade de imunossupressão, de fácil implantação e promotor da reepitelização.^{1,5,7,23,31,38-40} Além disso, esse substituto deve promover adesão de condrócitos, diferenciação celular e produção de matriz extracelular para a formação de neocartilagem e, ainda, apresentar vascularização.¹⁶ Todas essas características são necessárias para a manutenção das propriedades anatômicas e funcionais do órgão.⁵

Grillo classificou os substitutos traqueais em cinco categorias: materiais protéticos, tecidos autógenos, tecidos não viáveis, transplantes traqueais e engenharia tecidual.²⁵ Porém, os procedimentos que utilizam as quatro primeiras técnicas apresentam diversas complicações como rigidez, formação de granuloma, infecção crônica, obstrução da via aérea, migração da prótese, erosão dos vasos sanguíneos, isquemia do enxerto, rejeição imune, falta de epitelização, proliferação de tecido de granulação e complicações mais severas tais como estenose e necrose.^{16,19-21} Além disso, com relação aos alotransplantes, pode-se considerar como fatores limitantes a falta de doadores, suprimento vascular e imunossupressão.^{5,6,22,23,29}

Diante desse cenário, a área de bioengenharia é uma opção em potencial para esses pacientes,^{5,15,16,20,31,36,41} pois a substituição de secções longas só será possível se um

tecido traqueal funcional e seguro for desenvolvido.^{11,15} Porém, ainda há muitos desafios para alcançar o sucesso clínico.^{15,16,20}

Na história da cirurgia de traqueia o primeiro alotransplante traqueal foi realizado em 1979.⁴² Em 2008, Macchiarini e colaboradores realizaram o primeiro transplante de traqueia construída exclusivamente por técnicas de engenharia celular.¹¹ Após esse primeiro ensaio clínico, nove outros pacientes já foram submetidos à cirurgia utilizando procedimento parecido. O uso de traqueias descelularizadas e posteriormente rescelularizadas apresenta algumas limitações como, por exemplo, a necessidade de diferentes tamanhos de traqueias (específica para cada paciente), necessidade de doadores de órgãos, contaminação bacteriana durante a manipulação *in vitro*; longo período para o processo de descelularização e risco de alteração das propriedades mecânicas e estruturais da matriz extracelular.³⁰ Além disso, Macchiarini afirmou em entrevista no ano de 2011 que o protocolo de descelularização de traqueia de doador com posterior rescelularização com as células do próprio paciente custa em torno de 40.000 – 60.000 euros.⁴³

Elliot e colaboradores (2012), entretanto, relataram transplante traqueal utilizando a técnica citada acima em uma criança e com seguimento bem sucedido durante dois anos.²² Já Delaere e colaboradores (2010, 2012) usaram método semelhante ao realizado por Rose e colaboradores (1979)⁴² com vascularização heterotópica com terapia imunossupressora seguida de transplante ortotópico.^{29,44} Como desvantagens dessa técnica destaca-se a necessidade de vários procedimentos cirúrgicos e medicamentos imunossupressores.

Junglebuth e colaboradores (2011) realizaram o primeiro transplante traqueal por meio de um arcabouço sintético semeado com as células-tronco do paciente,³⁰ mas não se pode avaliar o comportamento deste material a longo prazo, pois o estudo apresentou seguimento curto (cinco meses) do paciente.³²

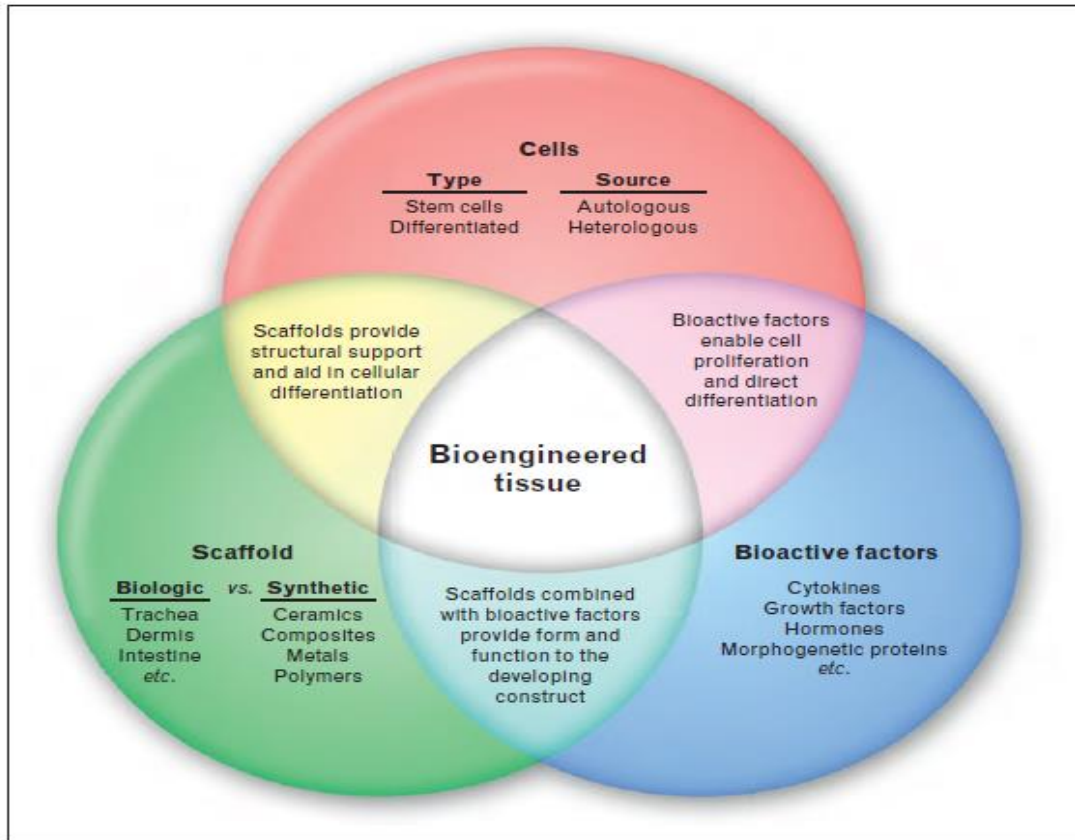
Como descrito nos parágrafos anteriores, há relatos de transplantes traqueais favoráveis, mas não livres de complicações, inclusive mortalidade.^{4,30,45} Portanto, há muito a se aprimorar melhorando a limpeza mucociliar após transplante, a estrutura traqueal e otimizando o tempo de preparo dos materiais engenheirados.⁴⁵

1.4. Engenharia de Tecidos

A Engenharia de Tecidos (ET) consiste na substituição de tecidos e órgãos por isolamento e cultivo de células *in vitro* semeadas em arcabouços antes da implantação no paciente.⁴⁵⁻⁵² Desde meados da década de 80, a ET é considerada um campo de pesquisa

independente com uma cooperação interdisciplinar entre os especialistas,⁴⁶ pois envolve três componentes básicos diferentes: células, arcabouços e fatores bioativos (Figura 4).⁴⁵

Figura 4 - Componentes básicos da Engenharia de Tecidos



Fonte: Lott DG. What is the future of „organ transplantation“ in the head and neck? *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014; 22: 429-35.

A célula do tecido desejado é o principal componente para a regeneração tecidual.⁴⁵ A traqueia é um tecido complexo formado por condrócitos, células epiteliais respiratórias, células musculares, matriz de colágeno e vasos sanguíneos.^{1,8} Os condrócitos podem ser coletados das cartilagens das orelhas, septos nasais, articulações ou através de diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (TA).^{1,8} As células epiteliais podem ser coletadas da mucosa nasal e dos brônquios.⁸ As células para a cultura dos vasos sanguíneos, como as células endoteliais e as células do músculo liso, podem ser coletadas de artérias ou veias.⁸ A cultura separada de vários tipos celulares diferentes *in vitro* já mostrou ser um sucesso e algumas combinações de cartilagem ou tecido fibroso com células epiteliais da traqueia já foram reportadas, mas a incorporação de vasos arteriais e venosos ainda é um desafio, já que a vascularização da traqueia nativa é complexa.^{8,37}

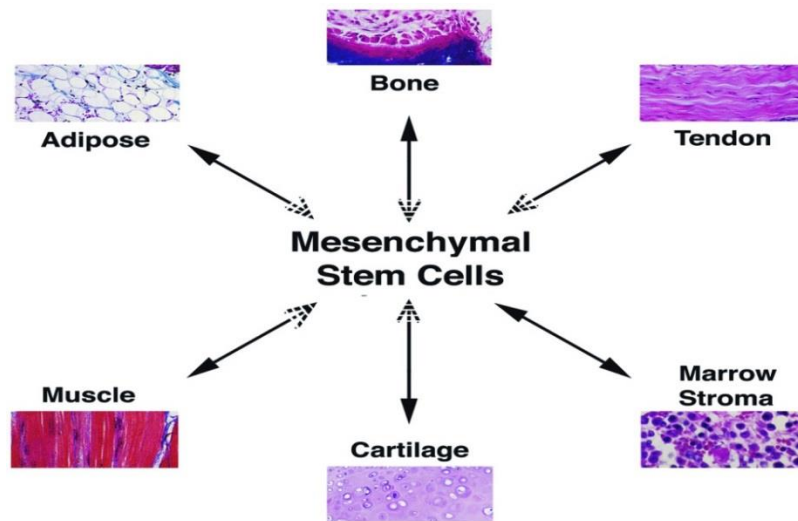
Os arcabouços podem ser sintéticos ou biológicos.¹ Arcabouços sintéticos podem ser produzidos rapidamente e em grandes quantidades, mas há a dificuldade de se produzir a arquitetura exata do tecido nativo.⁴⁵ Além disso, o uso dessas estruturas tridimensionais artificiais pode provocar intensa resposta inflamatória após o implante,¹⁶ diferentemente dos suportes biológicos obtidos por descelularização de órgãos e tecidos.⁷ O uso de tecidos biológicos descelularizados no reparo ou substituição de diferentes tipos de órgãos lesionados está se tornando cada vez mais frequente na prática clínica da medicina regenerativa, pois são arcabouços tridimensionais biocompatíveis e biodegradáveis formados com matriz extracelular (colágeno, ácido hialurônico, fibrina e outros produtos GAG) que suportam adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, promovem o reparo e a regeneração no hospedeiro, não são imunogênicos, permitem a neovascularização e ainda não liberam produtos tóxicos.^{1,6,7,31,38,40,53-58}

Há vários fatores bioativos que podem ser utilizados, entre eles, as células-tronco mesenquimais injetadas sistematicamente podem ser importantes moléculas bioativas.⁵ As moléculas bioativas apresentam papel importante na migração celular, crescimento e diferenciação das células.⁵

1.5. Células-Tronco Mesenquimais

As células-tronco são ferramentas importantes na pesquisa clínica, entretanto, elas não devem apresentar riscos quando aplicadas *in vivo* como, por exemplo, as células-tronco embrionárias que apresentam uma ampla capacidade de diferenciação, mas podem formar teratoma.⁵⁹ Sendo assim, tem crescido o interesse nas Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) que são células encontradas em tecidos adultos.⁵⁹ Essas células foram primeiramente descritas por Friedenstein e colaboradores em 1970, como unidades formadoras de colônias fibroblásticas com capacidade de se diferenciar em alguns tecidos.^{60,61} Em 1991, Caplan denominou essas células como Células-Tronco Mesenquimais.⁶² Atualmente, é sabido que essas células são aderentes ao plástico e são encontradas em múltiplos tecidos dentre eles a medula óssea, tecido adiposo e placenta, e apresentam capacidade de se diferenciar em tecido ósseo, tecido adipogênico, tecido condrogênico, fibroblastos e músculo liso (Figura 5).^{59,63-65} O fenótipo dos antígenos expressos na superfície das CTMs pode variar de acordo com o tecido de origem e as condições da cultura celular.⁵⁹

Figura 5 - Diferenciação das CTMs



Fonte: <http://imgkid.com/mesenchymal-stem-cell-differentiation.shtml>

O interesse no uso dessas células vem crescendo amplamente, pois essas células apresentam características imunossupressoras, promovem reparo tecidual, são capazes de se proliferar e diferenciar em vários tipos celulares e migrar até os locais de lesões e inflamações após infusão venosa, são facilmente isoladas, podem ser coletadas de forma autóloga e ainda são imunomodulatórias e anti-inflamatórias, o que reduz o processo da Doença do Enxerto contra Hospedeiro (DECH).^{5,59,66-68}

Com a proliferação *in vitro*, é possível a obtenção de uma grande quantidade de CTMs que podem ser utilizadas para terapêutica, entretanto, há desvantagens relacionadas a esse processo. Durante as passagens (subcultivos), etapa em que as células são submetidas a um tratamento enzimático, ocorre senescência e alterações cromossomais devido ao encurtamento do telômero (perda de 100 pares de base/passagem); *in vivo*, esse encurtamento ocorre de forma bem mais lenta (perda de 17 pares de base/ano).^{63,69,70} O encurtamento do telômero provoca redução na capacidade de proliferação e diferenciação.⁷⁰

Estas células também podem ser utilizadas como importantes fatores bioativos, como descrito anteriormente.⁵ A migração das CTMs até o tecido lesionado depende de alguns fatores como idade, número de passagens das células em cultura, condições da cultura, método de injeção entre outros.⁵⁹ Sabe-se que CTMs após várias passagens em cultura perdem gradativamente a capacidade de migração, o potencial imunossupressor e de reparo.^{59,63}

O método de administração das CTMs também interfere na migração, como mencionado acima, e o método amplamente utilizado nessa área é a injeção intravenosa.⁵⁹ Após os transplantes de traqueias, essas injeções podem reduzir a antigenicidade pois

promovem a redução da infiltração linfocítica e conseqüentemente, a formação fibrótica que causaria a obstrução traqueal, além disso, também auxiliam a resposta neovascular.²³

1.6. Protocolos de Descelularização

Atualmente, tem-se usado suportes biológicos derivados de tecidos e órgãos descelularizados em estudos pré-clínicos com animais e em aplicações clínicas em humanos.⁵⁷ A utilização desses materiais naturais apresenta vantagens biológicas, porém, é necessário que se faça um preparo rigoroso que garanta a descelularização a fim de se evitar a reação imunológica no hospedeiro.⁵⁶ Antígenos celulares xenogênicos e alogênicos são reconhecidos como estruturas estranhas ao hospedeiro e assim induzem uma resposta inflamatória ou uma rejeição imunomediada do tecido.⁵⁷

O protocolo de descelularização utilizado deve remover todo o material celular e nuclear para que não ocorra indução da resposta imunológica pós-transplante, preservando a composição, atividade biológica e integridade mecânica da matriz extracelular restante.^{5,6,28,31,51,53-58} Além disso, as substâncias utilizadas no processo precisam ter mínimo efeito residual, para que não ocorra a inibição do crescimento celular após implantação da matriz no organismo.⁵⁷ A eficácia dos agentes de descelularização depende de alguns fatores do tecido a ser tratado como, por exemplo, celularidade, rigidez, densidade e conteúdo de lipídeos.⁵⁸ Um processo de descelularização eficiente utiliza em conjunto métodos físicos, químicos e enzimáticos.^{57,71}

Os métodos físicos rompem as membranas celulares e liberam seus conteúdos, facilitando o processo subsequente de lavagem para remoção dos conteúdos celulares.⁵⁷ Esses métodos são geralmente insuficientes para alcançar uma descelularização completa, então devem ser combinados com outros métodos químicos e enzimáticos.⁵⁷ Os métodos físicos incluem congelamento, pressão direta, sonicação e agitação.⁵⁷

O processo de congelamento/descongelamento promove a perda da expressão dos antígenos classe II das células epiteliais respiratórias.²³ O rápido congelamento de um tecido forma cristais de gelo intracelulares que rompem as membranas causando a lise celular liberando restos membranosos e conteúdos intracelulares que poderão ser removidos posteriormente;^{57,71} as mudanças de temperatura devem ser cuidadosamente controladas para prevenir a formação de gelo que rompa também a matriz extracelular.⁵⁷ Um único processo de congelamento/descongelamento é capaz de reduzir a resposta imune, porém, múltiplos processos de congelamento/descongelamento podem ser utilizados durante um processo de

descelularização sem afetar drasticamente as proteínas da MEC.⁷¹ Após a aplicação desse método, é necessário fazer a remoção dos materiais celulares.⁵⁷

As células também podem ser lisadas com aplicação de pressão direta nos tecidos, mas esse método só é eficiente nos tecidos e órgãos que não possuem uma matriz extracelular organizada de forma tão densa, como por exemplo, o fígado e o pulmão.⁵⁷

A agitação mecânica e a sonicação devem ser utilizadas simultaneamente com tratamentos químicos para auxílio da lise celular e remoção dos *debris* celulares.⁵⁷ Keane e colaboradores (2012) afirmam que as células remanescentes dissociadas podem ser removidas por agitação mecânica.⁵⁴ Hung e colaboradores (2013) afirmam a importância da sonicação durante a descelularização de tecidos provenientes da laringe, porém esse método pode afetar a estrutura do material.⁷¹ Em todos esses procedimentos, a velocidade ótima da agitação mecânica e volume de reagente dependem da composição, volume e densidade do tecido.⁵⁷ Tecidos densos como a traqueia necessitam de longos protocolos de descelularização sob agitação variando entre dias e meses.⁷¹

Os métodos químicos envolvem tratamentos com soluções alcalinas e ácidas, detergentes não-iônicos, detergentes iônicos, soluções hipotônicas e hipertônicas entre outros.⁵⁷

Os detergentes iônicos e não-iônicos solubilizam as membranas celulares e dissociam as moléculas de DNA, porém, esses materiais também rompem as proteínas da MEC.⁷¹ É importante ressaltar que se faz necessária a remoção do detergente residual após o tratamento, pois o mesmo pode apresentar toxicidade que poderá afetar a rescelularização do arcabouço posteriormente.⁷¹ Sendo assim, o ideal é a realização de inúmeras lavagens sob constante agitação.⁷¹

Os detergentes não-iônicos têm sido usados amplamente nos protocolos de descelularização devido aos seus efeitos relativamente suaves nas estruturas teciduais.⁵⁷ Esses detergentes rompem as interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, mas não alteram a conformação funcional porque mantêm as interações proteína-proteína dos tecidos intactas.⁵⁷ O triton X-100 é o detergente não iônico mais amplamente utilizado nos protocolos de descelularização, pois não afeta o conteúdo glicosaminoglicano drasticamente, quando comparado com outros agentes de descelularização.^{72,73}

Contudo, a descelularização da cartilagem traqueal requer um detergente iônico capaz de agir através da matriz extracelular densa desse tecido.²⁸ Os detergentes iônicos são eficientes na solubilização das membranas celulares citoplasmáticas e nucleares, mas tendem a desnaturar as proteínas rompendo as interações proteína-proteína.⁵⁷ Os mais comumente

utilizados são dodecil sulfato de sódio (SDS), deoxicolato de sódio (DS) e triton X-200.⁵⁷ Comparado com outros detergentes, o SDS promove uma remoção muito completa dos restos nucleares e de proteínas citoplasmáticas, como a vimentina.^{56,57} O DS é extraído da bile e é eficaz na solubilização da membrana celular, pois a matriz extracelular é rompida durante o tratamento e as células são expostas a esse agente.²⁸

A literatura demonstra que os detergentes podem romper colágeno em determinados tecidos o que reduz a força mecânica, entretanto, o mesmo detergente pode não apresentar essa ação em outros tecidos.⁷¹ Estudos ainda demonstram que detergentes podem afetar a presença de GAGs nas MECs, o que pode acarretar em um impacto negativo no comportamento viscoelástico do tecido.⁷¹ Outra variável é o tempo de exposição aos agentes de descclularização, por exemplo, Macchiarini utiliza repetidos ciclos de descclularização com DS e enzimas e há profundas alterações mecânicas entre 18-25 ciclos.⁷¹

As técnicas enzimáticas de descclularização incluem o uso da digestão de proteases e nucleases.⁵⁷ A tripsina é uma das enzimas mais comumente utilizadas nos protocolos de descclularização, já que é altamente específica.⁵⁷ As endonucleases catalisam a hidrólise das ligações interiores das cadeias de ribonucleotídeo e desoxiribonucleotídeo, enquanto as exonucleases catalisam a hidrólise das ligações terminais dessas cadeias levando à degradação do RNA e do DNA.⁵⁷ Os métodos enzimáticos de descclularização provocam um efeito adverso nos componentes extracelulares de tecidos e órgãos.⁵⁷ O tratamento prolongado com tripsina/EDTA reduz o conteúdo de laminina e fibronectina da matriz extracelular, mas não afeta a quantidade de colágeno.⁵⁷

O protocolo detergente-enzimático descrito por Macchiarini e colaboradores (2008) torna a traqueia um órgão não-imunogênico preservando as propriedades estruturais e mecânicas e a presença do fator de crescimento fibroblástico básico que promove a vascularização do enxerto.^{11,31} O detergente DS promove a solubilização das membranas celulares onde estão presentes o antígenos MHC e os núcleos são destruídos pelas DNAses.³¹ Entretanto, é necessária uma quantidade exorbitante de enzima, o que torna o processo caro,⁴³ sendo importante sua substituição por outro agente de descclularização.

O *Light Emitting Diode* (LED) é um dispositivo semiconductor, que emite luz quando uma tensão é aplicada.^{74,75} Para compreender a interação da radiação laser com o tecido biológico é necessário levar em consideração as propriedades ópticas do tecido, o comprimento de onda da radiação de excitação, a densidade de potência (irradiância) e de energia (fluência) entregues a esse tecido.⁷⁶ A célula possui um limiar de sobrevivência, que depende de sua linhagem e do seu estado fisiológico.⁷⁶

Quando se trabalha respeitando o limiar de determinada célula, oferecendo uma baixa intensidade de potência do laser, a energia fornecida será utilizada pela própria célula de maneira a estimular sua membrana ou suas mitocôndrias.⁷⁶ Dessa forma, a célula será induzida a biomodulação, ou seja, ela trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada, a isso se denomina Laser Terapia de Bioestimulação, com Laser de Baixa Potência.⁷⁶

Os efeitos estimulantes da luz visível de baixa potência são atribuídos à formação de pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio e antioxidantes.⁷⁷ Essa formação altera o estado redox celular, que pode disparar a estimulação celular.⁷⁷ Os efeitos do estresse oxidativo dependem da dimensão das variações. Uma célula é normalmente capaz de superar os efeitos do estresse se as perturbações no equilíbrio redox forem pequenas, restabelecendo o equilíbrio normal intracelular com efeitos estimulatórios positivos nas células, mas perturbações de maior escala podem ser letais para as células, fenômeno que ocorre na terapia fotodinâmica.⁷⁸⁻⁸⁰ Sendo assim, este estudo utiliza LED em alta dose para auxiliar a descelularização do tecido.^{81,82}

Para determinar a eficiência da remoção do material celular dos tecidos existem métodos rotineiros como a avaliação por corantes padrões, hematoxilina e eosina, utilizados como uma primeira linha de inspeção para determinar resíduos de estruturas nucleares ainda presentes no tecido.⁵⁷ A presença de células do doador do tecido biológico após o processo de descelularização induz uma série de eventos que resultam em um processo inflamatório como, por exemplo, o acúmulo de células mononucleares e leucócitos polimorfonucleares, edema, infiltração fibroblástica e formação de tecido de cicatrização.^{54,58}

No caso das células que ficam protegidas por uma matriz extracelular densa, os condrócitos, o processo de descelularização torna-se ineficaz, pois não é possível realizar a remoção completa dessas células.^{11,15,24,29,51,55,58,71,83} Entretanto, isso não seria um fator limitante, pois a presença dos condrócitos remanescentes pode ser tolerada durante o remodelamento da matriz e a substituição destas células pelas células do receptor do transplante.⁵¹ Além disso, sabe-se que a mucosa traqueal é a principal área responsável pela rejeição por apresentar importante antigenicidade, pois os antígenos MHC-I e MHC-II estão presentes nas células epiteliais e nas glândulas subepiteliais e não na cartilagem da traqueia.^{1,23,51,66,83} Um processo de descelularização que remove o epitélio respiratório promove tolerância imune do enxerto.⁶⁶

Após a descelularização, faz-se necessário realizar a rescelularização do arcabouço a fim de se garantir a viabilidade do enxerto; os condrócitos são necessários para

que não ocorra o colapso e as células epiteliais evitam a obstrução fibroproliferativa da luz traqueal.²⁸ Assim, um transplante de traqueia construído por técnicas de engenharia de tecidos, só apresentará sucesso clínico se for uma traqueia funcional e celular.⁶

1.7. Justificativa

Defeitos traqueais e estenoses podem ser causados por anomalias congênitas, trauma, câncer e infecção.³⁵ Apesar de a traqueia ser visivelmente um órgão tubular simples, ela apresenta complexas estruturas e funções, o que dificulta a regeneração traqueal.⁴⁵ Apesar do avanço nas técnicas cirúrgicas, ainda não há um substituto traqueal adequado e a substituição traqueal permanece um grande desafio científico e técnico. Diante desse cenário e da realidade de que os tratamentos das anomalias traqueais englobam altos custos econômicos, sociais e humanos provocando um impacto negativo na vida dos indivíduos acometidos, o maior desafio é construir, por meio de técnicas de ET, uma via respiratória funcional que seja uniforme e permita adesão celular nas superfícies externa e interna da matriz tubular tridimensional, cocultivando diferentes tipos celulares e que seja altamente eficiente na manutenção da luz traqueal durante os movimentos respiratórios.

1.8. Relevância do tema

A necessidade de substitutos traqueais é discutida no mundo inteiro. Essa informação é facilmente observada nas Figuras 6 e 7 com o levantamento de revisão bibliográfica utilizando como ferramenta de busca a base de dados Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, 27 de janeiro de 2015).

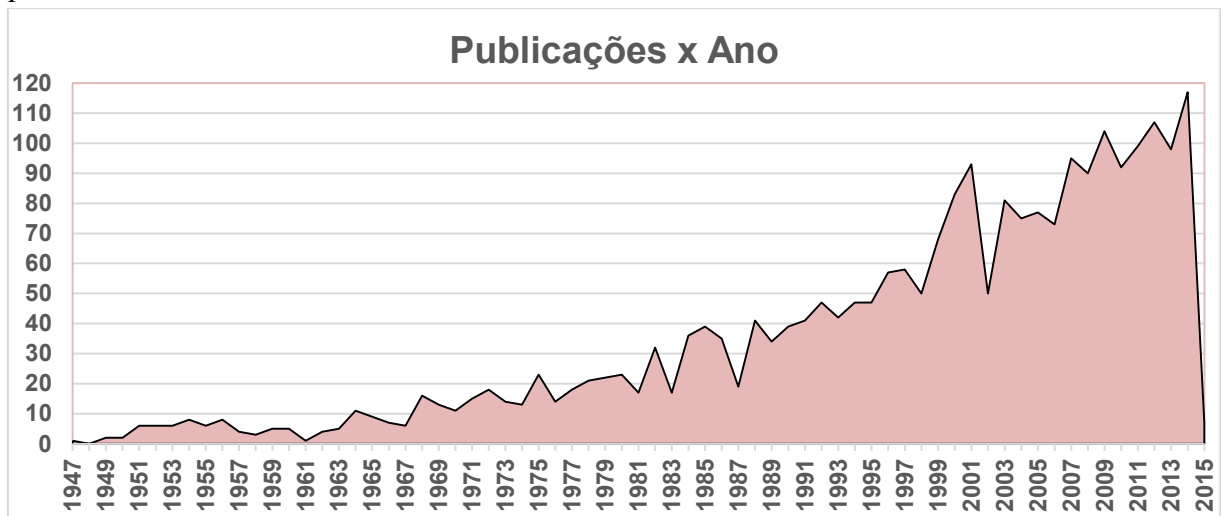
Figura 6 - Pesquisa bibliográfica utilizando as principais palavras-chave referentes ao tema

Busca	Nº de Publicações
<i>Tracheal reconstruction</i>	2.433
<i>Tracheal transplantation</i>	2.287
<i>Tracheal transplantation rejection</i>	322
<i>Tracheal scaffold</i>	147
<i>Tracheal reconstruction and tissue engineering</i>	120
<i>Tracheal reconstruction and mesenchymal stem cells</i>	15

Fonte: base de dados Pubmed, 27 de janeiro de 2015.

O primeiro artigo publicado com a palavra-chave *Tracheal reconstruction* (Reconstrução de traqueia) foi no ano de 1947; a Figura 7 demonstra que o interesse na área vem crescendo exponencialmente desde então. Durante o período compreendido entre 1947 e janeiro de 2015, 2.433 publicações foram indexadas no Pubmed sobre o tema acima (Figura 6). O padrão de distribuição de artigos é relativamente homogêneo com alguns pontos fora da curva, o que mostra a preocupação com a problemática.

Figura 7 - Publicações por ano utilizando a palavra-chave *Tracheal reconstruction* durante o período de 1947 – 2015



Fonte: base de dados Pubmed, 27 de janeiro de 2015.

Frente a esses relevantes dados de publicações acima mencionados, a ET aparece como ferramenta que aporta soluções para problemas médicos até então difíceis de serem transponíveis. Mesmo assim, desafios científicos como a identificação de estruturas tridimensionais artificiais ou homólogas descelularizadas, fatores de crescimento e estímulo à adesão das células expandidas *in vitro* sobre o arcabouço, a biocompatibilidade e o tempo de produção em laboratório ainda continuam sendo fatores limitantes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Tendo em vista o desafio do tratamento de lesões traqueais e o progresso na produção desse órgão por técnicas de engenharia de tecidos, faz com que o interesse nessa área cresça de forma considerável. Assim, este estudo tem como objetivo a construção de modelo de traqueia para enxerto utilizando técnicas de engenharia de tecidos.

2.2. Objetivos Específicos

1. Desenvolver técnica de descaracterização antigênica de traqueia retirada de animal doador-coelho como proposta de preparo de modelo tridimensional de suporte para enxerto de traqueia.
2. Obter CTMs a partir de tecido adiposo. Realizar sua diferenciação em condrócitos e células de músculo liso.
3. Expandir *ex vivo* o epitélio de revestimento traqueal pseudoestratificado cilíndrico ciliado a partir de biópsia de epitélio de mesma origem.
4. Reconstruir a neotraqueia com condrócitos e músculo liso diferenciados na face externa e epitélio de revestimento na face interna.
5. Realizar os transplantes traqueais.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

O presente estudo foi efetuado com coelhos *New Zealand* da raça Botucatu, pesando entre 3,0 e 4,0 kg, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da UNESP – *Campus* de Botucatu. A utilização desses animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), como consta no Protocolo nº 905/2011 (Anexo).

Os animais foram mantidos no Biotério da Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UNESP – *Campus* de Botucatu em gaiolas individuais com dimensões de 55 x 55 x 55 cm e suspensas a 80 cm do chão. A temperatura ambiente foi mantida em torno de 21°C com ciclos de luz variando entre 12-14 h. Eles receberam ração para coelhos (Nutricoechos, Purina Nutrimentos Ltda.) e água *ad libitum* durante todo o tempo do estudo, e foram mantidos sob os cuidados de técnicos especializados.

Este estudo foi realizado em duas etapas com diferentes repetições do protocolo de descelularização, ou seja, cinco ciclos e 10 ciclos (descritos no item abaixo – *Descelularização das traqueias*).

Na primeira etapa, foram utilizados 20 animais, desses 12 foram submetidos aos transplantes traqueais e os outros oito coelhos foram utilizados para a coleta das traqueias que foram utilizadas nos implantes e nos ensaios de tração:

Grupo I (n = 4) - *Sham*.

Grupo II (n = 4) - receberam implante de traqueias descelularizadas com cinco ciclos.

Grupo III (n = 4) - receberam implante de traqueias descelularizadas com cinco ciclos e posteriormente rescelularizadas.

Na segunda etapa, foram utilizados 40 animais, desses 20 foram submetidos aos transplantes traqueais e os outros 20 coelhos foram utilizados para a coleta das traqueias que foram utilizadas nos implantes e nos ensaios de tração:

Grupo IV (n = 4) - *Sham*.

Grupo V (n = 10) - receberam implante de traqueias descelularizadas com 10 ciclos.

Grupo VI (n = 10) - receberam implante de traqueias descelularizadas com 10 ciclos e posteriormente rescelularizadas.

Os animais do grupo IV – *Sham*, controles da segunda etapa, foram os mesmos animais do grupo I, controles da primeira etapa. Os animais foram randomizados previamente.

3.2. Obtenção das traqueias

Os 28 animais utilizados para a etapa de retirada das traqueias (coelhos doadores) foram provenientes de outros experimentos de alunos da pós-graduação com eutanásia previamente agendada e sem complicações que pudessem interferir neste estudo, dessa forma, nenhum animal precisou ser sacrificado exclusivamente para a coleta das traqueias. A obtenção das traqueias foi realizada no mesmo tempo anestésico com intuito de minimizar o estresse cirúrgico dos animais. A anestesia utilizada foi cloridrato de ketamina 35-50 mg/kg (Syntec, SP, Brasil) + cloridrato de xilazina 5-10 mg/kg (Syntec, SP, Brasil) de peso vivo administrado via intramuscular.⁸⁴⁻⁸⁶

Os segmentos de traqueias, medindo entre 4,0-6,0 cm (aproximadamente 25-30 anéis traqueais)⁶⁶ foram retirados e imediatamente lavados com solução salina estéril a 0,9% para retirar o excesso de sangue e depois foram transportados com HEPES contendo antibiótico até o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina da UNESP – *Campus* de Botucatu, onde foram submetidos à dissecação microscópica para a retirada da maior quantidade possível de tecido conjuntivo. Algumas dessas traqueias coletadas foram separadas para serem utilizadas no Ensaio de Tração das traqueias *in natura*, e outras foram separadas para a realização da descelularização.

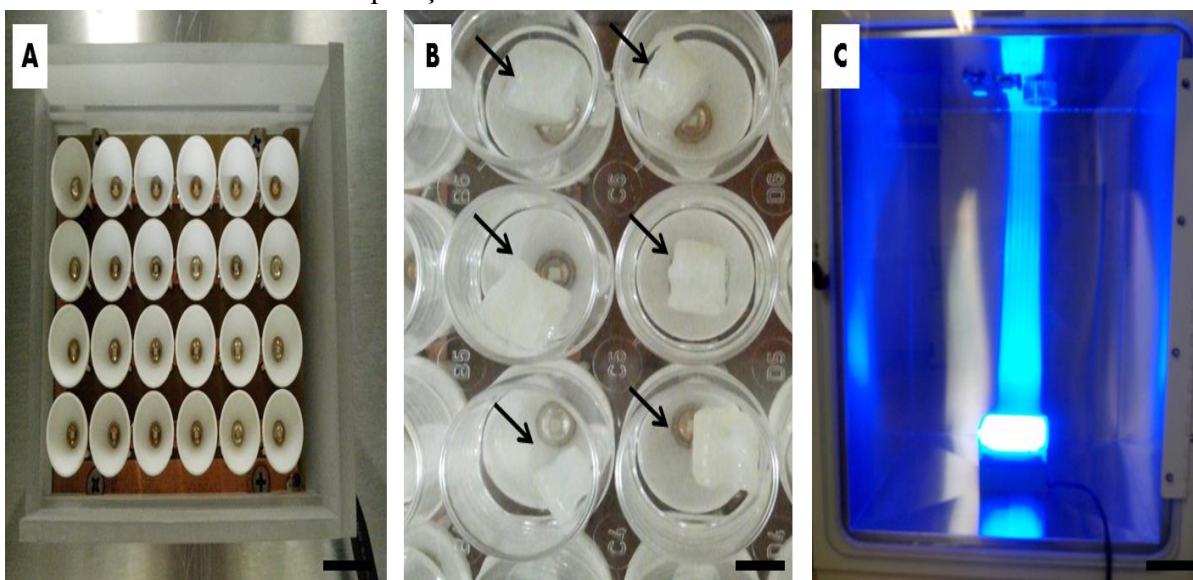
3.2.1. Descelularização das traqueias

As traqueias foram divididas em fragmentos de aproximadamente 0,7-1,0 cm (aproximadamente 4-5 anéis cartilagosos) que foram submetidos aos tratamentos. Foram realizados cinco e 10 ciclos do protocolo de descelularização escolhido a fim de se verificar quantos ciclos são necessários para a produção de um arcabouço não imunogênico, preservando-se a composição, estrutura e as propriedades mecânicas da matriz extracelular. Sendo assim, esse protocolo utiliza os seguintes fatores de descelularização:

- a) Congelamento/descongelamento entre 3-24 meses sem adição de nenhum crioprotetor;
- b) Banho ultrassônico no aparelho *Ultrasonic cleaner - Uniquemodel USC 1400*[®], frequência de 40 Khz durante 10 minutos;
- c) Irradiação do LED com comprimento de onda de 450nm \pm 20nm na dose de 90 J/cm² totalizando 60 minutos de exposição (Figura 8);
- d) Adição de deoxicolato de sódio a 4% sob agitação 180 rpm no *C24 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific)* durante 48 horas,
- e) Lavagens com PBS no *C24 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific)*.

As etapas “b” até “e” foram repetidas cinco e 10 vezes. Posteriormente, essas traqueias foram lavadas 10 vezes em PBS acrescido de 10% de antibiótico-antimicótico (Gibco® Invitrogen) sob agitação, durante 10 minutos. Alguns anéis traqueais foram separados para análise histológica, sendo os fragmentos fixados em formol, incluídos em parafina, cortados em um micrótomo e corados com hematoxilina-eosina (HE), *alcian blue* e picrossírius. Feito isso, as traqueias descelularizadas foram conservadas em geladeira em álcool 70%.

Figura 8 - Protocolo de descelularização das traqueias **a)** Emissores da luz da *Biotable*; **b)** Fragmentos traqueais (1 cm) nos poços da placa acoplada na base da *Biotable* (setas); **c)** Irradiação do LED com comprimento de onda de 450nm +/- 20 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 60 minutos de exposição.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 1 cm.

3.2.2. Quantificação de DNA das traqueias

Esse teste foi realizado em triplicata no Laboratório de Neogene da Faculdade de Medicina da UNESP – *Campus* de Botucatu para detecção da quantidade de DNA após os ciclos de descelularização quando comparada com a quantidade de DNA presente nas traqueias *in natura*. Após extração do DNA, o mesmo foi quantificado pelo equipamento Nanodrop® (*Spectrophotometer* ND 1000). Foi realizada a pesagem de três anéis traqueais diferentes: das traqueias *in natura* (controle), das traqueias descelularizadas com cinco ciclos e das traqueias descelularizadas com 10 ciclos, seguida da extração do DNA em etapas:

1. Fragmentação dos anéis traqueais com auxílio de bisturi;
2. Adição de 400 µl de Tampão de Lise de Células Brancas (WCLB) e 20 µl de Proteinase K;

3. Manutenção em banho-maria a 37° C por 24 h para que ocorra a digestão do material;
4. Adição de 500 µl de fenol (25 fenol: 24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico);
5. Centrifugação a 14.000 rpm durante 20 minutos;
6. Transferência do sobrenadante para um tubo de 1,5 µl novo;
7. Adição de 500 µl de fenol (25 fenol: 24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico);
8. Centrifugação a 14.000 rpm durante 20 minutos;
9. Transferência do sobrenadante para um tubo de 1,5 µl novo;
10. Adição de 500 µl de clorofórmio;
11. Centrifugação a 12.000 rpm durante 10 minutos;
12. Transferência do sobrenadante para um tubo de 1,5 µl novo;
13. Adição de 2,5 ml de etanol absoluto gelado e 0,5 ml de acetato de amônio 7,5M;
14. Precipitação no gelo por aproximadamente três horas;
15. Centrifugação a 14.000 rpm durante 30 minutos;
16. Após descarte do sobrenadante, adição de 1 ml de etanol 70%;
17. Centrifugação a 14.000 rpm durante cinco minutos;
18. Após descarte do sobrenadante, manutenção em temperatura ambiente até secagem do material;
19. Ressuspensão do DNA em 40 µl de água MilliQ.

3.2.3. Avaliação da toxicidade residual das traqueias descelularizadas

O teste de toxicidade residual foi realizado em dois períodos (48 horas e 15 dias) para análise da possível indução de apoptose das CTMs isoladas do TA quando em contato físico com os arcabouços de traqueias descelularizadas, devido à utilização do Deoxicolato de Sódio no protocolo de descelularização.²⁸ Utilizou-se o Teste de Anexina-V/Iodeto de Propídeo com o kit BD *Pharmingen*TM FITC *Annexin-V Apoptosis Detection* para Citometria de Fluxo.

Esses testes foram realizados em triplicata, assim, três fragmentos de traqueias descelularizadas com protocolo de descelularização descrito anteriormente medindo aproximadamente 1,5-2,0 cm (8–10 anéis cartilagosos) foram colocados em três poços de placas de cultura não aderente (Nunc[®]) e 1x10⁶ CTMs foram aplicadas sobre os mesmos. O controle da reação foi realizado em outros três poços da placa de cultura nos quais foram aplicadas somente as CTMs sem a presença dos arcabouços (Figura 9). O meio de cultura (MC) utilizado foi o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) Knockout[®] (InvitrogenTM).

Figura 9 - Avaliação da toxicidade das traqueias descelularizadas



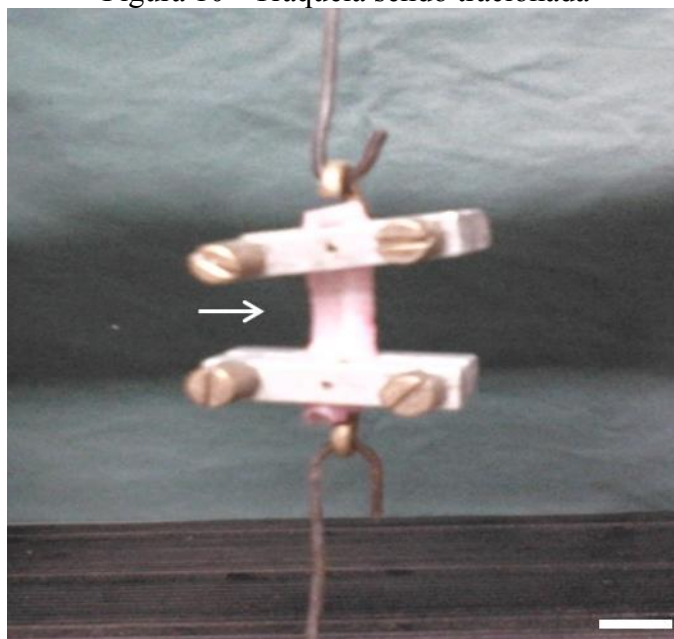
Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 1 cm. Nos três poços superiores da placa há fragmentos das traqueias descelularizadas (setas) em contato com as CTMs; já nos três poços inferiores há somente CTMs sem a presença das traqueias descelularizadas.

Uma placa de cultura foi mantida em estufa por 48 horas e a outra durante 15 dias, a 37°C, com 5% de CO₂ a fim de garantir contato e adesão celular ao arcabouço. Após esses períodos, as células foram recuperadas e, imediatamente, foram realizadas as marcações com Anexina-V/Iodeto de Propídeo por citometria de fluxo, seguindo-se o protocolo do fabricante. Posteriormente, as leituras foram feitas no equipamento *FACSCalibur* BD[®] e as reações analisadas pelo *software CellQuest*[™] BD levando-se em consideração padrão anteriormente estabelecido no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina da UNESP – *Campus* de Botucatu.

3.2.4. Ensaios Biomecânicos das traqueias

O Ensaio de Tração foi realizado no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UNESP – *Campus* de Botucatu, e teve por objetivo comparar a rigidez entre traqueias *in natura* e descelularizadas com cinco e 10 ciclos. O equipamento utilizado foi Máquina Universal de Ensaios Mecânicos EMIC[®], modelo DL 10.000, com precisão de $\pm (0,018 + F/3700)$ kN, apurada dentro das especificações das normas ABNT NBR NM ISO 7500-1:2004 e ABNT NBR 6674:1999. O equipamento trabalha em conjunto com um microcomputador, em ambiente *Windows*[™] 2000, utilizando o programa *Mtest*[®] (DDL, Minnesota – USA) para o controle gráfico e aferição dos resultados (Figura 10).

Figura 10 - Traqueia sendo tracionada



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 1 cm.

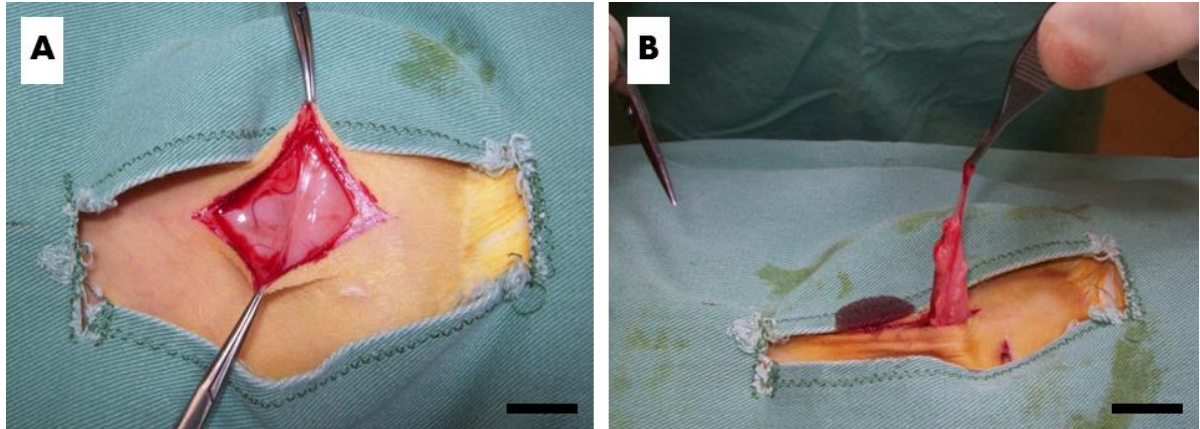
Nas traqueias *in natura*, o Ensaio de Tração foi realizado imediatamente após a coleta; já nas traqueias descelularizadas, o ensaio foi realizado após o processo de descelularização. Foram utilizados segmentos de traqueias *in natura* (n=20) e segmentos de traqueias descelularizadas com cinco ciclos (n=20) e 10 ciclos (n=20), cada segmento medindo aproximadamente 2,0 cm – 10 anéis traqueais.

3.3. Obtenção das CTMs

Essa etapa foi realizada exclusivamente nos 14 coelhos dos grupos III e VI (animais que receberam implante de traqueias descelularizadas e posteriormente rescelularizadas). A anestesia utilizada foi cloridrato de ketamina 35-50 mg/kg (Syntec, SP, Brasil) + cloridrato de xilazina 5-10 mg/kg (Syntec, SP, Brasil) de peso vivo administrado via intramuscular.⁸³⁻⁸⁵

A área a ser utilizada para a coleta do tecido adiposo, isto é, região dorso-anterior dos animais, foi submetida à tricotomia e antissepsia; pois o número de CTMs isoladas da medula óssea é pequeno quando comparado ao número dessas células presentes na gordura.⁸⁷ Realizou-se pequena incisão expondo o tecido adiposo, o qual foi pinçado, retirado e transferido para um tubo cônico de 50 ml contendo HEPES com antibiótico. O material foi então pesado, fragmentado e submetido à realização de digestão enzimática, a fim de se obter as CTMs (Figura 11).

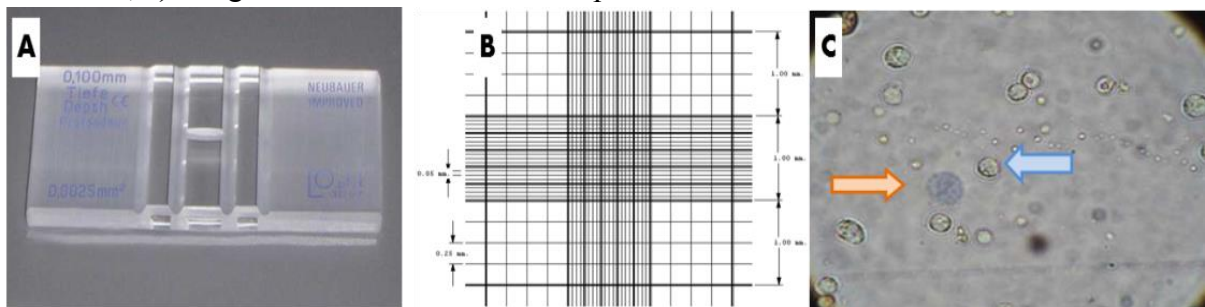
Figura 11 - Obtenção das CTMs a partir do TA do coelho **a)** Incisão no dorso do coelho; **b)** Coleta do TA.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 1 cm.

A amostra de gordura foi colocada na solução enzimática de Colagenase Tipo I (Invitrogen™) e ficou na estufa, ou seja, em atmosfera úmida a 5% de CO₂ e 37° C durante 15 horas. Após a ação enzimática, a reação foi inativada com soro fetal bovino a 10%. O material foi centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm. Formado o *pellet*, esse foi ressuspensão com 1 mL de MC. Retirou-se alíquota de 30 µl do *pellet* para a contagem celular em câmara de Neubauer (Figura 12).

Figura 12 - Contagem celular em câmara de Neubauer **a)** Câmara de Neubauer; **b)** Quadrantes da câmara; **c)** Imagem da câmara em microscopia de luz no aumento de 100X.



Na foto C, as células viáveis estão representadas pela seta azul, já as células inviáveis apresentam o citoplasma corado com azul de Trypan (seta laranja).

A contagem celular em câmara de Neubauer tem como finalidade a verificação da viabilidade celular e número de células para, então, realizar o plaqueamento em frascos de 25 cm² de área de cultura (Nunc®) e dar seguimento à cultura. O MC utilizado foi o DMEM Knockout® (Invitrogen™), suplementado com 5 ml de antibiótico/antimicótico (Invitrogen™), 5 ml de L-glutamina (Invitrogen™), 5 ml de aminoácidos essenciais (Invitrogen™), 2,5 ml de aminoácidos não-essenciais (Invitrogen™) e 50 ml de soro fetal bovino (Invitrogen™).

As células permaneceram em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ (Thermo Class 100[®]). Ao identificar, no monitoramento por microscopia invertida (microscópio Axiovert 200[®], Zeiss[™]) que os poços apresentavam confluência de 80% da placa, as células foram destacadas com 0,25% de tripsina/1mm de EDTA (Invitrogen[™]), contadas em câmara de Neubauer e replaqueadas em frascos de 75 cm² (Nunc[™]).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu critérios para que uma célula possa ser definida como CTM: aderência ao frasco de cultura após várias passagens, capacidade de se diferenciar em cartilagem, tecido ósseo e tecido adiposo, e através de alguns marcadores de superfície.⁶⁵

3.3.1. Caracterização das CTMs por citometria de fluxo

A caracterização das CTMs foi realizada após terceira passagem em cultura com os marcadores de superfície (*clusters of differentiation* – CD), com o uso de anticorpos específicos para citometria de fluxo, técnica essa que mede características físico-químicas de células individualmente, as quais passam por um sistema fluido e são detectadas por um ou mais sensores óticos e eletrônicos.

Tendo em vista que não havia no mercado anticorpos específicos para o reconhecimento de antígenos expressos nas CTMs de coelho, foram usados dois anticorpos *anti-rat* como controles positivos para estas células: Anti-CD90 (*anti-rat*) – Caltag Laboratories[®] e o Anti-CD90 (*anti-rat cross reacting with rabbit*) – Biolegend[®], sendo que a bula do anticorpo da Biolegend[®] garante reação cruzada com coelho. Além disso, foram utilizados dois anticorpos monoclonais (AcMn) do protocolo MSC produzidos pelo Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina da UNESP – Campus de Botucatu, obtidos na dissertação de Moroz em 2009.⁸⁸ Esses clones foram produzidos a partir de CTM de medula óssea de coelho. Os AcMn obtidos *home made* utilizados foram: MSC1-160A69 (+ com 78,8% de CTM) e MSC1-160A30 (+ com 84,57% de CTM).

3.3.2. Caracterização das CTMs por diferenciação: osteogênica, adipogênica e condrogênica

Após terceira passagem em cultura, foram realizadas as diferenciações osteogênica, adipogênica e condrogênica utilizando os kits de diferenciação STEMPRO (Invitrogen[™]).

Diferenciação osteogênica: as células foram tripsinizadas e mantidas em placas de cultura aderentes. Troca do MC indutor utilizado três vezes na semana. Após 14 dias, as células foram coradas com *Alizarin Red*.

Diferenciação adipogênica: as células foram tripsinizadas e mantidas em placas de cultura aderentes. Troca do MC indutor utilizado três vezes na semana. Após 14 dias, as células foram coradas com *Oil Red*.

Diferenciação condrogênica: as células foram tripsinizadas e mantidas em *pellets* em tubos Falcon de 15 mL para garantir cultura tridimensional (3D) necessária para que ocorra a diferenciação condrogênica, já que quando cultivados em monocamadas ocorre a desdiferenciação com formação de células fibroblásticas.^{24,49,89} Troca do MC indutor utilizado três vezes na semana. Após 21 dias, os *pellets* condrogênicos foram fixados em formol, incluídos em parafina, cortados em um micrótomo e corados com Azul de Toluidina.

Os controles da reação foram poços com CTMs mantidas com MC DMEM Knockout[®] (Invitrogen[™]) sem os suplementos indutores das três diferenciações.

3.3.3. Diferenciação das CTMs em músculo liso

Após terceira passagem em cultura, as células foram tripsinizadas e mantidas em placas de cultura aderentes. O MC utilizado foi DMEM F12 (Invitrogen[™]) 1% de soro fetal bovino, suplementado com BMP-4, e TGF- β 1. O meio de cultura indutor utilizado foi trocado três vezes na semana. O controle da reação foi um poço com CTMs mantidas com meio de cultura DMEM F12 sem os suplementos indutores de células de músculo liso (CMLs).

Após 21 dias, foi realizada Imunocitoquímica nas células, etapa realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP – *Campus* de Botucatu. O protocolo utilizado para realização da técnica envolveu a recuperação antigênica com solução *Trilogy (Cell Marque 920P)* pelo método de calor em banho-maria por 20 minutos. Após esse procedimento foi feita a incubação com anticorpos primários *Anti-Human Muscle Actin*, clone HHF35 (Dako), *Anti-Human Smooth Muscle Actin*, clone 1A4 (Dako) e *Anti-Rabbit Smooth Muscle Actin*, clone 1A4 (Sigma[®]) por 18 horas em geladeira a 4°C para confirmação do fenótipo de célula de músculo liso. Posteriormente, foi feita nova incubação com anticorpo secundário (*Anti-Mouse*) e terciário (Amplificador) utilizando-se kit de detecção por polímeros *Hidex (Cell Marque 954D)* por 10 minutos cada um, e revelação com cromógeno 3,3-diaminobenzidina (*Spring BGDAB-999*). A contracoloração foi realizada com hematoxilina. CTMs isoladas de TA de coelhos foram utilizadas como controle negativo.

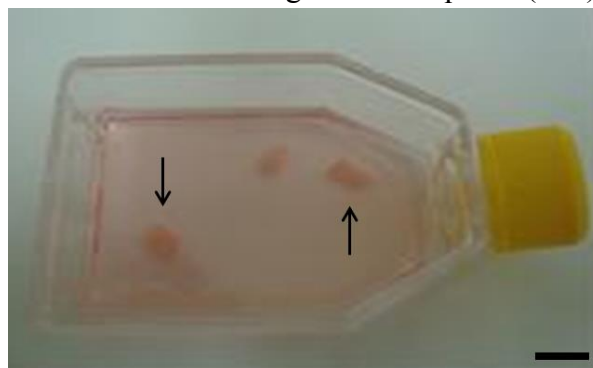
Além disso, foi realizado o controle negativo da técnica na qual não foi incluído o anticorpo primário.

3.4. Expansão *ex vivo* das células epiteliais respiratórias

Essa etapa foi realizada exclusivamente nos 14 coelhos dos grupos III e VI (animais que receberam implante de traqueias descelularizadas e posteriormente rescelularizadas). Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina 35-50 mg/kg (Syntec, SP, Brasil) + cloridrato de xilazina 5-10 mg/kg (Syntec, SP, Brasil) de peso vivo administrado via intramuscular.⁸⁴⁻⁸⁶ Para expansão *ex vivo* das células epiteliais respiratórias (CERs) foram realizados dois protocolos seguindo propostas originais. Esses protocolos foram denominados fragmentos traqueais e lavado traqueal. O MC utilizado nesses dois protocolos foi o *Keratinocyte* sem soro fetal (InvitrogenTM), suplementado com 25 µg/ml de extrato de pituitária bovina, 0,4 ng/ml de fator de crescimento epidermal recombinante e 0,03 mmol/l de cloreto de cálcio, sendo que o MC foi trocado três vezes na semana.

Fragmentos traqueais: foi realizada uma pequena abertura na traqueia a 1,0 cm da laringe e um anel traqueal foi retirado. Este anel foi transportado ao laboratório de Engenharia Celular da Faculdade de Medicina da UNESP – *Campus* de Botucatu em solução estéril de HEPES contendo penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). Em fluxo laminar, esse anel traqueal foi fragmentado em amostras de 4-5 mm de tamanho e colocadas em frasco de 25 cm² (NuncTM) Figura 13.

Figura 13 - Frasco T25 cm² com os fragmentos traqueais (seta) e MC apropriado



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 1 cm.

Raspado traqueal: foi realizada uma pequena abertura na traqueia a 1,0 cm da laringe e um anel traqueal foi coletado. Esse anel foi transportado ao laboratório de Engenharia Celular da Faculdade de Medicina da UNESP – *Campus* de Botucatu em solução estéril de HEPES contendo penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). Em fluxo

laminar, esse anel traqueal foi aberto e, com auxílio de tesoura estéril, raspagens da luz traqueal foram realizadas. Posteriormente, esses raspados, visíveis a olho nu, foram plaqueados em frasco de 25 cm² (NuncTM) com MC apropriado.

3.4.1. Caracterização das CERs por imunocitoquímica

Essa etapa foi realizada no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências – *Campus* de Botucatu. Após a primeira passagem, a imunocitoquímica foi realizada utilizando o anticorpo mouse anti-*human* beta-catenina (DakoCytomation) para confirmar o fenótipo epitelial. A beta-catenina é uma proteína de adesão presente no epitélio, envolvida em pelo menos dois processos: adesão célula-célula e comunicação celular. A adesão celular ocorre com a ligação da beta-catenina à proteína transmembrana caderina.

A técnica de imunocitoquímica para células em cultura foi realizada seguindo o protocolo:

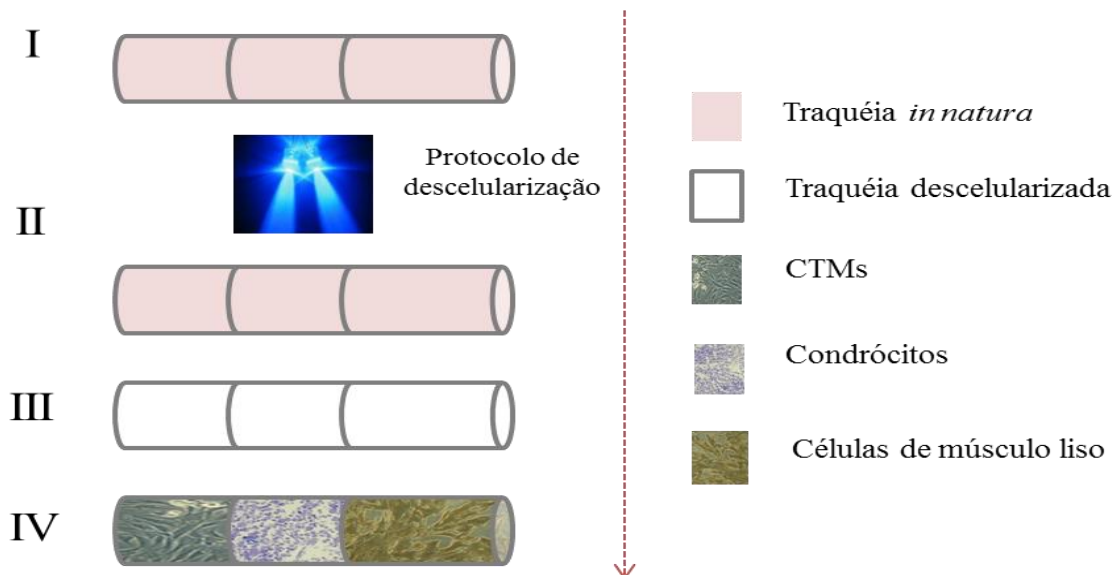
1. Fixação das lâminas em formol tamponado 10% com PBS pH 7,4 durante 5–10 minutos;
2. Três lavagens de cinco minutos cada, com PBS;
3. Bloqueio da peroxidase endógena, com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% em metanol, durante 10 minutos, sem exposição à luz;
4. Três lavagens de cinco minutos cada, com PBS com *tween* 20 0,05%;
5. Bloqueio proteico com BSA 3% em PBS com *tween* 20 0,05% durante uma hora;
6. Aplicação do anticorpo primário beta-catenina (Dako), durante 16 horas, em câmara úmida a 4°C;
7. Três lavagens de cinco minutos cada com PBS com *tween* 20 0,05%;
8. Aplicação do anticorpo secundário durante uma hora em bancada;
9. Três lavagens de cinco minutos cada com PBS;
10. Revelação de cinco minutos com DAB/água/H₂O₂ sem exposição à luz;
11. Contracoração com hematoxilina durante 10 segundos e lavar em água corrente;
12. Desidratação (álcool 70/80/90/100/100/100), álcool-xilol, xilol I, II e III durante um minuto cada;
13. Montagem com permout.

3.5. Montagem das neotraqueias

Em fluxo laminar, as traqueias descelularizadas medindo aproximadamente 1,0–1,5 cm (aproximadamente 5-7 anéis cartilagosos) foram separadas em placas de Petri

estéreis. Com o auxílio de uma pipeta, 4×10^6 condrócitos, 1×10^6 células musculares lisas e 2×10^6 CTMs foram aplicadas na face externa dessas traqueias com auxílio de *Puramatrix Peptide Hydrogel BD*[®], matriz sintética que possui a finalidade de criar microambientes tridimensionais para diferentes linhagens celulares, sendo um importante artifício utilizado como promotor da adesão das células (Figura 14). Após duas horas, tempo necessário para aderência celular, foi adicionado o MC.

Figura 14 - Esquema ilustrativo do processo de rescelularização das traqueias **I** – Traqueia *in natura*; **II** – Processo de descelularização das traqueias; **III** – Traqueias descelularizadas; **IV** – Processo de rescelularização das traqueias com CTMs, condrócitos e células de músculo liso.



Fonte: material elaborado pelo autor.

Essas traqueias foram mantidas em cultura durante 48 horas. Em seguida, um anel traqueal foi seccionado, fixado em formol, incluído em parafina, cortado em um micrótomo e corado com HE. Outro anel foi removido e fixado em glutaraldeído para análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Então, as traqueias medindo 0,7–1,0 cm (aproximadamente 4-5 anéis cartilagosos) foram transplantadas nos respectivos coelhos receptores.

O teste de MEV foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biosciências da UNESP - *Campus* de Botucatu. O material foi pré fixado com glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3 durante quatro horas a 4°C. Após três lavagens com água destilada, o material foi fixado com 0,5% de tetróxido de ósmio durante 30-40 minutos. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e secas

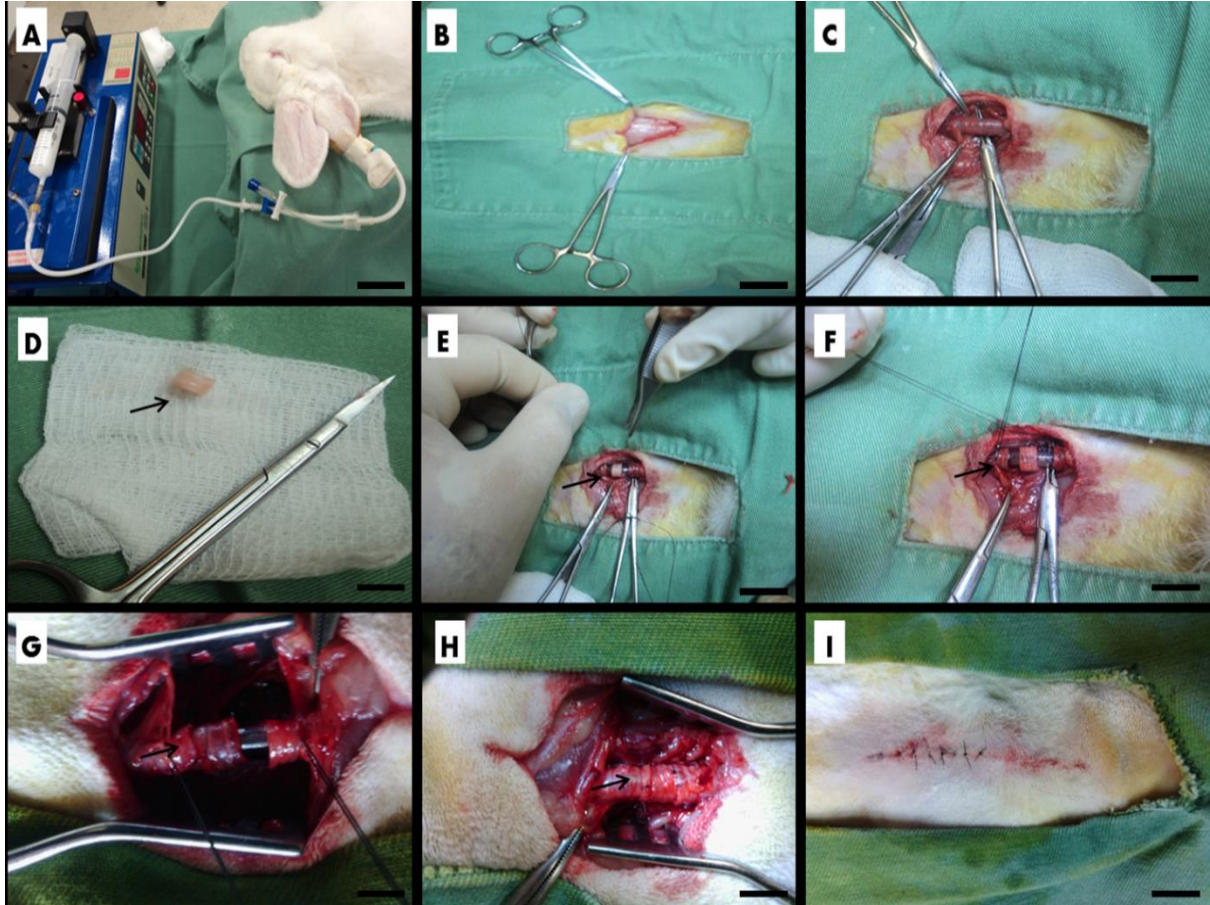
em aparelho de ponto crítico. As traqueias foram montadas em superfície metálica e metalizada com ouro e, em seguida, feita a observação em microscópio eletrônico de varredura, Quanta 200, FEI, Company[®]. O controle da reação foi traqueia descelularizada apenas.

Um segundo experimento de montagem das traqueias foi realizado posteriormente para análise em microscopia de fluorescência. Utilizou-se 1×10^6 CTMs que foram marcadas com o marcador fluorescente *Qtracker[®] Cell Labeling Kits* (Invitrogen[™]) e depositadas na face externa da traqueia descelularizada na presença do *Puramatrix*. Após duas horas, o meio de cultura foi adicionado e essas traqueias com as células marcadas foram transportadas para o Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP – *Campus* de Botucatu para a realização da técnica de congelamento seguida de cortes histológicos e análise no microscópio de fluorescência Olympus BX41 acoplado à câmera digital Olympus Camedia C-7070.

3.6. Transplantes

A anestesia utilizada foi o cloridrato de ketamina 35-50 mg/kg (Syntec, SP, Brasil) + cloridrato de xilazina 5-10 mg/kg (Syntec, SP, Brasil) de peso vivo administrado via intramuscular.⁸⁴⁻⁸⁶ Em posição supina, os coelhos foram fixados à goteira de Claude-Bernard e entubados. A anestesia foi mantida por infusão contínua de Propofol 1% 5-10 mg/kg (BioChimico[®]). Após tricotomia, antisepsia e isolamento por campos estéreis da região anterior do pescoço, foi realizada cervicotomia mediana interessando a pele e o tecido celular subcutâneo. Com auxílio de afastadores, a traqueia foi exposta desde a laringe até a entrada do tórax. Foi realizada a secção transversal compreendendo toda a circunferência da traqueia a 1 cm da laringe com a remoção de 0,7-1,0 cm, ou seja, aproximadamente 4-5 anéis cartilagosos, o que corresponde a 15% do comprimento total da traqueia de um coelho (transplante de segmento curto).⁶⁶ Após a remoção completa do segmento traqueal, foi imediatamente transplantado outro segmento de mesmo tamanho com anastomoses proximal e distal em sutura contínua aerostática com Vicryl 5-0 (Ethicon[®]). Imediatamente antes do fechamento da incisão, foi feita a injeção local de anestésico (cloridrato de lidocaína 2%, 4 mg/kg) e o enxerto foi envolvido com músculos adjacentes e a ferida foi suturada com fio Nylon 4-0 (Ethicon[®]) (Figura 15).

Figura 15 - Transplante traqueal **a)** Anestesia com propofol; **b)** Cervicotomia mediana expondo a pele e o tecido celular subcutâneo; **c)** Imagem da traqueia; **d)** Fragmento traqueal a ser transplantado (seta); **e), f) e g)** Fragmento traqueal no local do transplante (seta); **h)** Fragmento traqueal já transplantado (seta); **i)** Local da cirurgia suturado.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 1 cm.

Os animais foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos.

Primeira etapa (Figura 16):

Grupo I - Sham (n = 4): autotransplante, ou seja, fragmento traqueal foi removido e imediatamente autotransplantado.

Grupo II - traqueias descélularizadas (n = 4): fragmento traqueal foi removido, descartado e imediatamente foi transplantado um fragmento traqueal de coelho doador previamente descélularizado com cinco ciclos.

Grupo III - traqueias rescélularizadas (n = 4): fragmento traqueal foi removido, descartado e imediatamente foi transplantado um fragmento traqueal de coelho-doador previamente descélularizado com cinco ciclos e rescélularizado com as próprias células do coelho receptor. Além disso, esses animais receberam injeção endovenosa (EV) de 1×10^6 CTMs/Kg no sétimo dia, 14º dia, e 21º dia.

Figura 16 - Grupos da primeira etapa dos transplantes traqueais utilizando cinco ciclos de descelularização

Grupo	N	Tratamento
I (sham)	4	autotransplante
II	4	Traquéia descelularizada
III	4	Traquéia rescelularizada + injeção EV de 1×10^6 CTMs por Kg no 7º dia, 14º dia, e 21º dia.

Fonte: material elaborado pelo autor.

Segunda etapa (Figura 17):

Grupo IV - Sham (n = 4): autotransplante, ou seja, fragmento traqueal foi removido e imediatamente autotransplantado.

Grupo V - traqueias descelularizadas (n = 10): fragmento traqueal foi removido, descartado e imediatamente foi transplantado um fragmento traqueal de coelho doador previamente descelularizado com 10 ciclos.

Grupo VI - traqueias rescelularizadas (n = 10): fragmento traqueal foi removido, descartado e imediatamente foi transplantado um fragmento traqueal de coelho-doador previamente descelularizado com 10 ciclos e rescelularizado com as próprias células do coelho receptor. Além disso, esses animais receberam injeção endovenosa de 1×10^6 CTMs/Kg no sétimo dia, 14º dia, e 21º dia.

Figura 17 - Grupos da segunda etapa dos transplantes traqueais utilizando 10 ciclos de descelularização

Grupo	N	Tratamento
IV (sham)	4	autotransplante
V	10	Traquéia descelularizada
VI	10	Traquéia rescelularizada + injeção EV de 1×10^6 CTMs por Kg no 7º dia, 14º dia, e 21º dia.

Fonte: material elaborado pelo autor.

Todos os animais receberam por injeção subcutânea: antibiótico Ceftriaxona (0,5 ml) durante 10 dias após a cirurgia, anti-inflamatório Meloxicam (0,5 ml) durante quatro dias após a cirurgia, e Tramal (0,4 ml) durante quatro dias após a cirurgia.

Após 30 dias, 50% dos animais de cada grupo seriam eutanasiados com injeção de pentobarbital sódico 70-100 mg/kg (Syntec[®], SP, Brasil)⁸⁵ para análise aguda dos transplantes

e os outros animais seriam eutanasiados após 90 dias para análise crônica dos transplantes entretanto, alguns animais vieram a óbito antes. A traqueia (superfície do transplante e traqueia nativa), os pulmões, o fígado e os rins foram removidos para as análises. Primeiramente, a análise macroscópica foi realizada a procura de sinais de rejeição como, por exemplo, necrose, petéquias ou alterações de cor dos órgãos. Posteriormente, esses materiais foram preparados para análise histológica com HE.

3.7. Análise Estatística

A análise estatística foi utilizada para o Ensaio de Tração das traqueias. Técnica da análise de variância para o modelo com um fator complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey⁹⁰ considerando o nível de 5% de significância.

4. Resultados

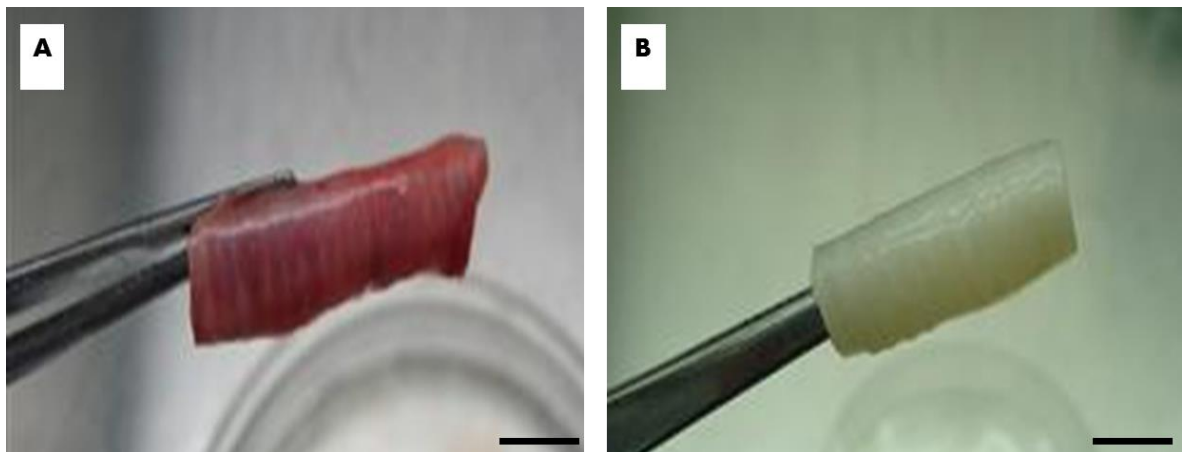
4.1. Obtenção das traqueias

As traqueias foram coletadas e transportadas até o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina – *Campus* de Botucatu, onde foram submetidas à dissecação microscópica.

4.1.1. Descelularização das traqueias

Após o protocolo de descelularização, os segmentos traqueais ficaram opacos, perolados, mais rígidos ao toque e não friáveis (Figura 18). Não houve diferença macroscópica entre as traqueias descelularizadas após cinco e 10 ciclos.

Figura 18 - Traqueias pré e pós-descelularização **a)** Traqueia pré-tratamento; **b)** Traqueia pós-tratamento.



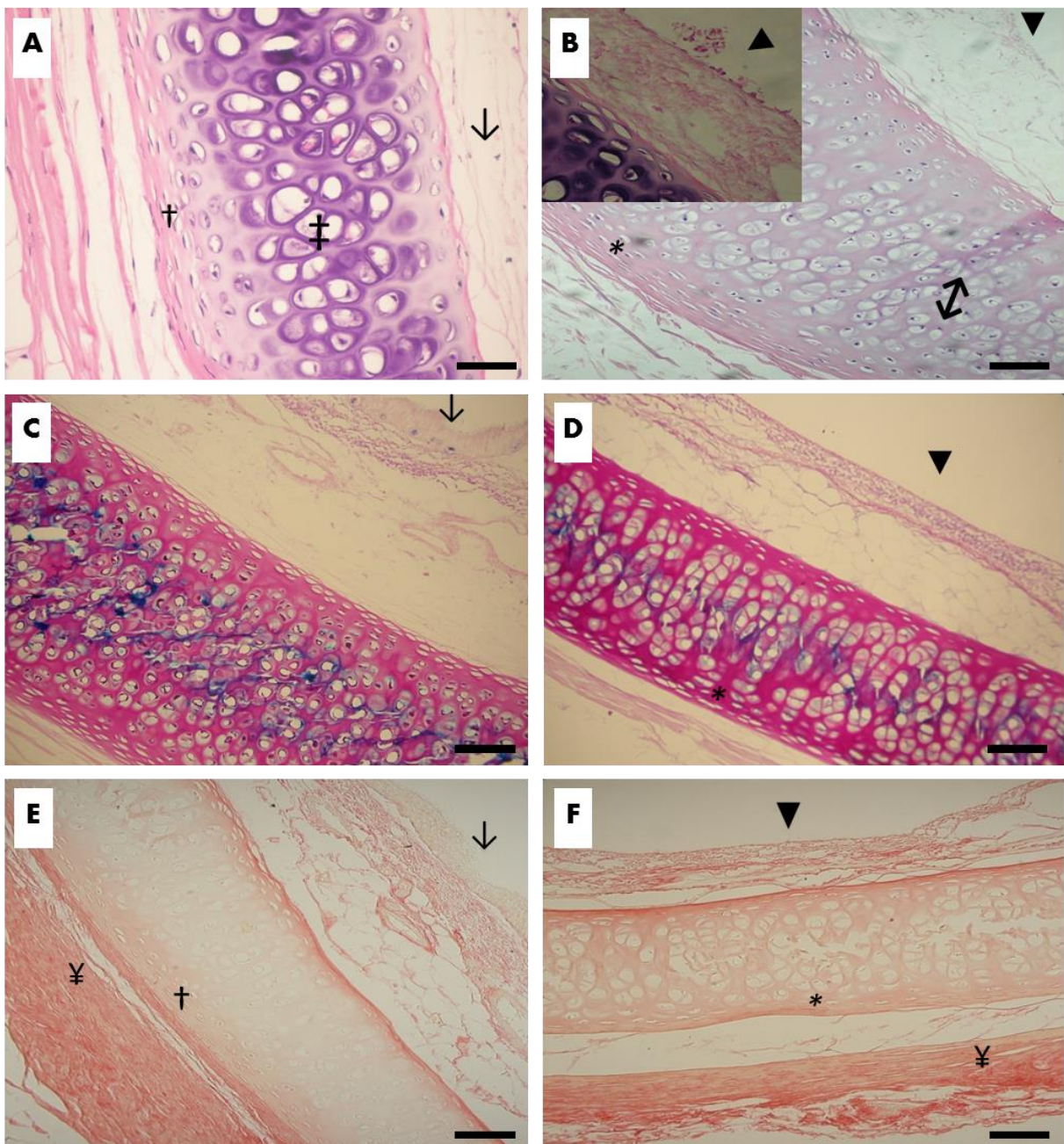
Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 1 cm.

Os protocolos de descelularização com cinco ciclos e 10 ciclos foram analisados histologicamente. Nota-se que o protocolo com cinco ciclos de descelularização remove parcialmente as células epiteliais e os condrócitos (Figura 19B), entretanto, o tratamento com 10 ciclos remove completamente as células do epitélio respiratório pseudoestratificado colunar ciliado, os núcleos presentes no pericôndrio celular e, parcialmente, os condrócitos presentes na cartilagem hialina (Figura 20B).

Com relação à preservação da matriz extracelular, quando comparadas às traqueias nativas – controle (Figuras 19C e 20C), a coloração com *alcian blue* revelou que não houve perda do conteúdo de GAG nas traqueias descelularizadas com cinco e 10 ciclos (Figuras 19D e 20D). Entretanto, a coloração com picrossírius revelou uma diminuição do

conteúdo das fibras de colágeno após o processo de descelularização e essa diminuição ocorreu em maior intensidade após 10 ciclos de descelularização (Figuras 19F e 20F).

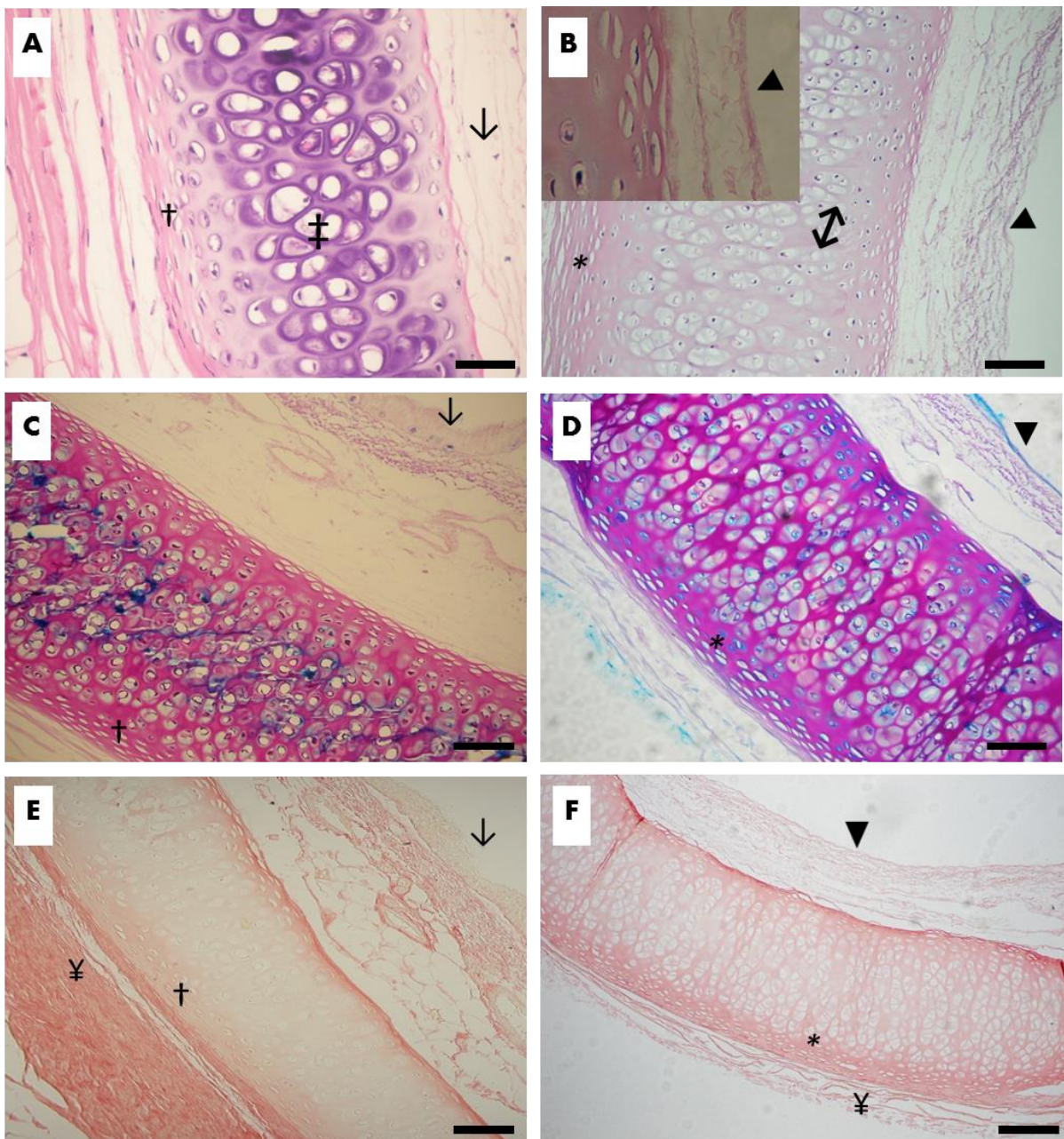
Figura 19 - Histologia das traqueias pré e pós-descelularização com cinco ciclos **a)** Traqueia *in natura* corada com HE; **b)** Traqueia descelularizada com cinco ciclos corada com HE; **c)** Traqueia *in natura* corada com *Alcian blue*; **d)** Traqueia descelularizada com cinco ciclos corada com *Alcian blue*; **e)** Traqueia *in natura* corada com Picosírius; **f)** Traqueia descelularizada com cinco ciclos corada com Picosírius.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 100 μ m. Aspectos morfológicos: (‡) Cartilagem hialina da traqueia *in natura*. Note o aspecto morfológico normal da cartilagem. (†) Cartilagem hialina da traqueia descelularizada com cinco ciclos. Note a presença de núcleos remanescentes na cartilagem devido à matriz extracelular densa. (†) Pericôndrio celular da traqueia *in natura*. Note o aspecto morfológico normal do pericôndrio. (*) Pericôndrio

celular da traqueia descelularizada com cinco ciclos. Note que o protocolo de descelularização remove parcialmente os núcleos presentes nessa área. (↓) Epitélio traqueal pseudoestratificado cilíndrico ciliado da traqueia *in natura*. Note a presença do epitélio íntegro e organizado. (▼) Epitélio traqueal pseudoestratificado cilíndrico ciliado da traqueia descelularizada com cinco ciclos. Note que o protocolo de descelularização remove parcialmente as células presentes nessa área. (¥) Pericôndrio fibroso. Note a presença das fibras de colágeno tipo I densamente organizadas na traqueia *in natura*, porém, na traqueia descelularizada com cinco ciclos de descelularização há uma redução das fibras de colágeno tipo I.

Figura 20 - Histologia das traqueias pré e pós-descelularização com 10 ciclos **a)** Traqueia *in natura* corada com HE; **b)** Traqueia descelularizada com 10 ciclos corada com HE; **c)** Traqueia *in natura* corada com Alcian blue; **d)** Traqueia descelularizada com 10 ciclos corada com Alcian blue; **e)** Traqueia *in natura* corada com Picrosírius; **f)** Traqueia descelularizada com 10 ciclos corada com Picrosírius.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 100 μm . Aspectos morfológicos: (‡) Cartilagem hialina da traqueia *in natura*. Note o aspecto morfológico normal da cartilagem. (†) Cartilagem hialina da traqueia descelularizada

com 10 ciclos. Note a presença de núcleos remanescentes na cartilagem mesmo após 10 ciclos de descelularização devido à matriz extracelular densa. (†) Pericôndrio celular da traqueia *in natura*. Note o aspecto morfológico normal do pericôndrio. (*) Pericôndrio celular da traqueia descelularizada com 10 ciclos. Note que o protocolo de descelularização remove todos os núcleos presentes nessa área. (↓) Epitélio traqueal pseudoestratificado cilíndrico ciliado da traqueia *in natura*. Note a presença do epitélio íntegro e organizado. (▼) Epitélio traqueal pseudoestratificado cilíndrico ciliado da traqueia descelularizada com 10 ciclos. Note que o protocolo de descelularização remove todas as células presentes nessa área. (¥) Pericôndrio fibroso. Note a presença das fibras de colágeno tipo I densamente organizadas na traqueia *in natura*, entretanto, na traqueia descelularizada com 10 ciclos há uma redução intensa das fibras de colágeno tipo I.

4.1.2. Quantificação de DNA das traqueias

Após cinco ciclos de descelularização, houve diminuição de 35% da quantidade de DNA quando comparada à traqueia *in natura* (controle). Após 10 ciclos de descelularização, houve diminuição de 40% da quantidade de DNA quando comparada com a traqueia *in natura* (controle). Esses dados podem ser visualizados na Figura 21 abaixo.

Figura 21 - Análise quantitativa de DNA das traqueias *in natura* e das traqueias após cinco ciclos e 10 ciclos de descelularização

	Controle <i>in natura</i>	Descelularizada 5 ciclos	Descelularizada 10 ciclos
Peso	35,8 mg	35,8 mg	35,8 mg
DNA	258,9 ng/mg	168,0 ng/mg	154,9 ng/mg

Fonte: material elaborado pelo autor.

4.1.3. Avaliação da toxicidade residual das traqueias descelularizadas

O teste foi realizado em triplicata, assim, encontrou-se a média dos resultados.

Após 48 horas, os resultados indicam a preservação da viabilidade celular nas amostras avaliadas, visto a quantidade de marcação com a Anexina-V e Iodeto de Propídeo. A média da viabilidade do controle da reação, ou seja, as CTMs que não ficaram em contato com as traqueias descelularizadas foi 81,35% (Figuras 22 e 23) e a média da viabilidade das CTMs que entraram em contato com as traqueias tratadas com o detergente DS foi 82,28% (Figuras 22 e 23). Também não houve diferença entre as porcentagens de apoptose, necrose e apoptose/necrose das células controle e das células teste (Figuras 22 e 24).

Entretanto, a média da viabilidade das CTMs controle que não ficaram em contato com as traqueias descelularizadas aumentou para 97,94% após 15 dias de cultura (Figuras 22 e 23), enquanto a média das CTMs-teste que mantiveram contato com as traqueias tratadas foi mantida 82,75% (Figuras 22 e 23). Além disso, as porcentagens de apoptose das células testes

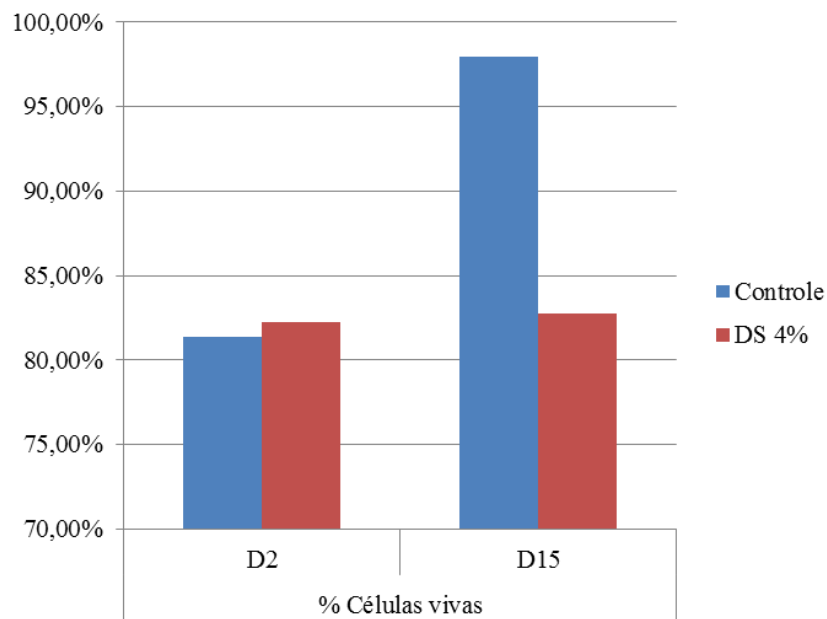
aumentaram quando comparadas às porcentagens do controle da reação após 15 dias de cultura (Figuras 22 e 24).

Figura 22 - Avaliação da toxicidade das traqueias após descelularização com detergente deoxicolato de sódio em diferentes períodos da cultura

Amostra	% Células vivas		% Células em apoptose		% Células em necrose		% Células em apoptose/necrose	
	D2	D15	D2	D15	D2	D15	D2	D15
Controle	81,35%	97,94%	1,79%	1,03%	9,69%	0,06%	7,17%	0,97%
Presença DS 4%	82,28%	82,75%	1,36%	10,16%	10,06%	2,85%	6,30%	4,24%

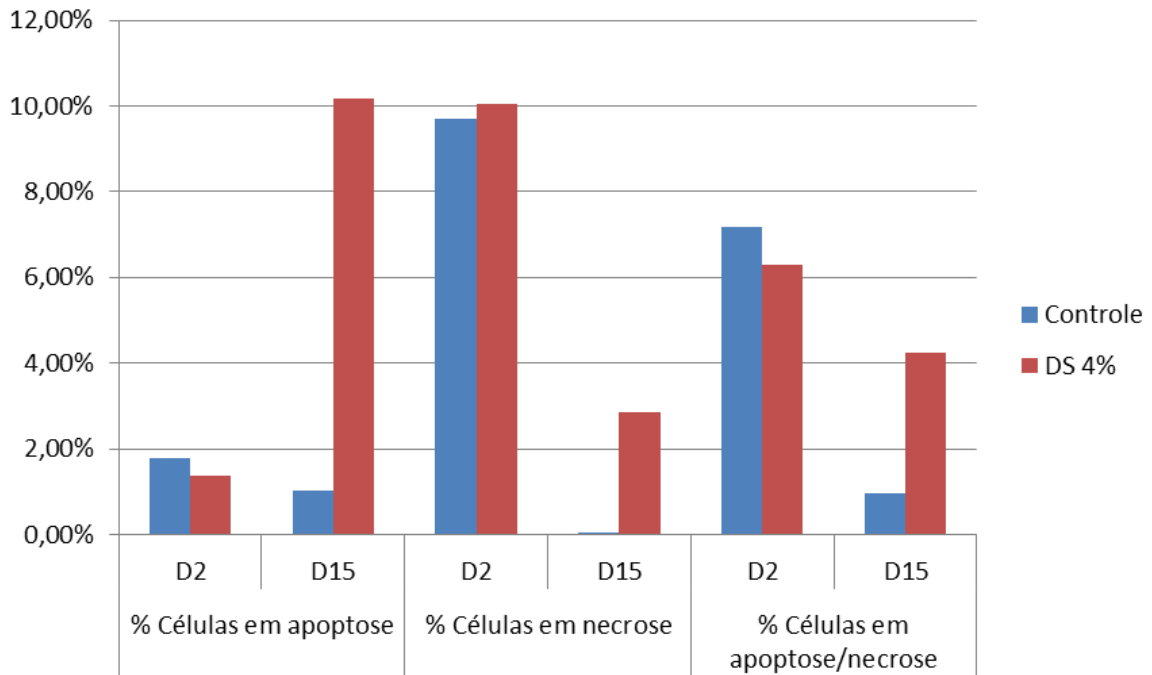
Fonte: arquivo compartilhado.

Figura 23 - Avaliação da viabilidade celular em dois períodos diferentes de cultura



Fonte: arquivo compartilhado.

Figura 24 - Avaliação da apoptose e necrose celular em dois períodos diferentes de cultura



Fonte: arquivo compartilhado.

4.1.4. Ensaios Biomecânicos das traqueias

A média da rigidez das traqueias descellularizadas diminuiu (48,41%) após cinco ciclos de descellularização quando comparada com a média da rigidez das traqueias *in natura*; e diminuiu ainda mais (49,90%) após os 10 ciclos de descellularização (Tabela 1). Entretanto, a média da resistência das traqueias descellularizadas aumentou (46% - cinco ciclos e 55% - 10 ciclos) quando comparada com a média da resistência das traqueias *in natura* (Tabela 1).

Houve diferença significativa quando comparados os valores das traqueias controles com as traqueias descellularizadas com cinco e 10 ciclos como observado na Tabela 1 ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Média e desvio padrão das variáveis do ensaio de tração das traqueias *in natura* e das traqueias descelularizadas com cinco e 10 ciclos

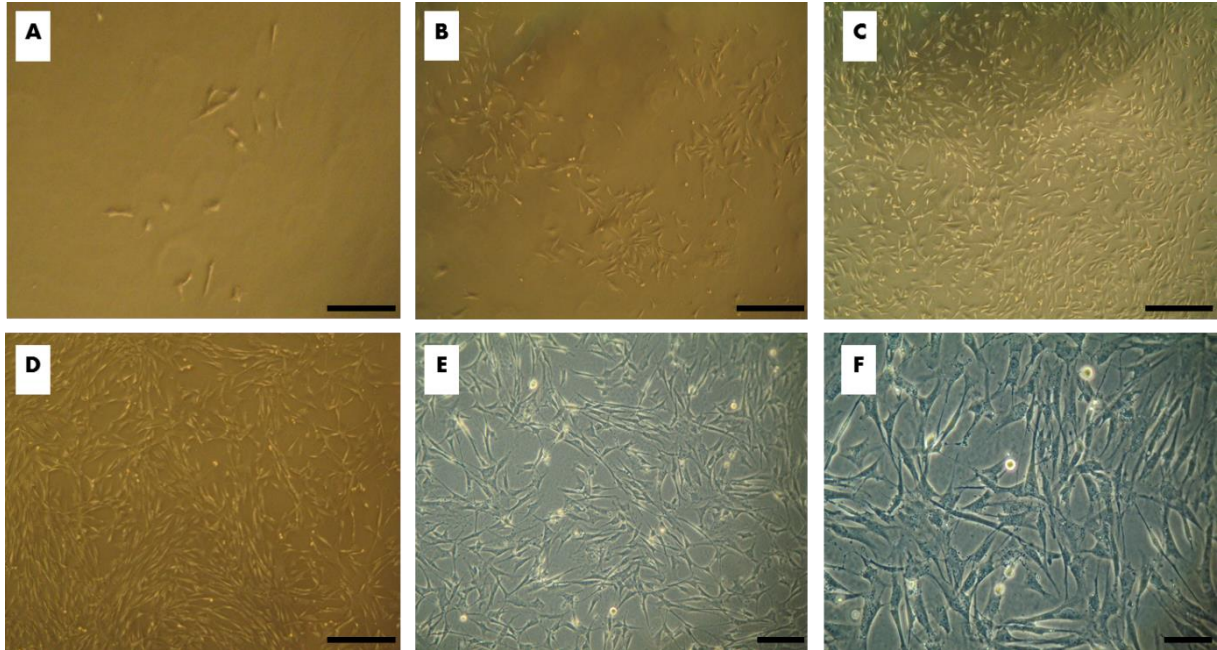
Características	Traquéia <i>in natura</i>	Traquéia descelularizada 5 ciclos	Traquéia descelularizada 10 ciclos	p
Coefficiente de Rigidez (deformabilidade)	2,683 (1,141)	1,384 (0,429)	1,344 (0,501)	p<0,01
Resistência (força tênsil)	9,025 (3,384)	13,235 (3,823)	14,056 (3,996)	p<0,01
Força Máxima (N)	9,025 (3,384)	13,235 (3,823)	14,056 (3,996)	p<0,01
Deformação (mm)	3,555 (0,814)	9,806 (2,176)	10,917 (2,327)	p<0,01

Fonte: arquivo compartilhado. p<0,05 Controle *versus* Tratadas.

4.2. Obtenção das CTMs

Após dois dias de cultura, percebeu-se adesão das células iniciais em baixa densidade (Figura 25A), essas formavam colônias dispersas no frasco de cultura (Figura 25B) e replicavam até que as colônias (*clusters*) se encontrassem, formando confluência de 80% (Figura 25C). Após seis dias de cultura, observa-se as características das CTMs nos diferentes aumentos do microscópio invertido Axiovert 200[®], Zeiss[™] (Figuras 25D, 25E, 25F). Morfologicamente, as células cultivadas *in vitro* mantiveram características de CTMs, isto é, a população celular obtida era heterogênea, mas a maioria dessas células apresentava-se alongada, justaposta e provida de prolongamentos, tipicamente fibroblastóides.^{64,69}

Figura 25 - Evolução da cultura celular das CTMs **a)** Células aderidas no frasco após dois dias de cultura - Aumento de 5X; **b)** Células aderidas formando colônia após cinco dias de cultura - Aumento de 5X; **c)** Células aderidas apresentando confluência de 80% após nove dias de cultura - Aumento de 5X; **d)** Características das células aderidas - Aumento de 5x; **e)** Características das células aderidas - Aumento de 10x; **f)** Características das células aderidas - Aumento de 20x.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 100 μ m.

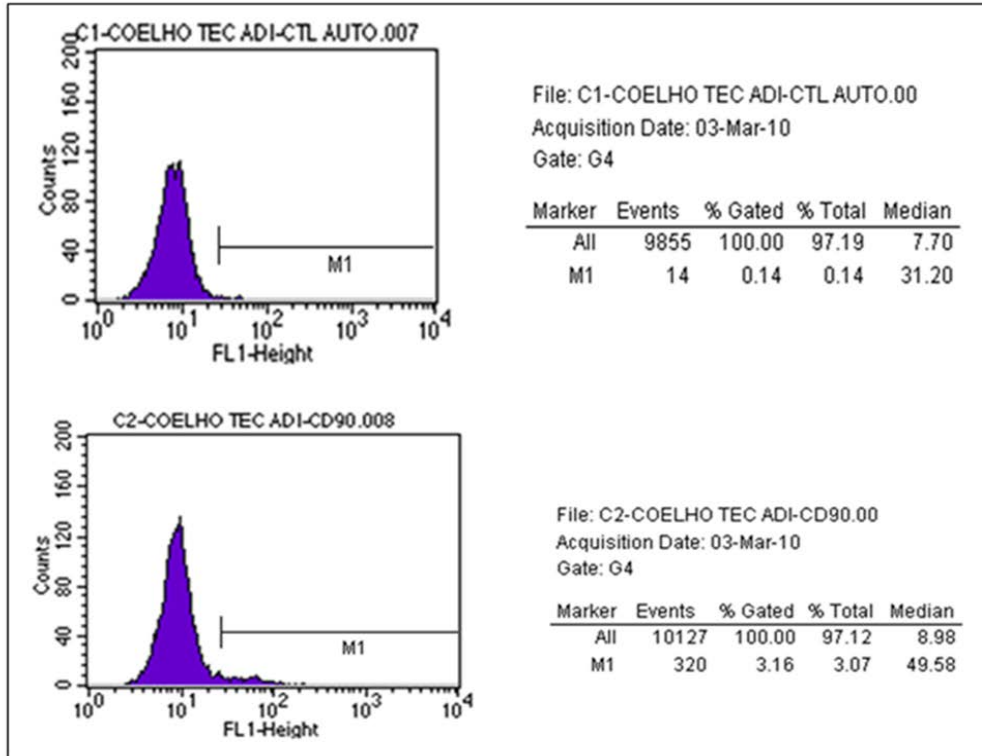
As células mantiveram essas características até a terceira passagem em cultura quando as caracterizações por citometria de fluxo e as diferenciações foram realizadas.

4.2.1. Caracterização das CTMs por citometria de fluxo

Ao comparar os resultados da citometria de fluxo dos dois anticorpos comerciais usados como controles positivos, observam-se resultados bastante diferentes. Ao marcar as CTMs cultivadas com anti-CD90 (*anti-rat*) da Caltag Laboratories[®], o número de eventos analisados pelo citômetro foi 10.127, destes, 3,16% das células expressaram CD90 em sua superfície (dado não publicado referente a um estudo prévio de 2010). Frente ao baixo desempenho desse controle e outras indicações de CTMs, e levando-se em consideração o aspecto da cultura celular, ou seja, capacidade de aderência ao plástico, tempo de confluência, aspecto fibroblastóide, número de passagens em cultura e capacidade de diferenciação, conclui-se que esse marcador *anti-rat* usado no início do estudo não reage com CTM de coelho. Entretanto, ao testar essas mesmas células com o anticorpo anti-CD90 (*anti-rat cross reacting with rabbit*) da Biolegend[®], o resultado foi nitidamente diferente, isto é, de 8.378

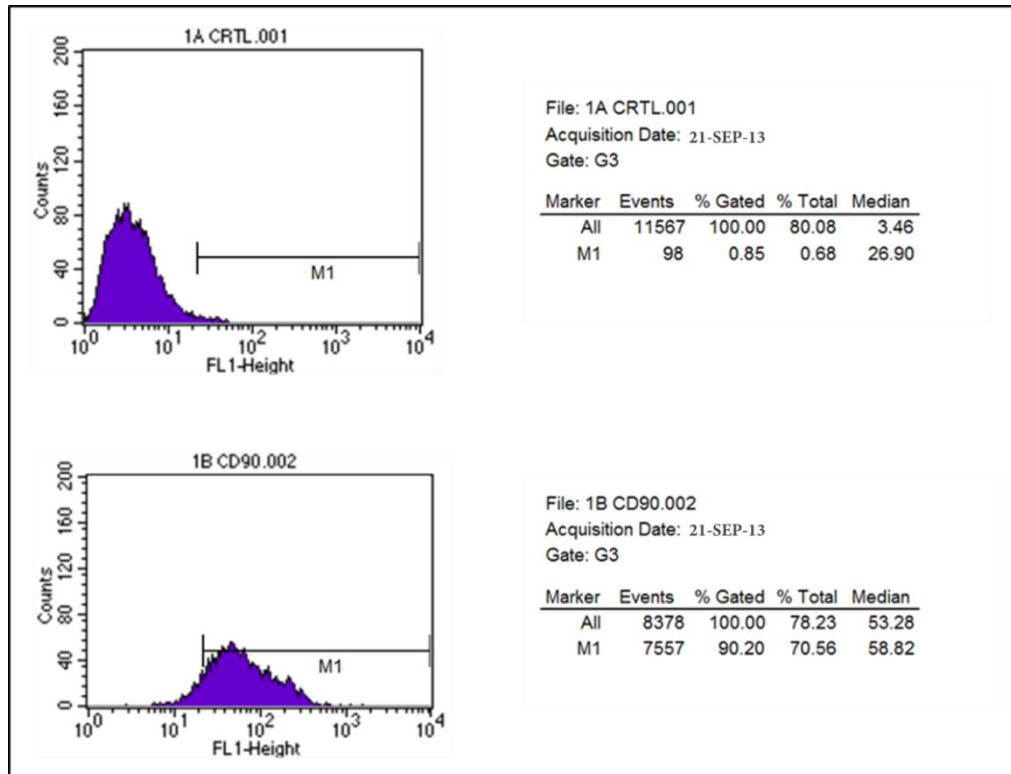
eventos, 90,20% das células foram positivas. Esses resultados podem ser visualizados nos histogramas abaixo (Figuras 26, 27 e 28).

Figura 26 - Resultado da citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti-CD90 (*anti-rat*) da Caltag Laboratories®



Fonte: arquivo compartilhado, 2010.

Figura 27 - Resultado da citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti-CD90 (*anti-rat cross reacting with rabbit*) - Biolegend®



Fonte: arquivo compartilhado.

Esses resultados destacam a importância de se utilizar um controle positivo adequado.

Com relação aos anticorpos monoclonais produzidos *home made*, o anticorpo MSC1-160A69 apresentou maior expressão nas células testadas (39,95%) quando comparado com o MSC1-160A30 (25,09%), demonstrado na Figura 28.

Figura 28 - Caracterização das CTMs por citometria de fluxo

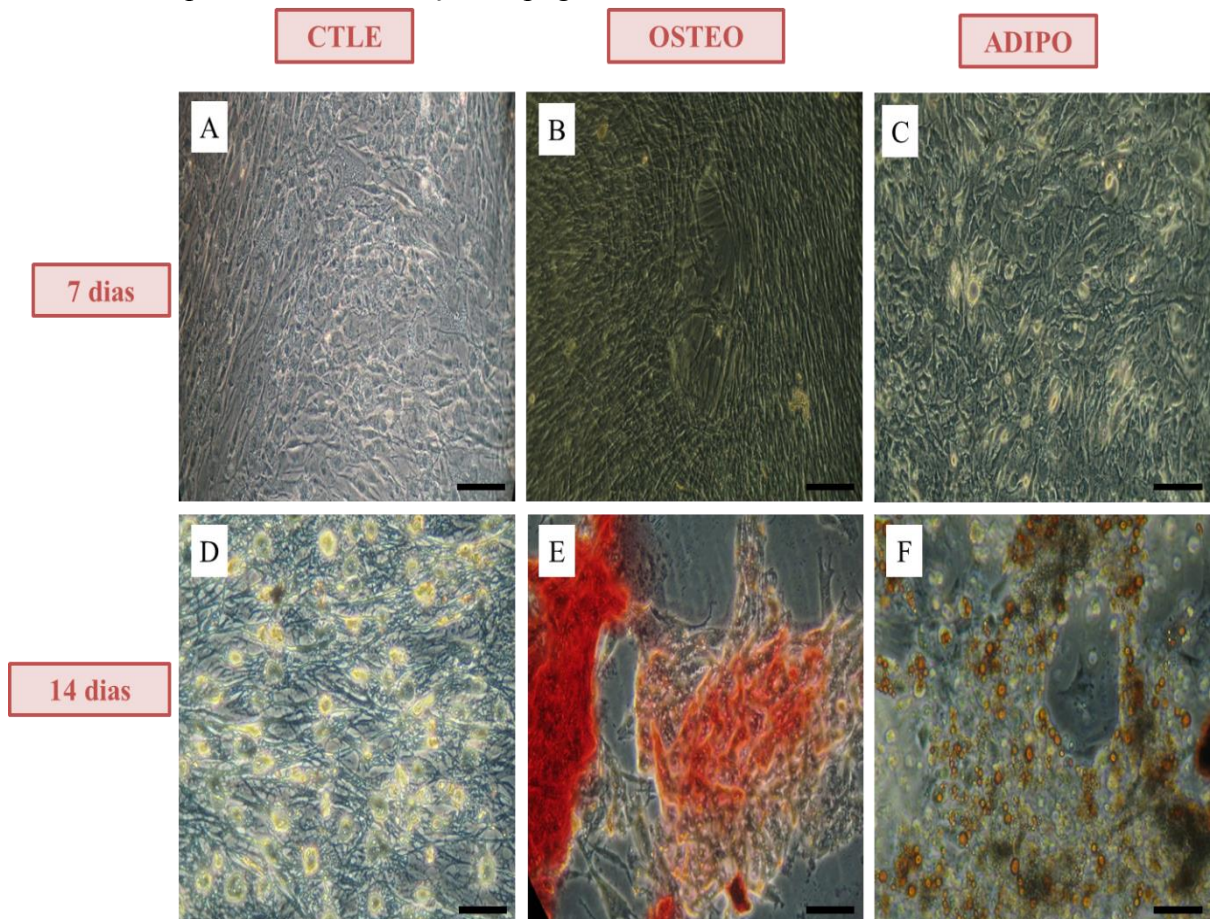
Anticorpo	Nº de eventos analisados	% de +
Controle Negativo	9855	0,14
Controle Positivo (CD90 Caltag Laboratories®)	10127	3,16
Controle Positivo (CD90 Biolegend®)	8378	90,20
AcMm A 30 (<i>in house</i>)	9537	25,09
AcMm A 69 (<i>in house</i>)	8429	39,95

Fonte: arquivo compartilhado.

4.2.2. Caracterização das CTMs por diferenciação: osteogênica, adipogênica e condrogênica

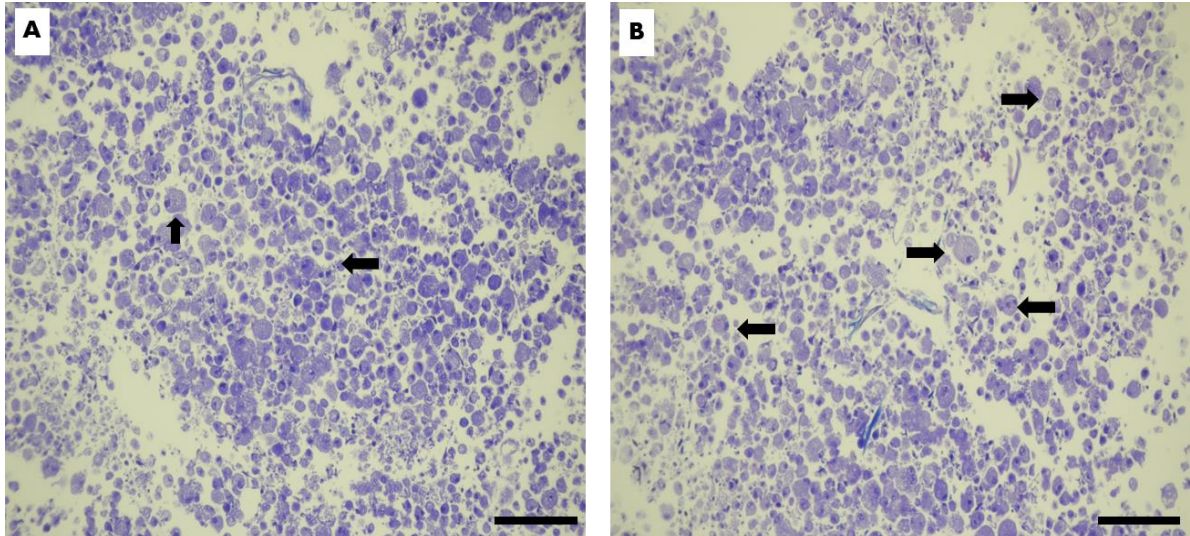
As diferenciações das CTMs foram validadas por meio de colorações específicas (Figuras 29 e 30), sendo que os controles da reação não apresentaram coloração.

Figura 29 - Caracterização das CTMs pelas diferenciações **a)** Controle da reação – CTMs aderidas após sete dias de cultura; **b)** Células cultivadas com o meio indutor osteogênico após sete dias de indução - Note que as células formam agregados; **c)** Células cultivadas com o meio indutor adipogênico após sete dias de indução - Note a presença de vacúolos ricos em lipídeos dentro das células; **d)** Controle da reação – CTMs aderidas após 14 dias de cultura; **e)** Células coradas com *Alizarin red* após 14 dias de indução osteogênica; **f)** Células coradas com *Oil red* após 14 dias de indução adipogênica.



Fonte: arquivo pessoal. Aumento de 10x. Barra de escala = 100 μm .

Figura 30 - Diferenciação condrogênica **a) e b)** *Pellet* celular submetido a 21 dias de cultura com indução condrogênica corado com Azul de toluidina.

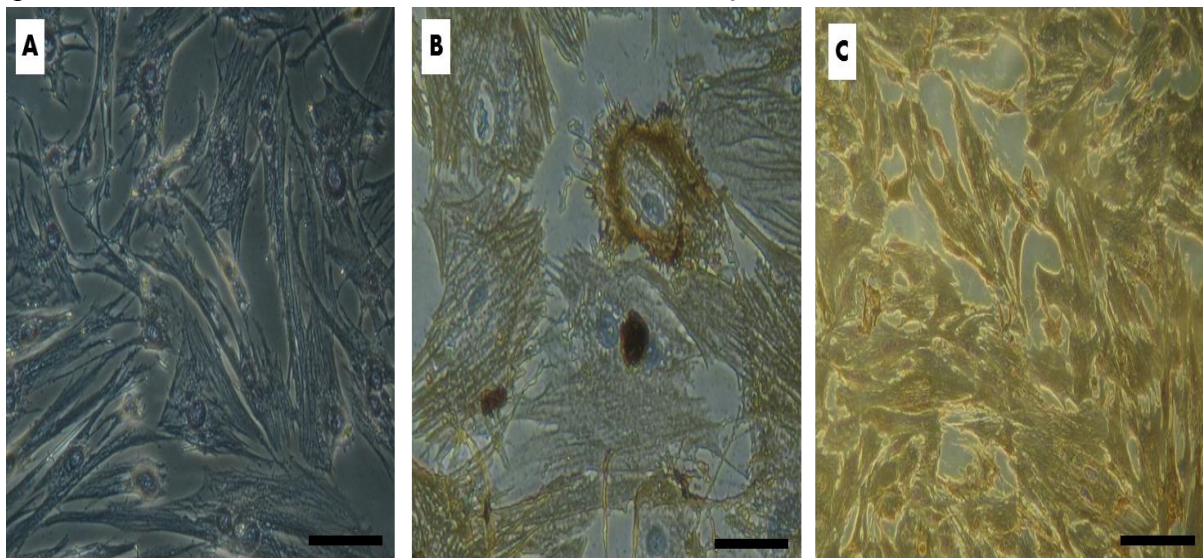


Fonte: arquivo pessoal. Aumento de 20X. Barra de escala = 200 μm . Note a seta indicando as lacunas formadas pelas células.

4.2.3. Diferenciação das CTMs em músculo liso

A diferenciação das CTMs em células de músculo liso foi validada por imunocitoquímica utilizando dois anticorpos diferentes (Figura 31). Os controles da reação não apresentaram marcação.

Figura 31 - Diferenciação em músculo liso **a)** Controle da reação – CTMs aderidas após 21 dias de cultura sem indução; **b)** Células marcadas com o anticorpo *Anti - Human Muscle Actin* – Clone HHF35 após 21 dias de cultura com o meio indutor de diferenciação em músculo liso; **c)** Células marcadas com o anticorpo *Anti - Rabbit Smooth Muscle Actin* – clone 1A4 após 21 dias de cultura com o meio indutor de diferenciação em músculo liso.



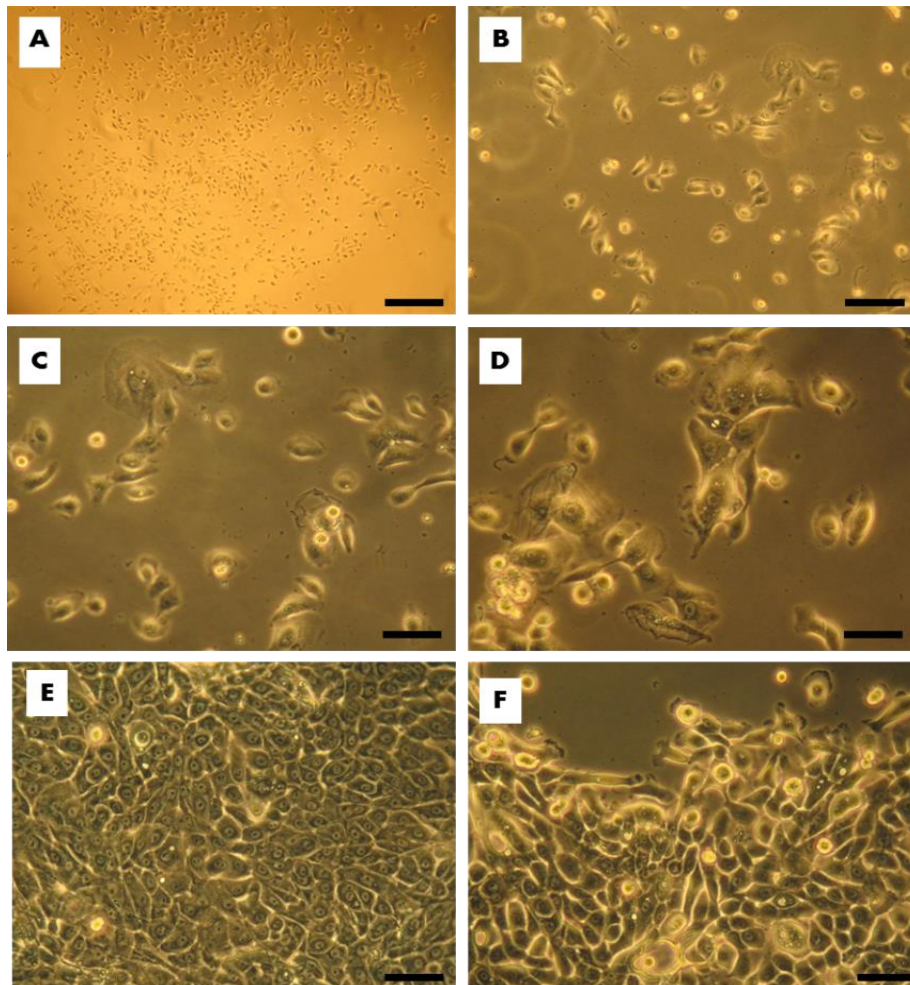
Fonte: arquivo compartilhado. Aumento de 20x. Barra de escala = 100 μm .

4.3. Expansão *ex vivo* das células epiteliais respiratórias

Quanto aos resultados da expansão das CERs, foram testadas duas técnicas diferentes: fragmentos traqueais e raspado traqueal.

Fragmentos traqueais: Após 10 dias de cultura, observaram-se várias células aderidas ao frasco (Figuras 32A e 32B). No aumento de 20X, após 10, 12 e 20 dias de cultura (Figuras 32C, 32D, 32E e 32F), observam-se características de células epiteliais, ou seja, núcleo arredondado, halo perinuclear, citoplasma abundante, coloração mais escurecida na borda das células, cromatina densa, nucléolo evidente e autofluorescência intensa. Além disso, nas Figuras 32E e 32F, observam-se pouca substância extracelular e aderência firme entre as células, formando camadas celulares contínuas, evidência de células epiteliais.⁹

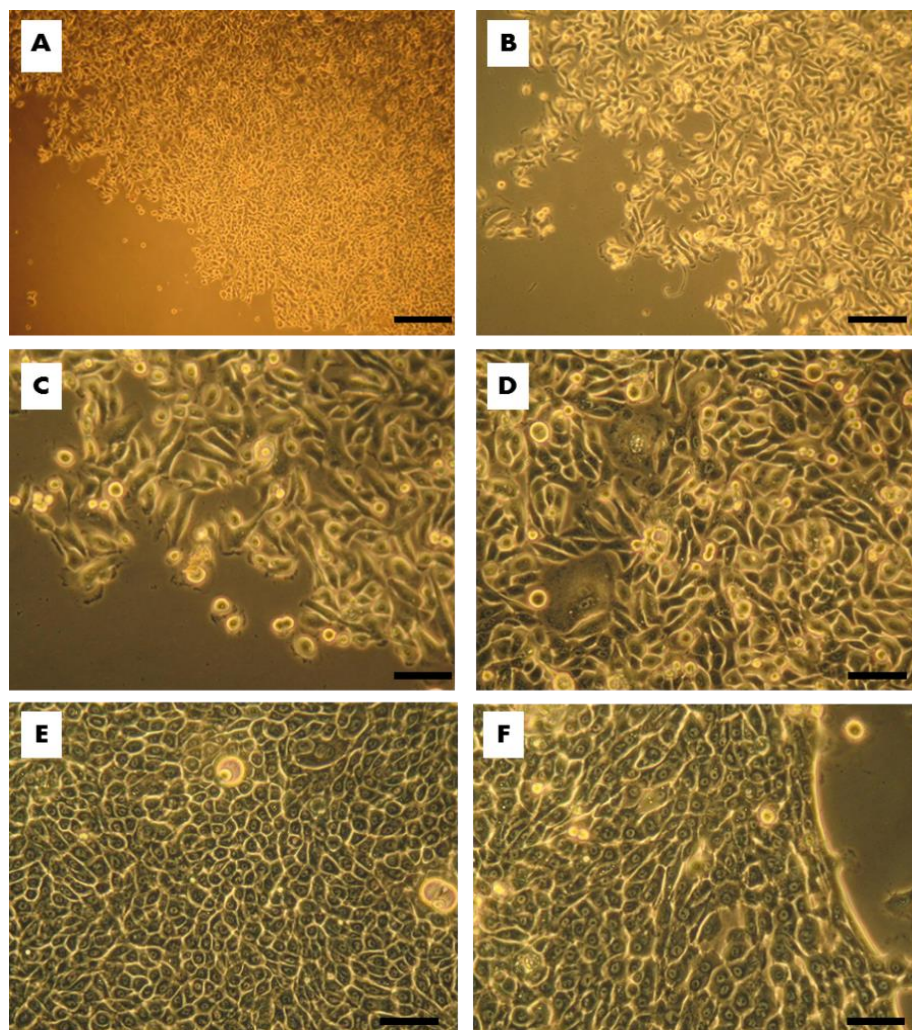
Figura 32 - Cultura de CERs pela técnica de fragmentos traqueais **a)** CERs após 10 dias de cultura - Aumento de 5x; **b)** CERs após 10 dias de cultura - Aumento de 10x; **c)** CERs após 10 dias de cultura - Aumento de 20x; **d)** CERs após 12 dias de cultura - Aumento de 20x; **e)** CERs após 20 dias de cultura - Aumento de 20x; **f)** CERs após 20 dias de cultura - Aumento de 20x.



Fonte: arquivo pessoal, 2010. Barra de escala = 100 μ m.

Raspado traqueal: Após 10 dias de cultura, pode-se observar formação de colônia de epitélio respiratório, nos aumentos de 5X e 10X, Figuras 33A e 33B, respectivamente. No aumento de 20X, após 12 e 20 dias de cultura (Figuras 33C, 33D, 33E e 33F), verificam-se características de células epiteliais já descritas acima.

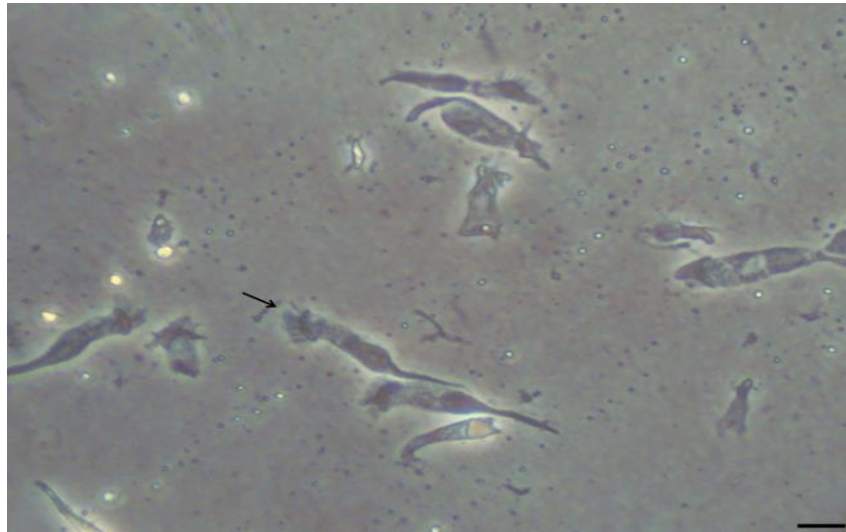
Figura 33 - Cultura de CERs pela técnica de raspados traqueais **a)** CERs após 10 dias de cultura - Aumento de 5x; **b)** CERs após 10 dias de cultura - Aumento de 10x; **c)** CERs após 12 dias de cultura - Aumento de 20x; **d)** CERs após 12 dias de cultura - Aumento de 20x; **e)** CERs após 20 dias de cultura - Aumento de 20x; **f)** CERs após 20 dias de cultura - Aumento de 20x.



Fonte: arquivo pessoal, 2010. Barra de escala = 100 μ m.

Após 30 dias de cultura, observou-se a presença das células epiteliais ciliadas (Figura 34).

Figura 34 - Cultura de CERs com visualização das células epiteliais ciliadas

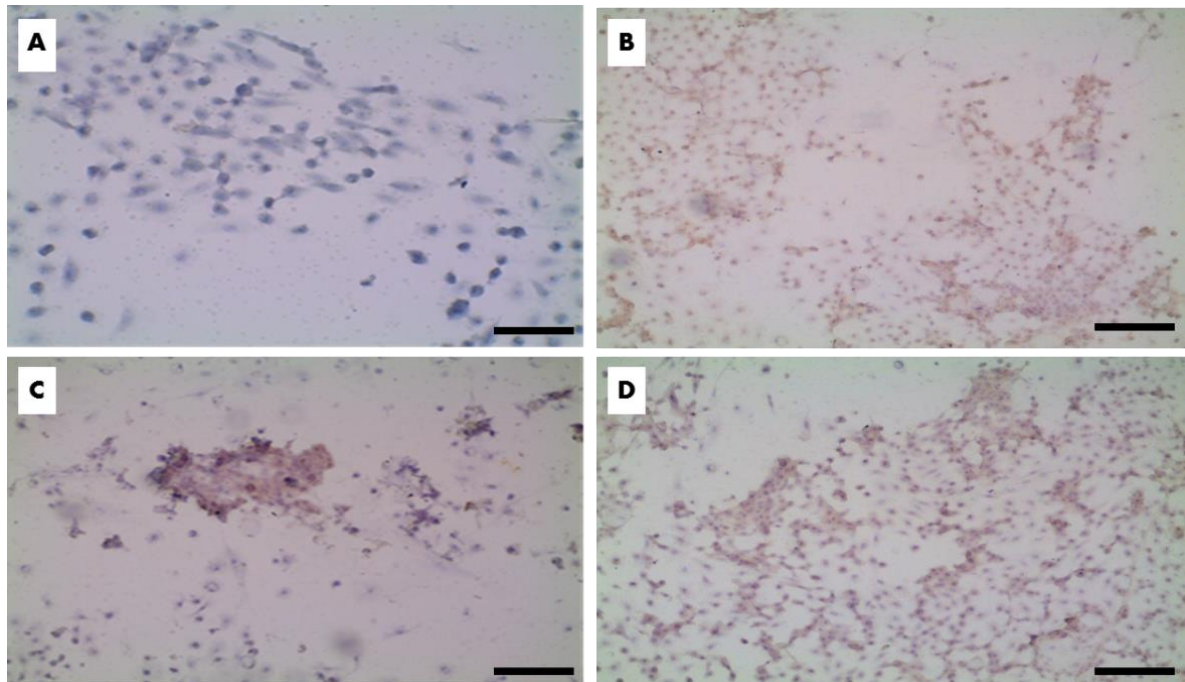


Fonte: arquivo pessoal, 2010. Aumento de 20x. Barra de escala = 50 μ m.

4.3.1. Caracterização das CERs por imunocitoquímica

Nas fotos seguintes pode-se observar as lâminas das CERs marcadas com o anticorpo mouse anti-*human* beta-catenina (DakoCytomation), confirmando o fenótipo de epitélio respiratório. O anticorpo utilizado possui especificidade para células epiteliais humanas, entretanto, as CERs coletadas das traqueias dos coelhos também foram marcadas (Figuras 35B, 35C e 35D).

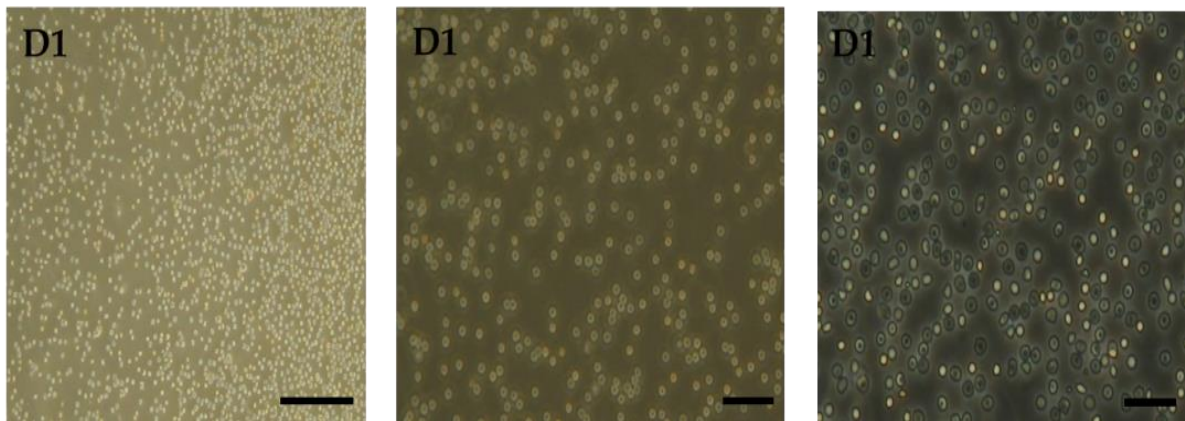
Figura 35 - Caracterização das CERs por imunocitoquímica **a)** Lâmina controle – negativa; **b)** Lâmina positiva; **c)** Cluster positivo; **d)** Lâmina positiva.



Fonte: arquivo compartilhado, 2010. Aumento de 10x. Barra de escala = 100 μ m.

Esses resultados das culturas das CERs demonstrados acima são referentes a um estudo prévio de 2010 (dados não publicados). Contudo, não foi possível a reprodução dessas culturas em todos os animais do presente estudo devido às contaminações constantes e de difícil controle. As fotos abaixo são das culturas posteriores, nas quais não houve visualização de células epiteliais, apenas a presença de contaminação (Figura 36). Sendo assim, na etapa seguinte, as traqueias foram rescelularizadas somente em suas superfícies externas com as CTMs e as células de músculo liso, como será descrito no item seguinte – *Montagem das neotraqueias*.

Figura 36 - Contaminação nas culturas de CERs em diferentes aumentos: 5x, 10x e 20x respectivamente

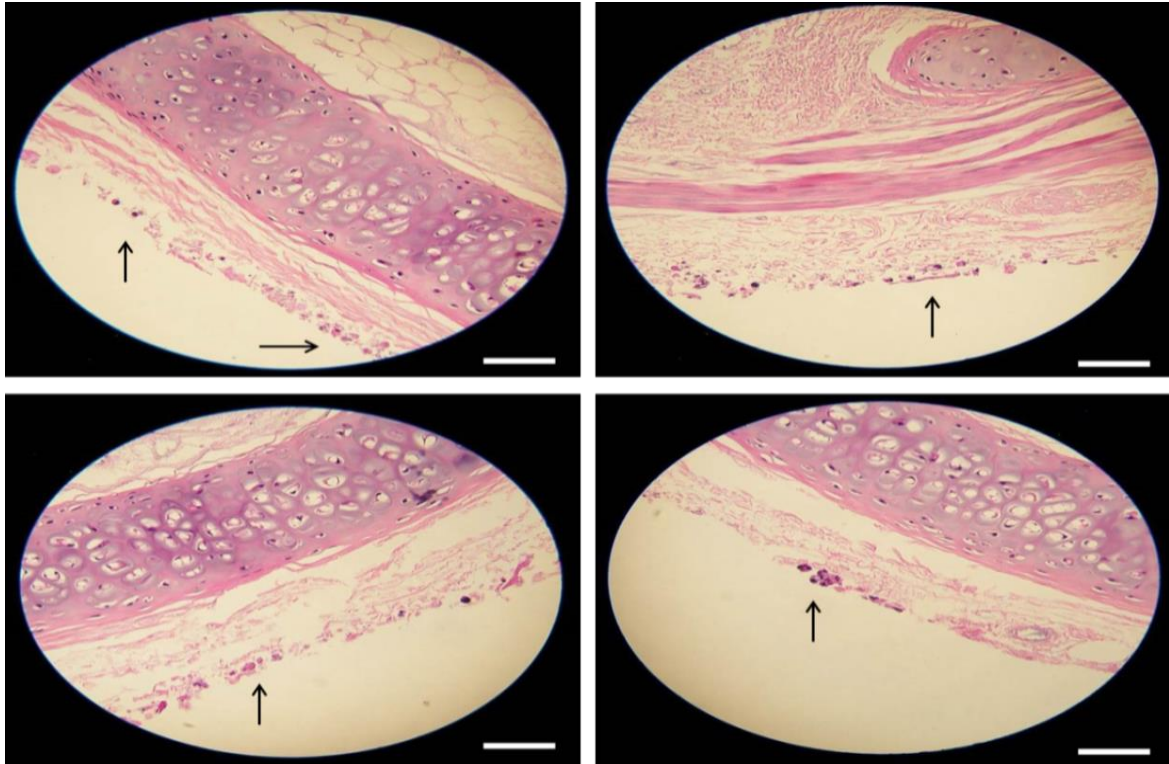


Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 100 μ m.

4.4. Montagem das neotraqueias

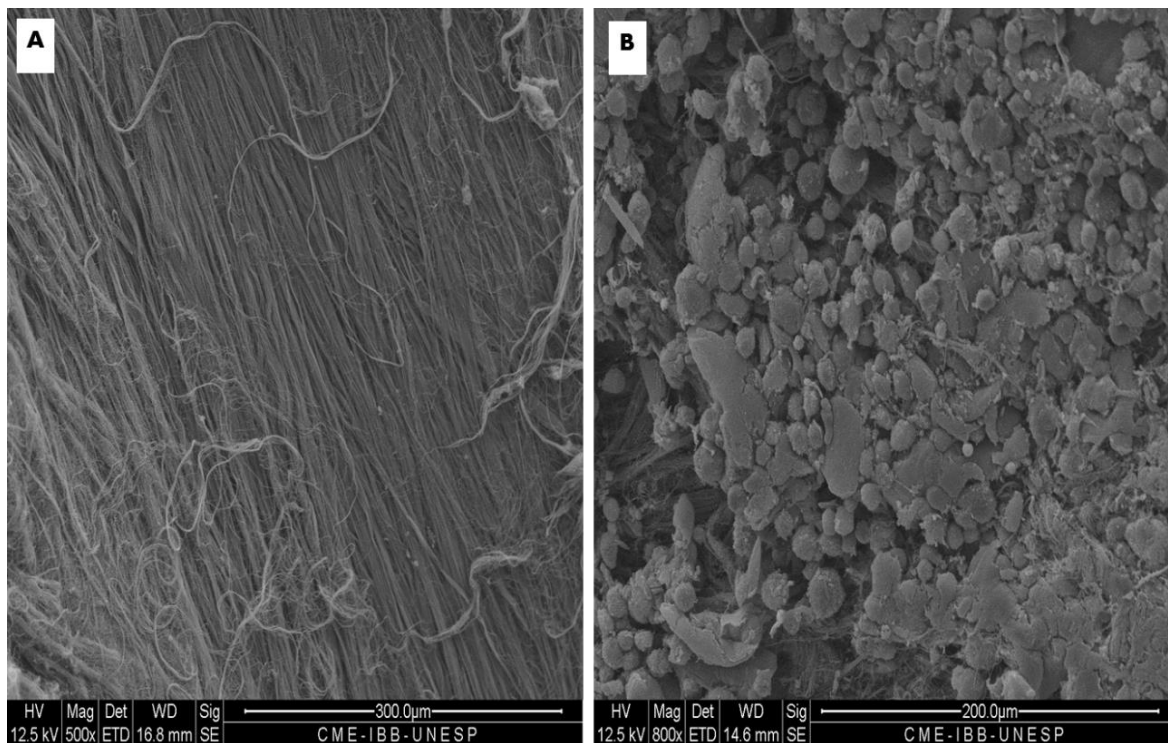
Foi possível realizar a observação das células aderidas às traqueias previamente descelularizadas, tanto pela coloração com HE (Figura 37), como pela MEV (Figura 38) e, finalmente, pela microscopia de fluorescência (Figura 39), porém, nesse último experimento, visualizou-se uma quantidade menor de células. Isso já era esperado uma vez que a quantidade de células (1×10^6) marcadas com o *Qtracker* aplicadas sobre a traqueia que foi analisada por fluorescência foi menor do que a quantidade de células (7×10^6) aplicadas nas traqueias analisadas por histologia e por MEV.

Figura 37 - Presença das células aderidas (setas) às traqueias previamente descelularizadas coradas com HE



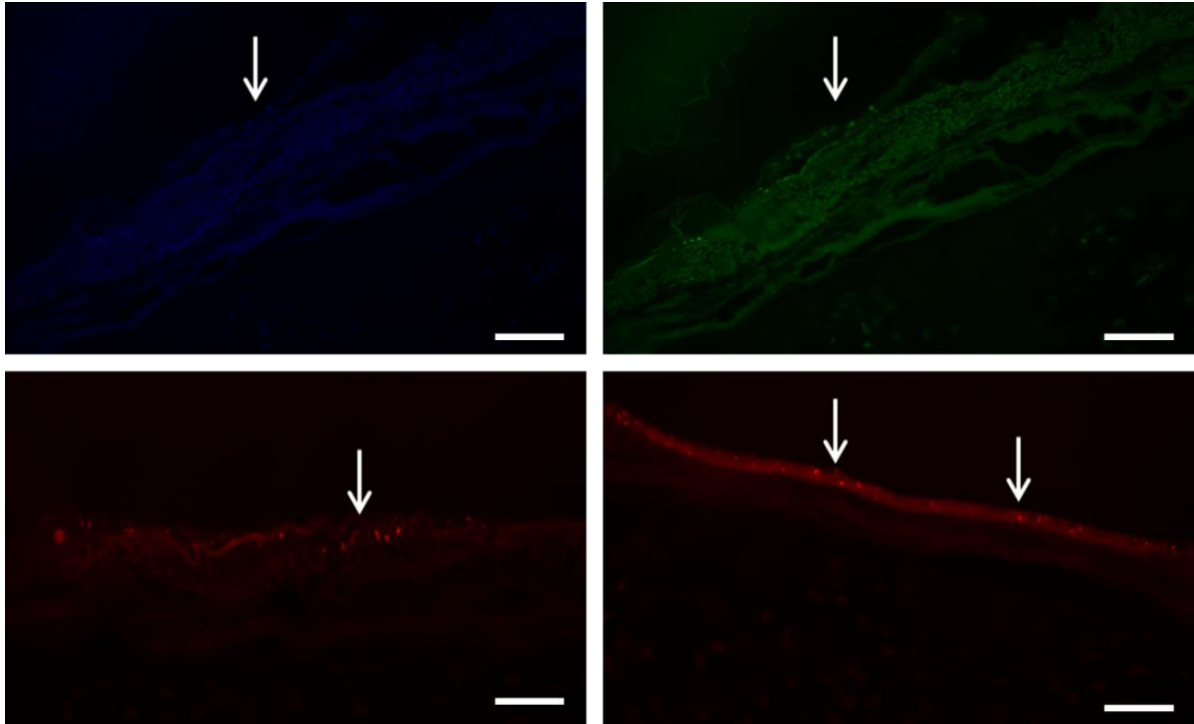
Fonte: arquivo pessoal. Aumento de 20x. Barra de escala = 100 μ m.

Figura 38 - Validação da rescelularização pela Microscopia Eletrônica de Varredura **a)** Controle – Traqueia descelularizada; **b)** Presença das células aderidas às traqueias previamente descelularizadas.



Fonte: arquivo compartilhado. Aumento de 100x.

Figura 39 - Presença das células aderidas (setas) às traqueias previamente descelularizadas visualizadas pela microscopia de fluorescência



Fonte: Arquivo compartilhado. Aumento de 100x. Barra de escala = 100 μ m.

4.5. Transplantes

Primeira etapa:

Os dados dos animais desta etapa estão descritos na Figura 40, abaixo:

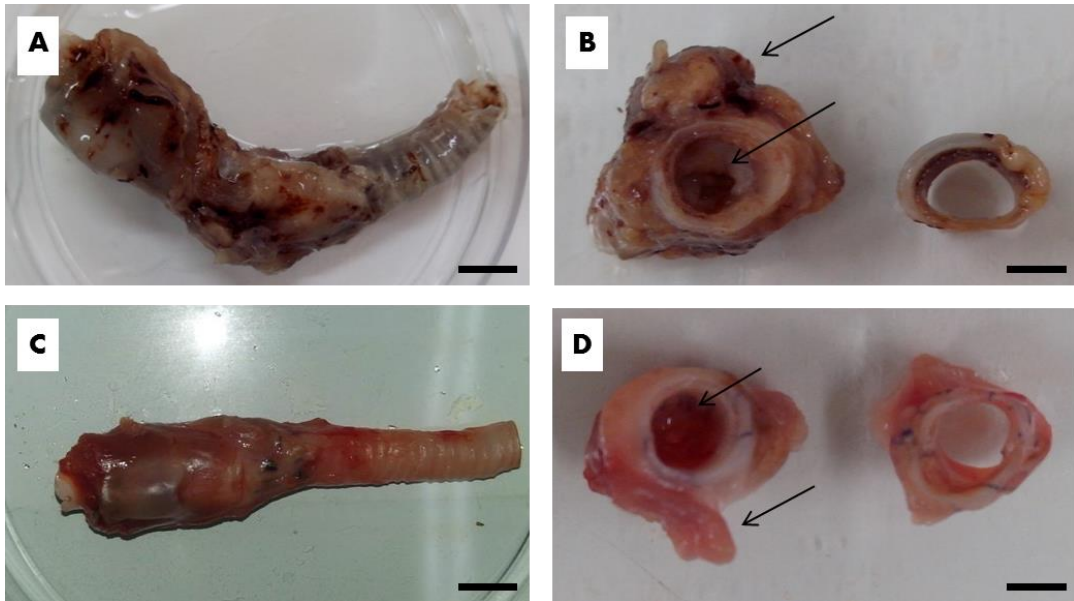
Figura 40 - Dados pós-transplante dos animais da primeira etapa

Grupo	Peso (pré)	Peso (pós)	Infecção	Dificuldade respiratória	Presença de rolha	Tempo após o transplante
I - Sham (n=4)	3,6 Kg	4,0 Kg	NÃO	NÃO	NÃO	90 dias
II - Descelularizada (n=4)	3,5 Kg	3,4 Kg	1 animal	SIM	SIM	10 - 12 dias
III- Rescelularizada (n=4)	3,7 Kg	3,5 Kg	NÃO	SIM	SIM	10 - 12 dias

Fonte: material elaborado pelo autor.

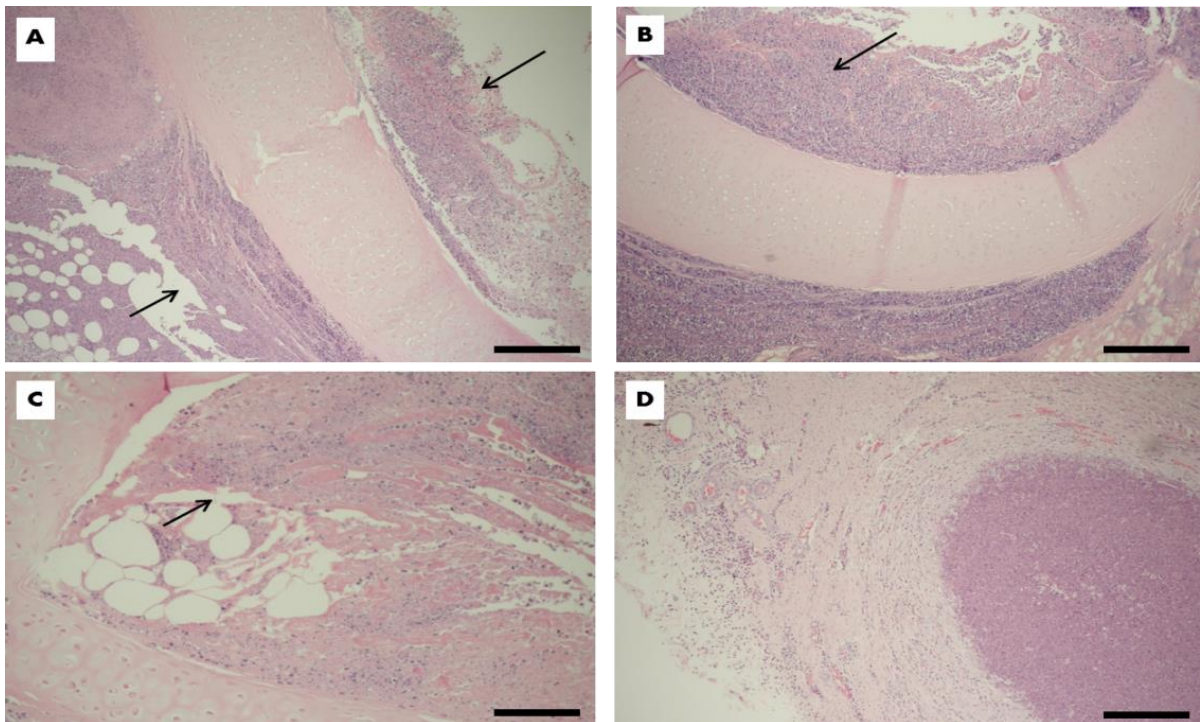
Todos os animais dos grupos II e III, traqueias descelularizadas (n = 4) e traqueias rescelularizadas (n = 4), respectivamente, vieram a óbito entre o 10º e 12º dia após os transplantes apresentando dificuldade respiratória grave devido à obstrução traqueal (Figuras 41 e 42).

Figura 41 - Análise macroscópica das traqueias da primeira etapa após 10 ± 2 dias do transplante a) e b) Grupo II – traqueia descelularizada; c) e d) Grupo III – traqueia rescelularizada.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 1 cm. Nas fotos B e D, note a presença de tecido obstruindo a luz traqueal ao lado de uma traqueia controle. Há também tecido envolvendo o local do enxerto externamente. Na foto D, a presença do tecido envolvendo o local do enxerto externamente ocorre de forma menos intensa.

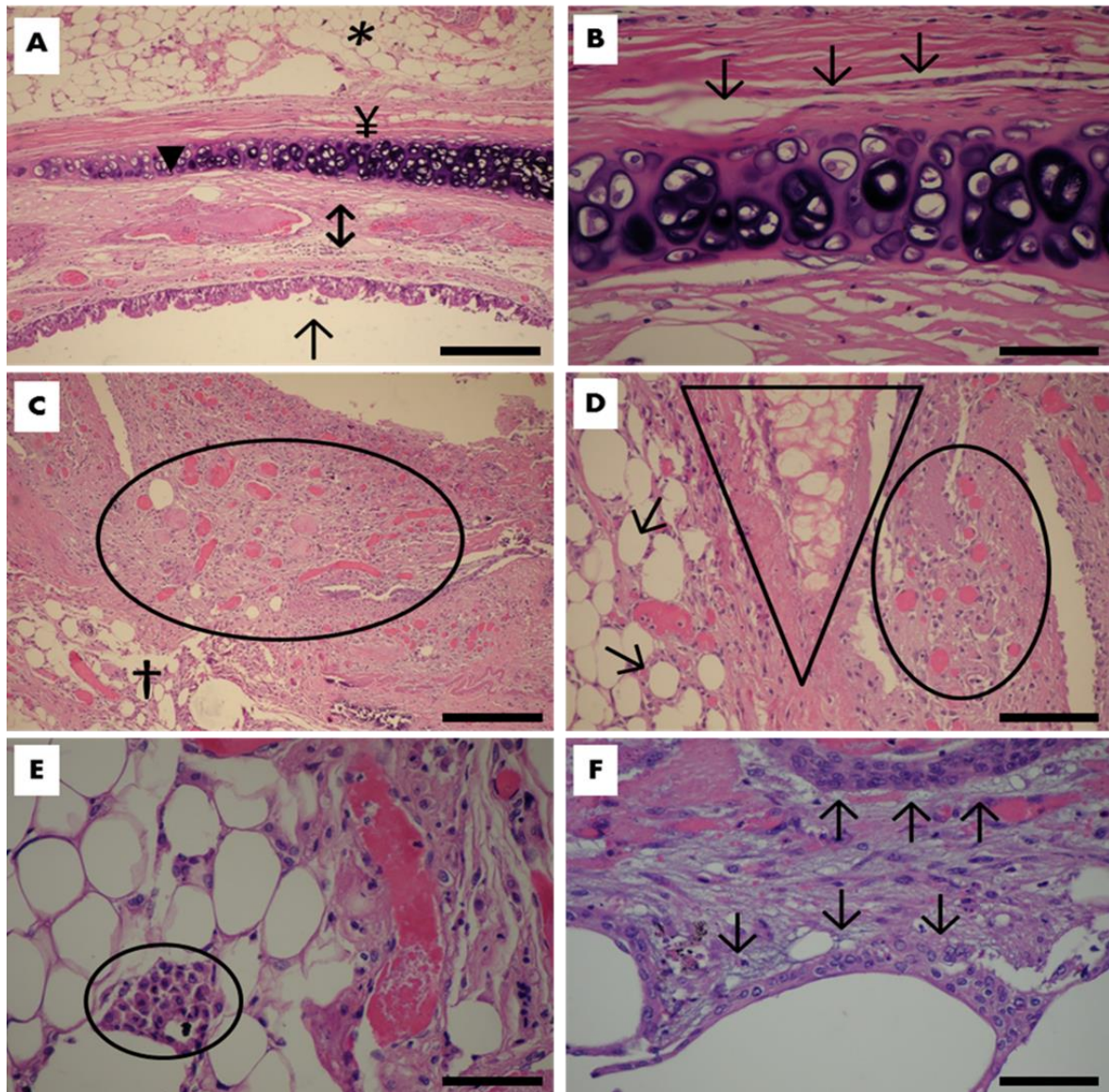
Figura 42 - Análise histológica das traqueias da primeira etapa após 10 ± 2 dias do transplante a) e b) Grupo II – traqueia descelularizada; c) e d) Grupo III – traqueia rescelularizada.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 100 μm . Nas fotos A e B, note a presença de tecido obstruindo a luz traqueal. Há também tecido envolvendo o local do enxerto externamente. Nas fotos C e D note a presença de tecido obstruindo a luz traqueal.

Além disso, observou-se que, a despeito da descclularização, detectou-se reação inflamatória nos segmentos descclularizados e transplantados, bem como em órgãos-alvo à distância, como fígado e pulmão. Tais achados são sugestivos de DECH, possivelmente decorrente de presença de células do doador ainda presentes e viáveis no enxerto traqueal após os cinco ciclos de descclularização. A biópsia traqueal revelou granulação, presença de um intenso infiltrado linfocítico (Figuras 43 e 44) e formação de um tecido denso e fibroso na luz traqueal. Além disso, um dos animais do grupo II apresentou infecção.

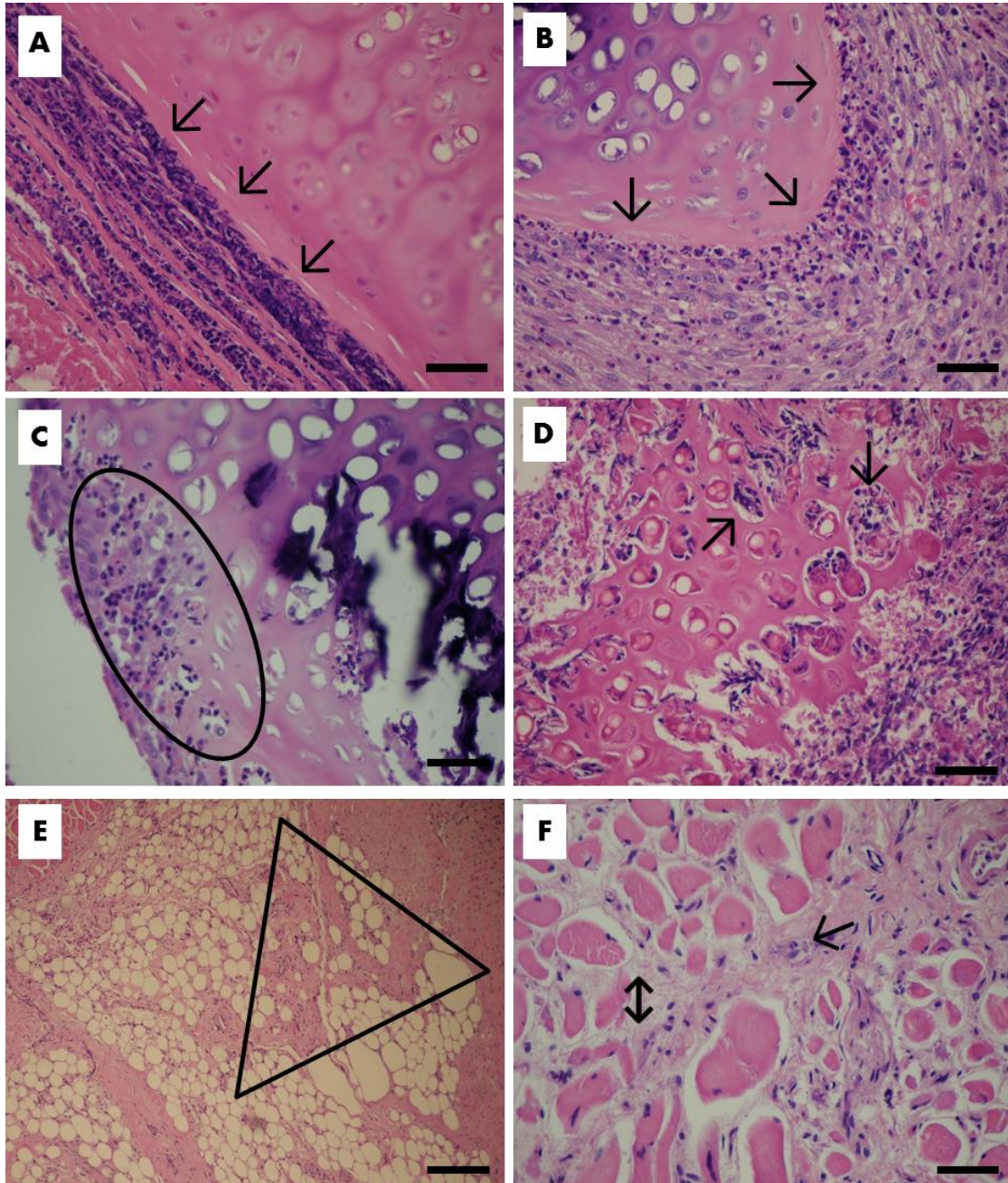
Figura 43 - Histologia das traqueias da primeira etapa após 10 ± 2 dias do transplante **a)** Área traqueal normal – aumento de 10x; **b)** Área traqueal normal – aumento de 40x; **c)** Área do Enxerto – aumento de 10x; **d)** Área do Enxerto – aumento de 20x; **e)** Área do Enxerto – aumento de 40x; **f)** Área do Enxerto – aumento de 40x.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = $100\mu\text{m}$. Na foto A, há o aspecto histológico habitual da traqueia de coelho. Note o epitélio pseudoestratificado colunar ciliado com células caliciformes (↓). Abaixo desse, observa-

se a lâmina própria com tecido conjuntivo permeado de matriz extracelular, vasos sanguíneos e linfáticos (↓). A cartilagem se apresenta hipercorada devido à deposição de fibras proteicas, substância intercelular e condrina (▼). Adjacente à cartilagem, nota-se tecido conjuntivo denso, laminado, sem infiltração inflamatória (¥) contígua com o tecido adiposo, organizado e de aspecto habitual (*). Na foto B, visão detalhada da cartilagem com o pericôndrio (↓). Observe o tecido denso, laminado, hipocelular, hipovascularizado adjacente ao tecido cartilaginoso. Na foto C, há exulceração da mucosa traqueal com formação de tecido de granulação (neovascularização e tecido conjuntivo novo – círculo preto). Note o remodelamento do tecido adiposo periférico caracterizado por distorção das estruturas adiposas e espessamento septal (†). Na foto D, há necrose tecidual de tecido cartilaginoso (triângulo preto) circundado por tecido de granulação secundário (círculo preto) e remodelamento da matriz da camada adiposa (↓). Na foto E, há paniculite da camada adiposa da traqueia adjacente e lesão tecidual exulcerativa. Note o acúmulo de um infiltrado linfoplasmocitário ativo (círculo preto). Na foto F, há metaplasia escamosa reacional a agressão crônica (↓). Note o tecido conjuntivo neoformado abaixo do epitélio metaplásico formando feixes mixóides orientados de fibroblastos reativos (miofibroblastos).

Figura 44 - Histologia das traqueias da primeira etapa após 10±2 dias do transplante **a)** Área do Enxerto – aumento de 20x; **b)** Área do Enxerto – aumento de 40x; **c)** Área do Enxerto – aumento de 40x; **d)** Área do Enxerto – aumento de 40x; **e)** Área do Enxerto – aumento de 10x; **f)** Área do Enxerto – aumento de 40x.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 100µm. Na foto A, há intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário Peri traqueal (↓). Note que a estrutura cartilaginosa está preservada. Na foto B, há agressão linfoplasmocitária pericartilaginosa em detalhe. Note os linfócitos em maior intensidade ao entrar em contato com a cartilagem (↓). Note na foto C processo inflamatório linfoplasmocitário infiltrando a complexa estrutura canicular do tecido cartilaginoso traqueal (círculo preto). Na foto D, há intensa agressão linfocitária dos condrócitos (↓) com necrose celular e destruição da matriz cartilaginosa. Na foto E, há remodelamento da matriz extracelular do tecido adiposo ao redor da traqueia. Note a deposição de matriz nos septos interlobulares adiposos (triângulo preto). Na foto F, há extensão do remodelamento a camada muscular. Note a “infiltração” de matriz extracelular entre os feixes musculares (↓), além das fibras musculares (↑).

Segunda etapa:

Os dados dos animais pertencentes à segunda etapa estão descritos na Figura 45 abaixo.

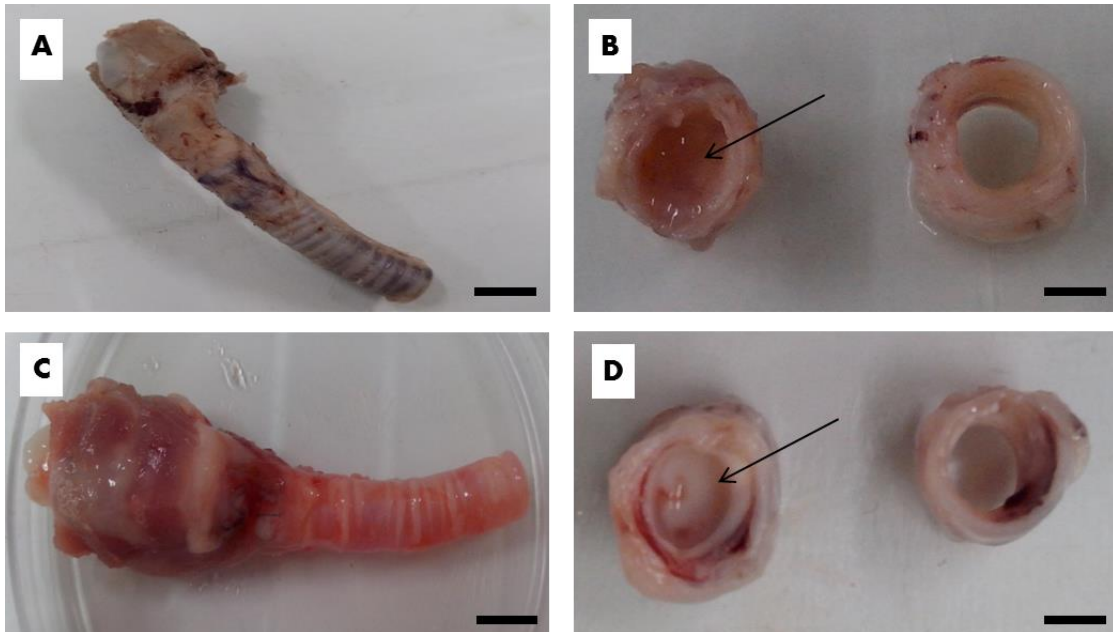
Figura 45 - Dados dos animais pós-transplante da segunda etapa

Grupo	Peso (pré)	Peso (pós)	Infecção	Dificuldade respiratória	Presença de rolha	Tempo após o transplante
IV - Sham (n=4)	3,6 Kg	4,0 Kg	NÃO	NÃO	NÃO	90 dias
V - Descelularizada (n=10)	3,4 Kg	3,2 Kg	NÃO	8 animais	8 animais	42 - 90 dias
VI - Rescelularizada (n=10)	3,5 Kg	3,2 Kg	NÃO	SIM	SIM	40 - 42 dias

Fonte: material elaborado pelo autor.

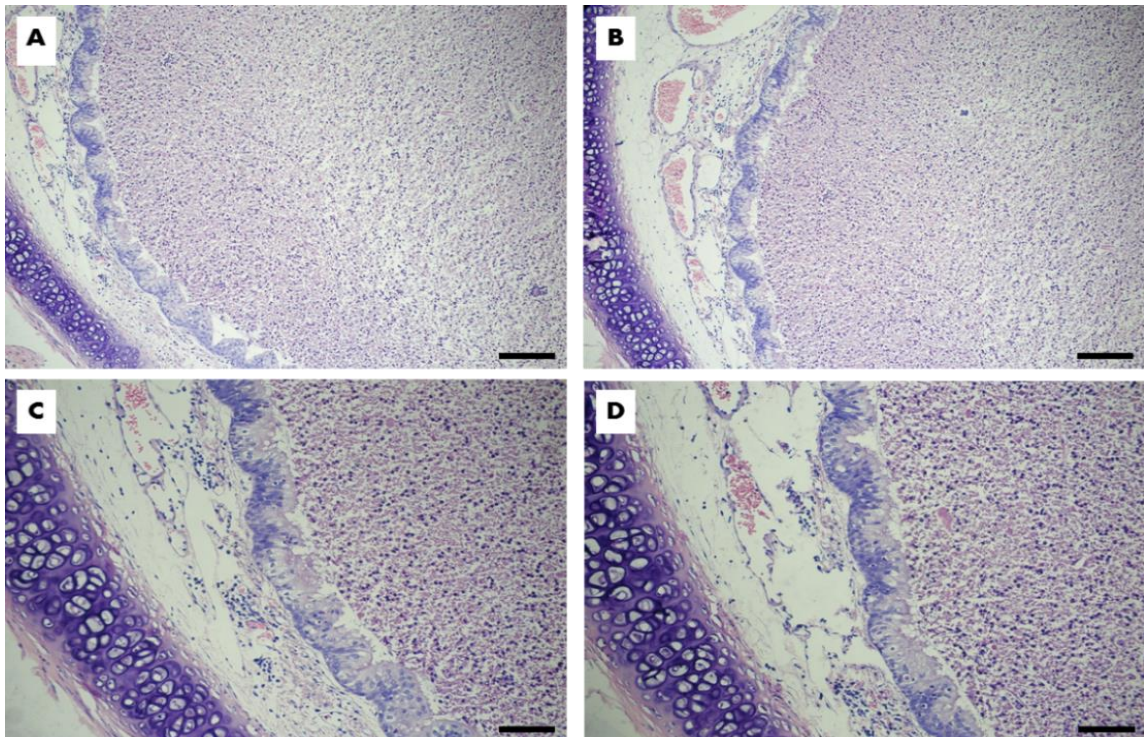
Dois animais do grupo V, traqueias descelularizadas (n = 10), sobreviveram após 90 dias sem apresentar dificuldade respiratória e obstrução da via aérea. Os demais animais desse grupo vieram a óbito após 46 ± 4 dias apresentando dificuldade respiratória devido à presença de rolha obstruindo a luz traqueal (Figuras 46 e 47), entretanto, esses animais não apresentaram sinais específicos de rejeição local ou sistêmica nos órgãos analisados. Todos os animais do grupo VI, traqueias rescelularizadas (n = 10), vieram a óbito após 40 ± 2 dias dos transplantes apresentando dificuldade respiratória grave devido à obstrução traqueal por muco (Figuras 46 e 47), entretanto, esses animais não apresentaram sinais específicos de rejeição local ou sistêmica nos órgãos analisados.

Figura 46 - Análise macroscópica das traqueias da segunda etapa após 46 ± 4 dias do transplante **a) e b)** Grupo V – traqueia descellularizada; **c) e d)** Grupo VI – traqueia rescelularizada.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 1 cm. Nas fotos B e D, note a presença de muco obstruindo a luz traqueal ao lado de uma traqueia controle.

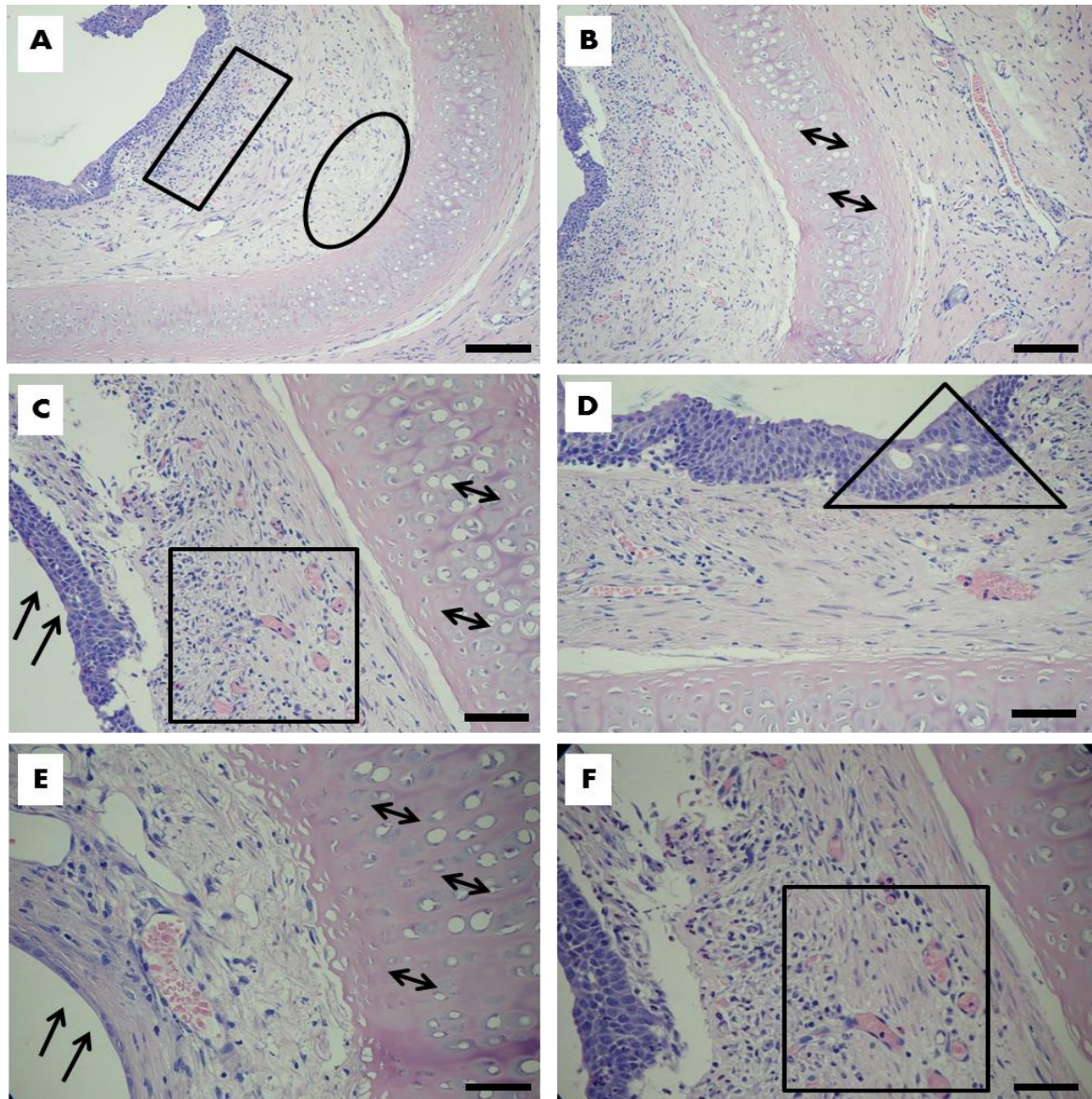
Figura 47 - Análise histológica das traqueias da segunda etapa após 46 ± 4 dias do transplante **a) e c)** Grupo V – traqueia descellularizada - Aumento de 5x e 10x; **b) e d)** Grupo VI – traqueia rescelularizada - Aumento de 5x e 10x.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 100 μ m. Nas fotos A, B, C e D note a presença de tecido obstruindo a luz traqueal.

A ausência de rejeição local pode ser confirmada pela ausência de infiltrado inflamatório invadindo a cartilagem (Figuras 48B, 48C e 48E).

Figura 48 - Histologia das traqueias da segunda etapa após 46 ± 4 dias do transplante **a)** Área do Enxerto – aumento de 5x; **b)** Área do Enxerto – aumento de 5x; **c)** Área do Enxerto – aumento de 10x; **d)** Área do Enxerto – aumento de 10x; **e)** Área do Enxerto – aumento de 20x; **f)** Área do Enxerto – aumento de 20x.



Fonte: arquivo pessoal. Barra de escala = 100 μ m. Na foto A, note o processo de reação que parte da cartilagem e se estende até o epitélio, que está hiperplásico. Esse processo reativo se apresenta de forma fibrótica próximo à cartilagem (círculo preto) e de forma inflamatória próximo ao epitélio (retângulo preto). Note que a estrutura cartilaginosa está preservada. Na foto B, note que não há infiltrado linfocitário na cartilagem (\downarrow). Na foto C, note o epitélio anormal apresentando processo de Paraceratose e Hiperplasia; a última camada é composta por células achatadas que estão cobertas com queratina (\downarrow). Nessa foto também é possível observar Tecido de Granulação com fibroblastos, linfócitos e novos vasos (quadrado preto). Note que não há infiltrado linfocitário na cartilagem (\downarrow). Na foto D, note a presença de células calciformes (triângulo preto). Na foto E, note a camada basal do epitélio aumentada (\downarrow). Note que não há infiltrado linfocitário na cartilagem (\downarrow). Na foto F, note Tecido de Granulação com fibroblastos, linfócitos e novos vasos (quadrado preto).

5. Discussão

Os protocolos de descelularização com cinco e 10 ciclos foram analisados histologicamente. Nota-se que apenas o tratamento com 10 ciclos remove completamente as células do epitélio respiratório pseudoestratificado colunar ciliado, contudo, em ambos os tratamentos há vários núcleos remanescentes na região da cartilagem hialina devido à matriz extracelular densa. Esse resultado corrobora com a literatura que descreve que a cartilagem traqueal é formada por uma matriz extracelular densa responsável pela força mecânica do órgão, o que dificulta o processo de descelularização desse material.^{6,11,15,24,29,51,55,71,83} Entretanto, a presença dos condrócitos remanescentes pode ser tolerada durante o remodelamento da matriz e substituição dessas células pelas células do receptor do transplante.⁵¹ Essa tolerância ocorre pois os antígenos MHC-I e MHC-II estão presentes nas células epiteliais e nas glândulas subepiteliais e não na cartilagem da traqueia, o que diminui as chances de rejeição pelo receptor,^{23,51,66,83} no caso da repetição dos 10 ciclos do protocolo de descelularização proposto.

Um processo de descelularização deve remover adequadamente o material potencialmente imunogênico, porém, deve preservar importantes componentes da matriz extracelular que serão essenciais na etapa posterior de rescelularização desse arcabouço promovendo adesão celular, migração e vascularização tais como, colágeno, fibronectina e laminina.^{5,6,28,51-57} A retenção das moléculas da matriz extracelular responsáveis pela força mecânica do tecido, como colágeno e GAGs, também é necessária para garantir a funcionalidade da traqueia.⁵¹ A cartilagem hialina da traqueia tem um importante papel estrutural nos anéis traqueais que devem manter a via aérea aberta mesmo na presença das pressões intratorácicas criadas durante a respiração.⁵¹ Essa propriedade estrutural é resultado do acoplamento entre a alta pressão osmótica das proteoglicanas ricas em GAG com a força tênsil promovida pelas fibrilas de colágeno.⁵¹

Com relação à preservação da matriz extracelular, as traqueias descelularizadas neste estudo não demonstraram perda do conteúdo de GAG, entretanto, a coloração com picrossírius revelou uma diminuição do conteúdo das fibras de colágeno após o processo de descelularização e essa diminuição ocorreu em maior intensidade após 10 ciclos de descelularização. Zang e colaboradores (2012) utilizaram método de descelularização detergente-enzimático^{11,15,28,33} e notaram uma redução significativa do conteúdo glicosaminoglicano na cartilagem traqueal e diminuição do conteúdo de colágeno após processo de descelularização.²⁸ Esse último dado corrobora com o que foi descrito no presente trabalho, principalmente após 10 ciclos de tratamento.

O detergente Deoxicolato de Sódio é um detergente iônico que age de forma menos agressiva na estrutura da matriz extracelular, porém, o fato de utilizá-lo repetidamente (vários ciclos) pode afetar drasticamente as propriedades do tecido.⁵³ Todavia, Haag e colaboradores (2012)⁵³ demonstraram que nove ciclos não afetam as propriedades estruturais e mecânicas das traqueias de ratos descclularizadas com este detergente; entretanto, o protocolo de descclularização utilizado no presente trabalho com o detergente DS demonstra a perda de colágeno, principalmente após 10 ciclos de descclularização.

A presença de DNA nos arcabouços descclularizados era esperada, pois as análises histológicas demonstraram presença de células epiteliais e condrócitos remanescentes após cinco ciclos e presença de condrócitos após 10 ciclos de descclularização. Muitos arcabouços disponíveis comercialmente apresentam DNA remanescente após descclularização.³¹ Entretanto, a quantidade de DNA encontrada após cinco (168,0 ng/mg) e 10 (154,9 ng/mg) ciclos de descclularização no presente estudo foi superior ao critério aceitável (< 50 ng/mg) para análise de um processo de descclularização eficaz.³² Berg e colaboradores (2014) demonstraram que após 17 ciclos de descclularização utilizando o processo detergente-enzimático descrito na literatura,¹¹ ainda há presença de condrócitos remanescentes, mas a análise quantitativa do DNA demonstrou um resultado inferior ao critério aceitável (34 ng/mg) comparado com a traqueia *in natura* (305 ng/mg).³²

Com relação à toxicidade das traqueias descclularizadas, após 48 horas, os resultados indicam a preservação da viabilidade celular nas amostras avaliadas. Desse modo, pode-se inferir que o contato das CTMs com as traqueias descclularizadas não induziu à necrose ou apoptose celular, pelo contrário, ainda houve uma maior viabilidade das células que mantiveram contato com a traqueia descclularizada quando comparado às células controle. Zang e colaboradores (2012) analisaram a toxicidade desse detergente após 48 horas e encontraram resultado parecido.²⁸ Esse resultado pode ser explicado devido à presença dos fatores de crescimento e do colágeno que não foram destruídos durante a descclularização. Entretanto, as porcentagens de apoptose das células testes (CTMs que mantiveram contato com as traqueias descclularizadas com o detergente) aumentaram após 15 dias de cultura. Esse resultado demonstra que o detergente deoxicolato de sódio residual presente nas traqueias previamente descclularizadas apresenta toxicidade após contato prolongado com as CTMs, porém, dificilmente essa toxicidade poderá afetar a rescclularização *in vivo*, pois a porcentagem de viabilidade celular ainda é superior. Faz-se necessária a realização de novos testes aumentando os ciclos de lavagem dessas traqueias após a descclularização a fim de se eliminar o detergente.

O Ensaio de Tração demonstrou que a média da rigidez das traqueias descelularizadas diminuiu (48,41%) após cinco ciclos de descelularização quando comparada com a média da rigidez das traqueias *in natura*; e diminuiu ainda mais (49,90%) após os 10 ciclos de descelularização. O protocolo de descelularização detergente-enzimático descrito na literatura¹¹ reduz a rigidez em 26%.⁵¹ Entretanto, a média da resistência das traqueias descelularizadas aumentou (46% - cinco ciclos e 55% - 10 ciclos) quando comparada com a média da resistência das traqueias *in natura*. Esse último resultado não é observado no protocolo de descelularização detergente-enzimático¹¹ que provoca perda de 24% da força tênsil das traqueias após a descelularização.⁵¹ Alterações na quantidade dos constituintes da matriz extracelular podem afetar as propriedades funcionais particularmente no nível biomecânico. As estenoses traqueais são geralmente correlacionadas com a perda significativa das proteoglicanas ricas em GAG e colágeno tipo I.⁵¹ A falha biomecânica pode potencialmente levar ao colapso traqueal *in vivo* sob a pressão negativa do ar durante a respiração.⁵¹ A análise histológica do presente estudo demonstrou perda do colágeno após os tratamentos de descelularização, entretanto, o Ensaio de Tração não demonstrou perda da força tênsil.

Foram realizadas expansão e caracterização das CTMs e posterior diferenciação em condrócitos e células de músculo liso. Não foi possível a reprodução do cultivo das células epiteliais respiratórias devido às contaminações constantes e de difícil controle. Há que se ressaltar que o sistema respiratório é aberto ao meio ambiente, fica sempre em contato com o meio externo e sujeito a contaminantes.³⁰ Sendo assim, a rescelularização dos arcabouços foi realizada somente com aplicação de condrócitos, células musculares lisas e CTMs na face externa das traqueias descelularizadas, partindo do princípio do que é descrito na literatura (a re-epitelização pode ocorrer através da migração dos tecidos adjacentes do hospedeiro).¹

A biópsia traqueal dos animais da primeira etapa revelou granulação, presença de um intenso infiltrado linfocítico e formação de um tecido denso e fibroso na luz traqueal. Além disso, um dos animais do grupo II apresentou infecção. Alguns animais referentes ao experimento de Kim (2013) apresentaram dados similares ao do presente estudo.²³ Esse autor acredita que a infiltração linfocítica é a principal causa da produção do tecido fibrótico que causa a obstrução da luz traqueal.

Batioglu-Karaaltin e colaboradores (2014) utilizaram método de descelularização detergente-enzimático modificado e os transplantes foram realizados em seis animais dos quais três receberam traqueias descelularizadas apenas e os outros três receberam traqueias descelularizadas e rescelularizadas com CTMs dos animais receptores.⁹¹ Os animais do

primeiro grupo morreram após 17 dias devido a infecções e obstruções da via aérea com dificuldades respiratórias devido à estenose luminal.⁹¹ A análise histológica desses animais demonstrou ausência de epitélio, danos vasculares, trombose, necrose e inflamação com infiltrado polimorfonuclear (linfócitos, leucócitos, granulócitos e monócitos).⁹¹ Esses resultados corroboram com os resultados do presente estudo. Entretanto, os animais do segundo grupo que receberam as traqueias rescelularizadas com CTMs sobreviveram após 30, 60 e 90 dias.⁹¹ Os autores acreditam que a maior vantagem dos animais desse segundo grupo foi a epitelização da luz traqueal que evita infecções, porém, esses animais começaram a apresentar dificuldade respiratória após 75 dias devido à estenose luminal causada por fibrose.⁹¹

Os animais do grupo III do presente estudo, aqueles que receberam traqueias rescelularizadas com condrócitos, células de músculo liso e CTMs não sobreviveram por um período maior do que aqueles que receberam apenas traqueias descelularizadas, diferente do que foi descrito acima no estudo de Batioglu-Karaaltin e colaboradores (2014).⁹¹ Esse fato pode ser explicado devido à quantidade de células cultivadas neste estudo: 4×10^6 condrócitos, 1×10^6 células de músculo liso, e 2×10^6 CTMs, enquanto Batioglu-Karaaltin e colaboradores (2014) utilizaram $1,3 \times 10^7$ CTMs.⁹¹ Dessa forma, pode-se concluir que a quantidade de células cultivadas nas traqueias rescelularizadas não foi suficiente. Além disso, esses animais receberam as injeções de 1×10^6 CTMs por kg apenas no sétimo dia, pois vieram a óbito entre o 10º e 12º dia. A quantidade das células-tronco mesenquimais injetadas também interfere na resposta ao transplante.²³ Batiwalla e colaboradores (2014) afirmam que a infusão venosa semanalmente de células mesenquimais na concentração de 2×10^6 /kg do animal pode auxiliar o controle de DECH.⁶³ Kim (2013) afirma que a dose necessária para promover melhora da resposta do transplante é ainda maior com injeção de 1×10^7 células/kg.²³ Sendo assim, a quantidade de CTMs injetadas neste estudo também não foi suficiente para imuno-modular a resposta imune do coelho receptor.

Na análise dos animais da segunda etapa, a ausência de rejeição local era esperada, pois apesar da quantidade de DNA encontrada ser superior ao critério aceitável, os 10 ciclos de descelularização foram capazes de remover completamente as células epiteliais que expressam moléculas HLA classe II que são as causas principais da resposta imunológica após transplante, provocando rejeição aguda^{23,51,66,83} como observado nos animais da primeira etapa, já que cinco ciclos de descelularização não foram suficientes para a remoção das células epiteliais respiratórias.

Zang e colaboradores (2012) demonstraram que após cinco ciclos de descelularização com o método detergente-enzimático¹¹ em traqueias de ratos elimina-se a antigenicidade preservando sua integridade estrutural.²⁸ Ainda há presença de células remanescentes na cartilagem, mas após transplantes dessas traqueias, não houve resposta imune. Contudo, todos os enxertos sem epitélio apresentaram crescimento de um tecido fibroso e infiltração celular na luz traqueal,²⁸ a epitelização previne a ocorrência de fibrose e estenose.²⁸ A superfície interior da traqueia descelularizada precisa ser posteriormente repovoada com o epitélio próprio do receptor para evitar infecções e a obstrução da luz traqueal com a produção de um tecido fibroso de granulação e eventual estrangulamento.^{14,23,28,38,39}

A regeneração epitelial é essencial para que não ocorra a proliferação fibroblástica e ocorre por meio dos tecidos adjacentes, por isso acontece de forma mais lenta nos segmentos traqueais longos.⁴ A luz traqueal apresenta células produtoras de muco e células ciliadas responsáveis pela limpeza. Se as células ciliadas não se apresentarem de forma viável podem ocorrer episódios de pneumonia e obstrução traqueal recorrente.⁴⁵

Montovani e colaboradores (2003) observaram esse progresso da regeneração epitelial, porém há uma presença persistente das células caliciformes produtoras de mucina, sinal de atividade inflamatória e formação de muco que obstrui as vias aéreas.¹⁴ Esse dado também é encontrado no presente trabalho (Figura 46D). Berg e colaboradores (2014) também observaram um epitélio com metaplasia escamosa e ausência de células ciliadas, o que provoca uma redução da limpeza do muco.³² Esse epitélio escamoso pode ser substituído por um epitélio ciliar após seis meses.³²

Todo tecido epitelial, inclusive o da traqueia, é altamente reativo a lesões induzindo a iniciação do processo de cicatrização das células e quando esse processo se estende ou quando ocorre a formação de cicatriz, a luz da traqueia se estreita e a passagem do ar pode ser obstruída.⁸ Além disso, a falta de epitélio ciliado reduz a remoção do muco na luz traqueal.⁶⁶ Esse último problema pode ser solucionado pela sucção bronquial nos pacientes.⁶⁶

Nessa segunda etapa a quantidade de células utilizadas nas traqueias rescelularizadas foi igual à primeira etapa. Entretanto, os animais do grupo VI desta segunda etapa receberam as infusões nos sétimo, 14º e 21º dias, pois só vieram a óbito após 40 dias do transplante. Contudo, a quantidade de CTMs injetadas ainda não foi suficiente, segundo literatura.^{23,63}

Este estudo demonstra a resposta imune do hospedeiro após um transplante traqueal que se caracteriza em duas fases: a fase aguda é determinada por um intenso

infiltrado celular mononuclear, o que observamos nos animais da primeira etapa do trabalho, e a fase crônica é marcada pela formação de fibrose e tecido cicatricial, que foram encontrados nos animais da segunda etapa dos transplantes.

O epitélio traqueal é a área mais imunogênica da traqueia, ou seja, a área capaz de provocar uma resposta imunológica, o que ocorreu na primeira etapa. Entretanto, sua ausência também apresenta algumas desvantagens como ocorrência de infecções e formação de supuração aguda na luz traqueal, dado observado na segunda etapa do trabalho.

Essas proliferações que ocorrem devido à falta do epitélio respiratório são fatores limitantes para os transplantes traqueais e uma solução temporária seria o uso de válvulas de silicone intraluminais até a regeneração epitelial ser alcançada,⁴ contudo, a manutenção de uma válvula em um coelho (4 mm de diâmetro) é um desafio;⁴ outra opção é a administração de corticosteroides.⁴

Os animais descritos no trabalho de Hysi e colaboradores (2014), que também receberam transplantes traqueais de segmentos curtos, apresentaram um tempo de sobrevivência superior ao demonstrado no presente estudo (33 dias até 220 dias), entretanto esses autores realizaram algumas intervenções cirúrgicas que tiveram um papel importante no tempo de sobrevivência desses animais como broncoscopias intervencionais, sucções das secreções e dilatações das estenoses.⁴ Alguns animais do presente estudo sobreviveram após 90 dias do transplante, entretanto, sem ocorrência de nenhuma intervenção cirúrgica.

Quando se compara a idade do coelho à idade humana, percebemos que três meses do coelho, tempo máximo de sobrevivência neste estudo sem intervenção cirúrgica, equivalem a 10 anos humanos (Figura 49). Além disso, a literatura demonstra que os pacientes que receberam transplantes de traqueias engenheiradas apresentaram as mesmas complicações, com taxa de mortalidade alta após aproximadamente três meses da cirurgia e, nos pacientes que sobreviveram a um período maior, houve a necessidade de válvulas para a preservação da luz traqueal.⁹² Sendo assim, o protocolo de descelularização descrito no presente trabalho pode apresentar resultado satisfatório em humanos.

Figura 49 - Correspondência Idade do coelho *versus* Idade humana

Idade do coelho	Idade humana
1 semana	1 ano
2 semanas	2 anos
3 semanas	4 anos
4 semanas	6 anos
2 meses	8 anos
3 meses	10 anos
4 meses	12 anos
5 meses	14 anos
6 meses	16 anos
1 ano	21 anos
2 anos	27 anos
3 anos	33 anos
4 anos	39 anos
5 anos	45 anos
6 anos	51 anos
7 anos	57 anos
8 anos	63 anos
9 anos	69 anos
10 anos	75 anos

Fonte: <http://naturezaelemental.blogspot.com.br/2011/10/idade-dos-coelhos-e-idade-humana.html>

Apesar do avanço nas técnicas cirúrgicas, ainda não há um substituto traqueal adequado e a substituição traqueal permanece um grande desafio científico e técnico.⁹³ Atualmente, há muitas pesquisas envolvendo reconstrução traqueal no mundo todo, porém este é o primeiro relato de descelularização de traqueias utilizando irradiação com LED. O uso de enzimas nos protocolos de descelularização descritos na literatura gera grandes gastos para o sistema de saúde, já o LED é um equipamento permanente que pode ser utilizado como substituto.

5.1. Limitações do estudo

Tempo de produção do substituto traqueal: o protocolo de descelularização descrito neste estudo necessita de 10 ciclos para que ocorra a remoção completa das células epiteliais que são imunogênicas. Esse protocolo é relativamente longo, pois totaliza aproximadamente 21 dias de preparo, entretanto, esse também é o período necessário para a expansão e diferenciação das CTMs (21-30 dias) que serão utilizadas na etapa posterior de rescelularização do arcabouço. Futuramente, esse tempo pode ser melhorado para que o tratamento chegue ao paciente rapidamente.

Manutenção dos arcabouços traqueais produzidos: é necessária a realização de estudos futuros a fim de se comprovar se há a degradação do arcabouço descelularizado com esse protocolo quando mantido a 4°C. Jones e colaboradores (2014) demonstraram que traqueias de coelhos descelularizadas com o método detergente-enzimático descrito na literatura¹¹ são degradadas quando estocadas a 4°C.⁴¹

Análise da força compressiva das traqueias descelularizadas: este trabalho analisou a força tênsil das traqueias descelularizadas após cinco e 10 ciclos do protocolo de descelularização descrito, porém, se faz necessária a análise da força compressiva dessas traqueias, pois os relatos de colapso traqueal que Macchiarini e colaboradores (2012) demonstraram, provavelmente, ocorreram devido à redução da força compressiva.⁹⁴ Quando as traqueias são implantadas e submetidas a diferentes forças multidirecionais *in vivo*, as traqueias descelularizadas podem apresentar colapso da luz traqueal,³⁹ mesmo assim, as traqueias deste estudo foram capazes de manter a luz traqueal. A força tênsil é comparada à força de sutura das anastomoses *in vivo* e a força compressiva é necessária à preservação da luz traqueal.⁹⁴

Comprimento dos transplantes traqueais: os transplantes traqueais foram realizados utilizando segmentos curtos com acometimento de 15% do comprimento total da traqueia de um coelho, sendo necessária a realização de transplantes futuros com acometimento de 30% - 50% do comprimento total da traqueia do animal. Hysi e colaboradores (2014) realizaram os transplantes em diferentes grupos amostrais de acordo com os tamanhos dos fragmentos: A) segmento longo (10-12 anéis traqueais – 35% do comprimento total de uma traqueia de um coelho), B) segmento médio (6-8 anéis traqueais – 25% do comprimento total de uma traqueia de um coelho), C) segmento curto (4-5 anéis traqueais – 15% do comprimento total de uma traqueia de coelho).⁴ Além disso, é necessária a realização de transplantes traqueais com segmentos longos em modelos animais maiores, como *mini-pig* e ovelhas, já que as intervenções broncoscópicas e o uso de válvulas de silicone é mais fácil nesses animais.

Contaminação das culturas de CERs: na literatura é bastante claro que a presença de um epitélio maduro no transplante traqueal é essencial para a defesa do organismo e para a realização da limpeza mucociliar, pois pode reduzir a fibrose e, subsequentemente, a estenose do enxerto traqueal.³⁵ Dessa forma, há a necessidade de eliminação das contaminações recorrentes e de difícil controle que foram visualizadas nas culturas de CERs.

Neovascularização dos enxertos: o presente estudo não testou a capacidade de vascularização dos arcabouços descelularizados. A reconstrução traqueal necessita de um

método de neovascularização^{1,37} que deve ser estudado futuramente. A literatura demonstra que a realização da vascularização dos arcabouços traqueais pode atrasar a ocorrência das complicações pós-transplantes.³⁷

Modelo animal escolhido: outra limitação é o modelo animal escolhido, pois o coelho é um animal frágil. Há vários estudos que demonstram tal fragilidade como resumido na figura abaixo (Figura 50).

Figura 50 - Transplantes traqueais em coelhos

Table 2: Results of tracheal replacement and transplantation in rabbit models

Authors (year)	No. of rabbits	Operative mortality	3-week mortality
Delaere <i>et al.</i> [10]	15	-	8
Dodge-Khatami <i>et al.</i> [23]	7	-	3 ^a
Tanaka <i>et al.</i> [15]	7	-	2
Weidenbecher <i>et al.</i> [19]	6	-	4
Shi <i>et al.</i> [16]	15	-	5
Seguin <i>et al.</i> [24]	34	2	4
Wurtz <i>et al.</i> [8]	10	1	3
Present study	14	-	7

^aEuthanasia for acute respiratory distress.

Fonte: Hysi I, Kipnis E, Fayoux P, Copin M-C, Zawadzki C, Jashari R, et al. Successful orthotopic transplantation of short tracheal segments without immunosuppressive therapy. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2014;1-8.

6. Conclusões

1. O processo de descelularização após cinco ciclos remove parcialmente as células epiteliais e os condrócitos da traqueia de coelho. Após 10 ciclos do mesmo protocolo de descelularização, as células epiteliais, que são a área imunogênica do órgão, são removidas completamente, contudo, alguns condrócitos remanescentes permanecem visíveis na matriz traqueal;
2. Após caracterização das CTMs, foi possível sua expansão e diferenciação em condrócitos e células de músculo liso;
3. Não foi possível a realização do cultivo das CERs de todos os animais devido à frequência de contaminações de difícil controle;
4. Foi realizada a reconstrução traqueal com cultivo de células-tronco mesenquimais, condrócitos e células de músculo liso nas faces externas das traqueias previamente descelularizadas;
5. Os transplantes traqueais foram realizados e os animais foram acompanhados. Houve rejeição nos animais que receberam as traqueias descelularizadas com cinco ciclos devido à presença das células epiteliais. Os animais que receberam os transplantes com traqueias tratadas com 10 ciclos sobreviveram por um tempo superior sem apresentar rejeição, entretanto, vieram a óbito devido à falta das células epiteliais com a presença de fibrose.

Conclui-se que o processo de descelularização utilizado é capaz de remover as células epiteliais da traqueia de coelhos após 10 ciclos, o que evita o processo de rejeição pós-transplante, porém, posteriormente, a presença do epitélio respiratório é essencial para que não ocorra a obstrução do enxerto durante a cicatrização. Sendo assim, será necessário realizar outras investigações na área a fim de se prolongar a vida útil desses enxertos *in vivo*.

Perspectivas

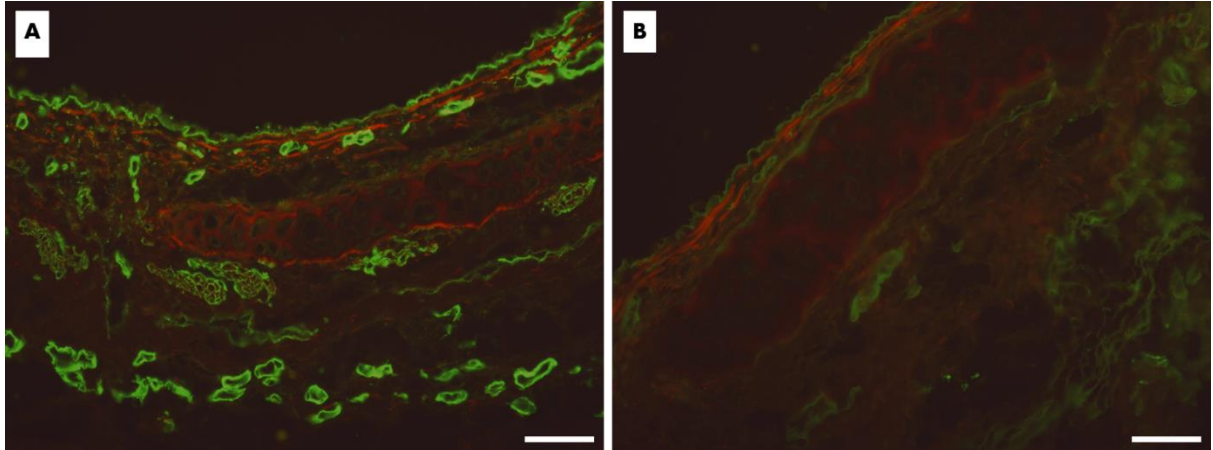
De acordo com o que foi visualizado no item - *Limitações do estudo*, algumas análises devem ser realizadas futuramente:

1. Redução do tempo de preparo dos substitutos traqueais;
2. Análise da degradação do arcabouço descelularizado quando mantido a 4°C;
3. Análise da força compressiva das traqueias pós-descelularização;
4. Realização de transplantes traqueais com segmentos longos e acometimento de 30 - 50% do comprimento total da traqueia do animal;
5. Realização de estudos em animais maiores (*mini-pigs*);
6. Eliminação das contaminações durante o cultivo das CERs;
7. Adição da etapa de vascularização do enxerto.

Além disso, faz-se necessário um estudo específico do processo de rejeição pós-transplante. A descelularização pode provocar danos à MEC, fazendo com que ocorra resposta de corpo estranho após implante.²⁸ Essa severa resposta de reação de corpo estranho leva a um enfraquecimento estrutural com rápida degeneração e com fibrose significativa.²⁸ O colágeno V é altamente imunogênico e pode estar envolvido com o desencadeamento e progressão da atividade miofibroblástica que ocorreu durante o processo de rejeição. Diante dessa informação, foi realizado um teste piloto de imunofluorescência para os colágenos I, III e V, no qual os fragmentos traqueais descelularizados com 3 a 4µm foram previamente imersos em parafina, em lâminas com aminosilane (Sigma Chemical Co.). Posteriormente, elas foram imersas em xilol e desidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Para a exposição dos sítios imunogênicos, foi realizado o tratamento enzimático dos órgãos com pepsina bovina (10000 UTD) (Sigma Chemical Co.) em tampão ácido (pH=2.2) (2 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C e incubação posterior com leite a 5% em tampão fosfato pH=7,0. As lâminas foram incubadas por uma noite, a 4°C, com anticólageno tipos I e V policlonais obtidos em coelhos e diluídos em tampão salino fosfato (PBS), ambos nas concentrações de 1:100 e anticólageno tipo III monoclonal (Oncogen), na concentração de 1:100. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS com *tween* 20 a 0,05% várias vezes e incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo e coelho conjugados com fluoresceína (Sigma Chemical Co.) e diluído na proporção de 1:50 em solução de PBS contendo azul de Evans 0,005% por 90 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas por várias vezes com PBS com *Tween*20 a 0,05% e montadas com solução de glicerina tamponada. A reação foi visualizada em microscópio de fluorescência da marca Nikon a fim

de se visualizar o colágeno exposto após os processos de descélularização (Figura 51). Torna-se interessante a análise futura a fim de se verificar a resposta fisiopatológica da rejeição/adaptação pós-tranplante.

Figura 51 - Imunofluorescência para visualização de colágeno **a)** Imunofluorescência para colágeno III; **b)** Imunofluorescência para colágeno V.



Fonte: arquivo compartilhado.

Sendo assim, faz-se necessária a análise da rejeição pós-transplante, pois esse processo pode ocorrer devido à presença das células do coelho doador ou devido à exposição do colágeno das traqueias descélularizadas.

Referências

1. Haykal S, Salna M, Waddell TK, Hofer SO. Advances in tracheal reconstruction. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2014; 2: e178.
2. Gartner LP, Hiatt JL. Sistema respiratório. In: *Tratado de histologia em cores*. 3th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. p. 351-71.
3. Hib J. Sistema respiratório. In: *Histologia – Texto e Atlas*. 1th ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2003. p. 307-25.
4. Hysi I, Kipnis E, Fayoux P, Copin M-C, Zawadzki C, Jashari R, et al. Successful orthotopic transplantation of short tracheal segments without immunosuppressive therapy. *European J Cardio-Thoracic Surg*. 2014;1-8.
5. Haag JC, Jungebluth P, Macchiarini P. Tracheal replacement for primary tracheal cancer. *Head Neck Oncol*. 2013; 21: 171-7.
6. Baiguera S, Jungebluth P, Burns A, Mavilia C, Haag J, De Coppi P, et al. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. *Biomaterials*. 2010; 31: 8931-8.
7. Baiguera S, Birchall MA, Macchiarini P. Tissue-engineered tracheal transplantation. *Transplantation*. 2010; 89: 485-91.
8. Hallers EJ, Rakhorst G, Marres HAM, Jansen JA, Kooten TG, Schutte HK, et al. Animal models for tracheal research. *Biomaterials*. 2004; 25: 1533-43.
9. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido epitelial. In: *Histologia básica*. 11th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 66-90.
10. Gartner LP, Hiatt JL. Matriz extracelular. In: *Tratado de histologia em cores*. 3th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. p. 71-85.
11. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnagui MA, Rees LE, Cogan TA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*. 2008; 372: 2023-30.

12. Shaari CM, Farber D, Brandwein MS, Gannon P, Urken ML. Characterizing the antigenic profile of the human trachea: implications for tracheal transplantation. *Head Neck*. 1998; 20: 522-7.
13. Wu W, Cheng X, Zhao Y, Chen F, Feng X, Mao T. Thoughts and progress. Tissue engineering of trachea-like cartilage grafts by using chondrocyte macroaggregate: experimental study in rabbits. *Artif Organs*. 2007; 31: 826-34.
14. Montovani JC, Nakajima V. Alterações epiteliais e cartilaginosas em cirurgia traqueal: estudo experimental em cobaias. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003; 69: 159-64.
15. Jungebluth P, Go T, Asnaghi A, Bellini S, Martorell J, Calore C, et al. Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009; 138: 586-93.
16. Weidenbecher M, Tucker HM, Awadallah A, Dennis JE. Fabrication of a neotrachea using engineered cartilage. *Laryngoscope*. 2008; 118: 593-8.
17. Baiguera S, Damasceno KL, Macchiarini P. Detergent-enzymatic method for bioengineering human airways. In: Lee C, Uygun K, editors. *Organ perfusion and culture methodology*. Boston, 2010: In press.
18. Bader A, Lorenz K, Richter A, Scheffler K, Kern L, Ebert S, et al. How site specific stem cell activation works – Interactive role of trauma cytokines and erythropoietin and its therapeutic potential for acute and chronic wounds. *Rejuvenation Res*. 2011; 14: 57-66.
19. Sung SW, Won T. Effects of basic fibroblast growth factor on early revascularization and epithelial regeneration in rabbit tracheal orthotopic transplantation. *Eur J Cardio-Thorac Surg*. 2001; 19: 14-8.
20. Seguin A, Radu D, Holder-Espinasse M, Bruneval P, Fialaire-Legendre A, Duterque-Coquillaud M, et al. Tracheal replacement with cryopreserved, decellularized, or glutaraldehyde-treated aortic allografts. *Ann Thorac Surg*. 2009; 87: 861– 8.
21. Martinod E, Seguin A, Holder-Espinasse M, Kambouchner M, Duterque-Coquillaud M, Azorin JF, et al. Tracheal regeneration following tracheal replacement with an allogenic aorta. *Ann Thorac Surg*. 2005; 79: 942–9.

22. Elliott MJ, De Coppi P, Speggiorin S, Roebuck D, Butler CR, Samuel E, et al. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study. *Lancet*. 2012; 380: 994-1000.
23. Kim H. Influence of mesenchymal stem cells on cryopreserved tracheal allografts in rabbits. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013; 46: 328-39.
24. Tsukada H, Majid A, Kent MS, Ernst A, DeCamp MM, Gangadharan SP. Two-stage end-to-end reconstruction of long-segment tracheal defects with a bioabsorbable scaffold grafting technique in a canine model. *Ann Thorac Surg*. 2012; 93: 1088-93.
25. Grillo HC. Tracheal replacement: a critical review. *Ann Thorac Surg*. 2002; 73: 1995-2004.
26. Bibas BJ, Terra RM, Oliveira Júnior AL, Tamagno MFL, Minamoto H, Cardoso PFG, et al. Predictors for postoperative complications after tracheal resection. *Ann Thorac Surg*. 2014; 98: 277-82.
27. Martinod E, Seguin A, Radu DM, Boddaert G, Chouahnia K, Fialaire-Legendre A, et al. Airway transplantation: a challenge for regenerative medicine. *Eur J Med Res*. 2013; 18: 25-9.
28. Zang M, Zhang Q, Chang EI, Mathur AB, Yu P. Decellularized tracheal matrix scaffold for tissue engineering. *Plast Reconstr Surg*. 2012; 130: 532-40.
29. Delaere P, Vranckx J, Verleden G, De Leyn P, Raemdonck DV. Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy. *N Engl J Med*. 2010; 362: 138-45.
30. Jungebluth P, Alici E, Baiguera S, Le Blanc K, Blomberg P, Bozóki B, et al. Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study. *Lancet*. 2011; 378: 1997-2004.
31. Sun F, Pan S, Shi H-C, Zhang F-B, Zhang W-D, Ye G, et al. Structural integrity, immunogenicity and biomechanical evaluation of rabbit decellularized tracheal matrix. *J Biomed Mater Res A*. 2014. doi: 10.1002/jbm.a.35273.

32. Berg M, Ejnell H, Kovács A, Nayakawde N, Patil PB, Joshi M, et al. Replacement of a tracheal stenosis with a tissue-engineered human trachea using autologous stem cells: a case report. *Tissue Eng Part A*. 2014; 20: 389-97.
33. Conconi MT, De Coppi P, Di Liddo R, Vigolo S, Zanon GF, Parnigotto PP, et al. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. *Transplant Int*. 2005; 18: 727-34.
34. Yamashita M, Kanemaru S, Hirano S, Magruffov A, Tamaki H, Tamura Y, et al. Tracheal regeneration after partial resection: a tissue engineering approach. *Laryngoscope*. 2007; 117: 497-502.
35. Kuttan JC, McGovern D, Hobson CM, Luffy SA, Nieponice A, Tobita K, et al. Decellularized tracheal extracellular matrix supports epithelial migration, differentiation, and function. *Tissue Eng Part A*. 2015; 21: 75-84. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0089.
36. Gonfiotti A, Jaus MO, Barale D, Baiguera S, Comin C, Lavorini F, et al. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. *Lancet*. 2014; 383: 238-44.
37. Delaere PR, Van Raemdonck D. The trachea: The first tissue-engineered organ? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014; 147: 1128-32.
38. Macchiarini P. Trachea-guided generation: déjà vu all over again?. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 128: 14-6.
39. Go T, Jungebluth P, Baiguero S, Asnaghi A, Martorell J, Ostertag H, et al. Both epithelial cells and mesenchymal stem cell-derived chondrocytes contribute to the survival of tissue-engineered airway transplants in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010; 139: 437-43.
40. Chang JW, Park SA, Park J-K, Choi JW, Kim Y-S, Shin YS, et al. Tissue-engineered tracheal reconstruction using three-dimensionally printed artificial tracheal graft: preliminary report. *Artif Organs*. 2014; 38: 95-105.
41. Jones MC, Rueggeberg FA, Cunningham AJ, Faircloth HA, Jana T, Mettenburg D, et al. Biomechanical changes from long-term freezer storage and cellular reduction of tracheal scaffoldings. *Laryngoscope*. 2014; 125: 16-22.

42. Rose KG, Sesterhenn K, Wustrow F. Tracheal allotransplantation in man. *Lancet*. 1979; 1: 433.
43. Macchiarini P. Bioartificial tracheobronchial transplantation – interview with Paolo Macchiarini. *Regen Med*. 2011; 6: 14-5.
44. Delaere PR, Vranckx JJ, Meulemans J, Vander Poorten V, Segers K, Van Raemdonck D, et al. Learning curve in tracheal allotransplantation. *Am J Transplant*. 2012; 12: 2538-45.
45. Lott DG. What is the future of „organ transplantation“ in the head and neck? *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014; 22: 429-35.
46. Bucheler M, Haisch A. Tissue engineering in otorhinolaryngology. *DNA Cell Biol*. 2003; 22: 549-63.
47. Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Rossi-Ferreira R, Guilherme GRB, Moroz A, et al. Chondrocyte cultures in tri-dimensional scaffold: alginate hydrogel. *Acta Ortop Bras*. 2009; 17: 242-6.
48. Neagu M, Suci E, Ordodi V, Păunescu V. Human mesenchymal stem cells as basic tools for tissue engineering: isolation and culture. *Rom J Biophys*. 2005; 15: 29-34.
49. Freshney RI. Introduction. In: *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2000. p. 1-8.
50. Birchall M, Macchiarini P. Airway transplantation: a debate worth having? *Transplantation*. 2008; 85: 1075-80.
51. Partington L, Mordan NJ, Mason C, Knowles JC, Kim H-W, Lowdell MW, et al. Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds. *Acta Biomater*. 2013; 9: 5251-61.
52. Jungebluth P, Haag JC, Lim ML, Lemon G, Sjoqvist S, Gustafsson Y, et al. Verification of cell viability in bioengineered tissues and organs before clinical transplantation. *Biomaterials*. 2013; 34: 4057-67.

53. Haag J, Baiguera S, Jungebluth P, Barale D, Gaudio CD, Castiglione F, et al. Biomechanical and angiogenic properties of tissue-engineered rat trachea using genipin cross-linked decellularized tissue. *Biomaterials*. 2012; 33: 780-9.
54. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*. 2012; 33: 1771-81.
55. Badylak SF, Gilbert TW. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol*. 2008; 20: 109-16.
56. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials*. 2009; 30: 3749-56.
57. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27: 3675-83.
58. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32: 3233-43.
59. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells International*. 2013. doi.org/10.1155/2013/130763
60. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974; 17: 331-40.
61. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974; 2: 83-92.
62. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; 9: 641-50.
63. Battiwalla M, Barrett J. Bone marrow mesenchymal stromal cells to treat complications following allogeneic stem cell transplantation. *Tissue Eng*. 2014; 20: 211-7.

64. Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, Oliveira APE, Deffune E. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. *Acta Ortop Bras.* 2006; 14: 22-4.
65. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009; 31: 25-35.
66. Hysi I, Wurtz A, Zawadzki C, Kipnis E, Jashari R, Hubert T, et al. Immune tolerance of epithelium-denuded-cryopreserved tracheal allograft. *Eur J Cardio-Thorac Surg.* 2014; 45: 180-6.
67. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9: 204-14.
68. Dorronsoro A, Fernández-Rueda J, Fechter K, Ferrin I, Salcedo JM, Jakobsson E, et al. Human mesenchymal stromal cell-mediated immunoregulation: mechanisms of action and clinical applications. *Bone Marrow Research.* 2013. doi.org/10.1155/2013/203643
69. Rastegar F, Shenaq D, Huang J, Zhang W, Zhang BQ, He BC, et al. Mesenchymal stem cells: molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells.* 2010; 2: 67-80.
70. Farbod R, Shenaq D, Huang J, Zhang BQ, He BC, Chen L, et al. Mesenchymal stem cells: molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells.* 2010; 26: 67-80.
71. Hung SH, Su CH, Lee FP, Tseng H. Larynx decellularization: combining freeze-drying and sonication as an effective method. *J Voice.* 2013; 27: 289-94.
72. Vavken P, Joshi S, Murray MM. Triton-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. *J Orthop Res.* 2009; 27: 1612-8.
73. Baptista PM, Orlando G, Mirmalek-Sani SH, Siddiqui M, Atala A, Soker S. Whole organ decellularization – a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. In: 31st Annual International Conference of the IEEE EMBS; 2009 Sep 2-6; Minneapolis, USA. Minneapolis; 2009. p. 6526-9.
74. Bagnato VS. Os fundamentos da luz laser. *Fis Esc.* 2001; 2: 4-9.

75. Bagnato VS, inventor. Uso de LEDs (light emitting diodes) para terapia bioestimuladora. BRPI0200200-0. 23 Jan 2002.
76. Oliveira KC, Furcin APL, Rodrigues JFGM, Zamarrenho LG, Oliveira BG, Villaverde AB, et al. Avaliação da proliferação celular sob estresse nutricional e aplicação da bioestimulação. [Internet] [acesso 2014 out 30]. Disponível em: www.inicep.univap.br
77. Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 3-9.
78. Lubart R, Friedman H, Peled I, Grossman N. Light effect on fibroblast proliferation. *Laser Ther.* 1993; 5: 55-7.
79. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 1989; 56: 691-704.
80. Gur A, Cosut A, Sarac AJ, Cevik R, Nas K, Uyar A. Efficacy of different therapy regimes of low-power laser in painful osteoarthritis of the knee: a double-blind and randomized-controlled trial. *Lasers Surg Med.* 2003; 33: 330-8.
81. Evaristo TC, Alves FCMC, Moroz A, Mion W, Acorci-Valério MJ, Felisbino SL, et al. Light-emitting diode effects on combined decellularization of tracheae. A novel approach to obtain biological scaffolds. *Acta Cir Bras.* 2014; 29: 485-92.
82. Silva THG, Pazetti R, Aoki FG, Cardoso PFG, Valenga MC, Deffune E, et al. Assessment of the mechanics of a tissue-engineered rat trachea in an image-processing environment. *Clinics.* 2014; 69: 500-3.
83. Liu Y, Nakamura T, Yamamoto Y, Matsumoto K, Sekine T, Ueda H, et al. Immunosuppressant-free allotransplantation of the trachea: the antigenicity of tracheal grafts can be reduced by removing the epithelium and mixed glands from the graft by detergent treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000; 120: 108-14.
84. Roh JL, Kim DH, Rha KS, Sung MW, Kim KH, Park CI. Benefits and risks of mitomycin use in the traumatized tracheal mucosa. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 136: 459-63.

85. Nakagishi Y, Morimoto Y, Fujita M, Ozeki Y, Maehara T, Kikuchi M. Rabbit model of airway stenosis induced by scraping of the tracheal mucosa. *Laryngoscope*. 2005; 115: 1087-92.
86. Paiva FP, Maffili VV, Santos ACS. Curso de manipulação de animais de laboratório. Ministério da Saúde: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz; 2005.
87. Fernyhough ME, Hausman GJ, Guan LL, Okine E, Moore SS, Dodson MV. Mature adipocytes may be a source of stem cells for tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 368: 455-7.
88. Moroz A. Avaliação de novas propostas em arcabouços tridimensionais (3D) para cultura de células-tronco mesenquimais e condrogênese [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2009.
89. Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Ferreira RR, Guilherme GRB, Moroz A, et al. Cultura de condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato. *Acta Ortop Bras*. 2009; 17: 242-6.
90. Zar JH. *Biostatistical analysis*, 5ed. New Jersey: Prattice-Hall, 2009. 994p.
91. Batioglu-Karaaltin A, Karaaltin MV, Ovali E, Yigit O, Kongur M, Inan O, et al. In vivo tissue-engineered allogenic trachea transplantation in rabbits: a preliminary report. *Stem Cell Rev*. 2014.
92. Weiss DJ, Elliott M, Jang Q, Poole B, Birchall M. Tracheal bioengineering: the next steps. In: *Proceedings of an International Society of Cell Therapy Pulmonary Cellular Therapy Signature Series Workshop*; 2014 Apr 22; Paris, France.
93. Vogel G. Trachea transplants test the limits. *Science*. 2013; 340: 266-8
94. Baiguera S, Del Gaudio C, Jaus MO, Polizzi L, Gonfiotti A, Comin CE. Long-term changes to in vitro preserved bioengineered human trachea and their implications for decellularized tissues. *Biomaterials*. 2012: 3662-72.

Anexo

ANEXO A – Certificado de aprovação do trabalho pelo COBEA

<p>Comissão de Ética em Experimentação Animal</p> <p>Ciência através da Prática DF nº 30 de 28/04/99</p>	<p>FACULDADE DE MEDICINA</p> <p>FMB</p>	<p>unesp</p> <p>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA</p> <p>CAMPUS DE BOTUCATU</p> <p>FACULDADE DE MEDICINA</p>
<h1>Certificado</h1>		
<p>Certificamos que (Protocolo CEEA 905-2011) "Avaliação histológica e funcional do enxerto de neotraqueia de coelho desenvolvido por bioengenharia", a ser conduzido por Thaiane Cristine Evaristo, orientada pela Profa. Dr^a Daniele Cristina Cataneo, Co-orientada pela Profa. Dr^a. Elenice Deffune, com a colaboração de Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves, Michele Janegitz Acorsi Valério, Dr. Raul Lopes Ruiz Júnior, Sérgio Luis Felisbino, com Apoio Técnico Carlos Roberto Gonçalves Lima e Ednelson Henrique Bianchi está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "coelhos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.</p>		
<p>Prof^a Dr^a Noeme Sousa Rocha Vice- Presidente da CEEA</p>	<p>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 29/09/2011.</p> <p>Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA</p>	<p>Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br</p>

Apêndice

Apêndice A – Artigo

Artigo escrito de acordo com as normas da Revista Plos one.

Characterization of rabbit tracheal scaffold decellularized with tissue engineering techniques: New technology for decellularization protocols

Thaiane C. Evaristo^{1¶}, Aparecida V. G. Souza^{1¶}, Woner Mion^{1&}, Ednelson H. Bianchi^{1&},
 Andrei Moroz^{2¶}, Wanderlei S. Bagnato^{3&}, Rosana Rossi-Ferreira^{4&}, Paulo F. G. Cardoso^{5&},
 Alexandre T. Fabro^{6¶}, Elenice Deffune^{1¶}, Daniele C. Cataneo^{7¶*}

¹ Cellular Engineering Laboratory, Blood Center, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu-SP, Brazil.

² Department of Bioprocess and Biotechnology, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara-SP, Brazil.

³ Department of Physics and Materials Science, Institute of Physics of São Carlos, São Paulo University, USP, São Carlos-SP, Brazil.

⁴ Department of Biological Science, Bauru Faculty of Science, São Paulo State University, UNESP, Bauru-SP, Brazil.

⁵ Division of Thoracic Surgery, Heart Institute (InCor), Clinics Hospital, São Paulo University, USP, São Paulo-SP, Brazil.

⁶ Research manager, Clinic Hospital of Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu-SP, Brazil.

⁷ Division of Thoracic Surgery, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu-SP, Brazil.

* Corresponding author

E-mail: dcataneo@fmb.unesp.br (DCC)

¶These authors contributed equally to this work.

&These authors also contributed equally to this work.

Abstract

Tracheal resection is limited to 50% of its longitudinal extent in adults and 30% in small children. Any extent beyond these limits may render primary reconstruction unfeasible and serious surgical complications may ensue. Tracheal tissue engineering techniques have been developed as an alternative to produce tracheal grafts amenable to transplantation in such complex cases. This study focuses on the production and characterization of a decellularized tracheal model for airway grafting using tissue engineering techniques. Were performed 5 and 10 cycles of decellularization on donor rabbit's tracheae following these steps: 1) freezing/defreezing without addition of any cryoprotectant, 2) sonication in Ultrasonic cleaner with 40 Khz for 10 minutes, 3) blue light-emitting diode (LED) irradiation with wavelength of $450\text{nm} \pm 20\text{nm}$ using a 90 J/cm^2 potency during 60 minutes and 4) exposure to 4% sodium deoxycholate detergent during 48 hours under 180 rpm agitation. Following the decellularization protocols, the scaffolds were characterized using biomechanical, morphological and cellular and molecular biology techniques. After 5 repeated cycles of the decellularization protocols, it was still possible to observe respiratory epithelial nuclei and chondrocytes within the tracheae. After 10 cycles of the same decellularization protocol, the respiratory epithelial nuclei were completely removed and the tracheal cartilage chondrocytes were reduced in number. However, the amount of DNA found after 5 and 10 cycles of decellularization, in this study, was higher than the acceptable criteria ($<50\text{ ng /mg}$) for an effective decellularization process. The residual sodium deoxycholate detergent in the previously decellularized tracheae exhibited toxicity after prolonged contact with mesenchymal stem cells; but this hardly toxicity may affect in vivo recellularization, given that the percentage of cell viability is still high. Histological analysis revealed collagen reduction after decellularization treatments; however, the biomechanical test showed no loss of tensile strength. We conclude that the decellularization process used in this study is capable of producing a suitable tracheal scaffold for tissue engineering.

Keyword: Trachea reconstruction, Tissue engineering, decellularization, mesenchymal stem cells, transplantation

Introduction

The long segment tracheal diseases are challenging in surgical practice, because it poses a management obstacle to effective treatment [1-4]. In adults the tracheal lesions in excess of 50% of the tracheal length and 30% in small children are not amenable to tracheal resection and reconstruction by end-to-end anastomosis [1,4-27]. This scenario may change with the development of a construct for tracheal replacement with anatomical, physiological and biomechanical properties similar to native trachea [20].

The trachea is a complex organ capable of performing several functions such as heating, humidifying, cleaning the airways. Its dynamic mechanical properties during the breathing cycle, in addition to the segmental vascular distribution makes it difficult to replace [23,28] In order to obtain a successful tracheal replacement, the graft must be able to perform all these functions and, present similar structural, morphological and mechanical characteristics [29]. The ideal tracheal graft must have: lateral stiffness, longitudinal flexibility, airtightness, biocompatibility, and ability to enable tissue integration. It also has to , be non-toxic, non-carcinogenic, resistant to bacterial colonization, not require immunosuppression, be easy to implanted, and to promote epithelialization [13,21,23-25,30-32]. Moreover, the graft should promote chondrocyte adhesion, cell differentiation, production of extracellular matrix (ECM), and also to present vascularization [6].

Grillo (2002) stratified tracheal replacements in 5 categories: prosthetic materials, autogenous tissues, non-viable tissue, tracheal transplantation and tissue engineering [15]. However, attempts to use the first four techniques present lots of complications: stiffness, granuloma formation, chronic infection, airway obstruction, graft migration, erosion of blood vessels, graft ischemia, immune rejection, lack of epithelialization, granulation tissue proliferation, and more severe complications, such as stenosis and necrosis [6,9-11]. Therefore, the bioengineering area is a potential option for these patients [5,6,10,21,24,33,34].

Tissue engineering consists in the replacement of damaged tissues and organs by isolation and in vitro cultivation of cells, which may be seeded on synthetic or biologic scaffolds prior to implantation in the affected patient [35-42].

Synthetic scaffolds can be mass produced, but it lacks a similar architecture of the native tissue [35].

Biological scaffolds obtained from decellularized organs and tissues have been widely investigated in regenerative medicine because of its biocompatibility. The three-dimensional scaffolds are composed mainly by ECM proteins and other components such as collagen, hyaluronic acid, fibrin and other glycosaminoglycan products (GAGs) that support adhesion, migration, proliferation, and differentiation, stimulating repair and regeneration in the host. Furthermore, they are not immunogenic, allow neovascularization and do not release toxic products [21,23,25,29,30,32,43-48].

The decellularization protocol is expected to remove completely all the cellular and nuclear material in order to avoid the triggering of the host's immune response which could result in the rejection of the graft, while preserving the remaining ECM components [18,21,24,29,41,43-48]. In addition, the substances used in this decellularization processes must have minimum residual effects, so that there is inhibition of cell growth after implantation in the host [47].

The detergent-enzyme protocol described by Macchiarini et al (2008) makes a non-immunogenic tracheal organ preserving the structural and mechanical properties, and the contents of basic fibroblast growth factor which enhances vascularization [1,21]. The sodium deoxycholate (DS) detergent promotes the destruction of cell membranes that carries MHC antigens, and the nuclear content needs to be removed by DNAses [21]. However, an exorbitant amount of enzyme is necessary, which makes the process cost-prohibitive [49], therefore other options have been sought after.

We have tested the use of Light Emitting Diode (LED), a semiconductor device that emits light [50,51] as an alternative agent for decellularization used in addition to other substances [52,53] such as the apoptosis caused by oxidative stress resulting from LED irradiation [54-58].

This study is focused on the use of high-dose LED as a method to assist in tissue decellularization.

Methods

Ethics Statement

Thirty male New Zealand adult rabbits weighing 3.0 - 4.0 kg were used in this study. The animals were maintained in a controlled ambient and received standard pellet food and water ad libitum. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation, and carried out in accordance with the ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (Permit Number 905-2011). Surgical procedures were performed under general anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

Animals were anesthetized with intramuscular injection of Ketamine and Xylazine [59-61] and sacrificed using barbiturate overdose. The tracheal segments measuring between 4.0 to 6.0 cm (about 25 -30 tracheal rings) [62] were surgically removed and subjected to microscopic dissection to remove the largest possible quantity of connective tissue. Twenty tracheae were decellularized and 10 tracheae were kept in 6°-8°C for fresh analyses.

Tracheal decellularization protocols

The tracheae were divided into fragments of approximately 0.5 – 1.0 cm (approximately 4-5 cartilage rings) before decellularization protocols. Two scenarios were investigated, with either 5 or 10 cycles of the identical chosen decellularization protocol, in order to verify how many cycles are required to produce a non-immunogenic scaffold that still preserves the composition, structure and biomechanical properties of the ECM. The following decellularization protocol was employed:

- a) freezing/defreezing without addition of any cryoprotectant;
- b) sonication in Ultrasonic cleaner (Unique model USC 1400[®]) with 40 Khz for 10 minutes;
- c) blue light-emitting diode (LED) irradiation with wavelength of 450nm \pm 20nm at a dose of 90 J/cm² at a total exposure of 60 minutes (Fig. 1);
- d) addition of sodium deoxicholate detergent 4% during 48 hours under 180 rpm agitation in the C24 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific).
- e) washing in PBS C24 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific).

The steps “b) through e)” were repeated 5 or 10 times. Subsequently, these tracheae were washed ten times under agitation during 10 minutes in PBS supplemented with 10% antibiotic-antimycotic (Gibco[®] Invitrogen).

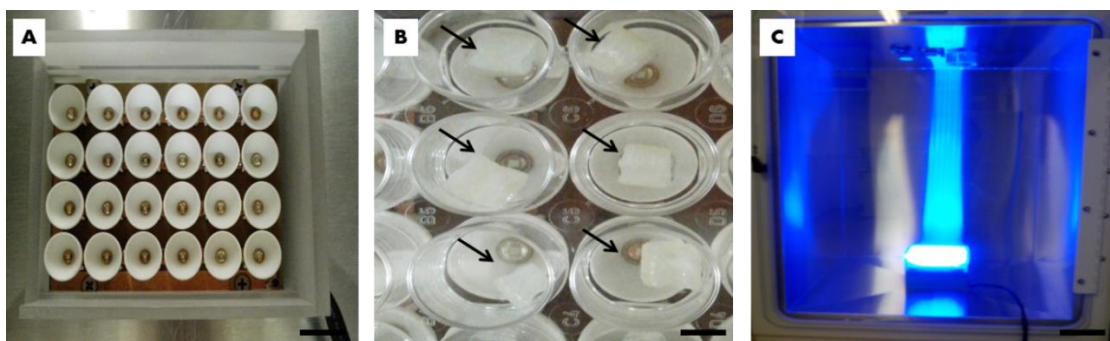


Fig. 1. Tracheal decellularization protocol. A) Light emitters of the Biotable. B) Tracheal fragments (1 cm) in the wells of the plate in the Biotable (arrows). C) LED irradiation with

wavelength of $450\text{nm} \pm 20\text{nm}$ at a dose of 90 J/cm^2 at a total exposure of 60 minutes of exposure. Scale bar = 1 cm.

Tracheal morphological characterization

Three tracheal rings were separated for histological and morphological analysis. These fragments were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, cut in a microtome ($5\mu\text{M}$), and stained with either Hematoxylin-Eosin (HE), Alcian blue and Sirius red.

Tracheal residual DNA quantification

This test was performed in triplicate to detect if there was detectable DNA after the decellularization cycles when compared with the DNA amount of the native tracheae. After extraction of the DNA with white blood cell lysis buffer and proteinase K, the DNA amount was quantified using the Nanodrop[®] device (ND Spectrophotometer 1000).

Tracheal residual toxicity

The residual toxicity test was performed in two conditions: short or prolonged exposure to the decellularized scaffolds. This was done to analyze the induction of apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) that were previously isolated from adipose tissue of the same trachea donor rabbits, when in close contact (48 hours or 15 days) with the tracheal decellularized scaffolds [18]. It was used Annexin-V/Propidium Iodide Apoptosis Detection kit (BD - Pharmingen[™] FITC) in a flow cytometer.

These tests were performed in triplicate, and three fragments of decellularized tracheae measuring approximately 1.5 – 2.0 cm (8 - 10 cartilage rings) were put into three wells of a 24 well non-adherent culture plates (Nunc[®]) followed by the seeding of approximately 1×10^6

MSCs. The negative control reaction was performed in three other wells of the same culture plate were only MSCs were seeded at the same cell concentration. The culture medium was Dulbecco's Eagle's Modified Medium (DMEM) Knockout[®] (Invitrogen[™]). The culture plates were kept for 48 hours or for 15 days at 37° C with 5% CO₂ in order to ensure cell contact and adhesion to the scaffold. After these periods, the cells were recovered, immediately stained with Annexin-V/propidium iodide, and analyzed by flow cytometry respecting the manufacturer's protocol. Subsequently, the readings were made in FACSCalibur BD[®] equipment and the obtained data were analyzed with the CellQuest[™]BD software.

Tracheal biomechanical characterization

The tensile test was used to compare the stiffness between fresh tracheae and decellularized ones with 5 and 10 cycles. The equipment we used was Universal Mechanical Testing Machine EMIC[®] DL 10.000, which has an accuracy of $\pm (0.018 + F/3700)$ kN, calculated within the specifications of the ABNT NBR NM ISO 7500-1:2004 and ABNT NBR 6674:1999. The machine works with a computer that was Windows[™] 2000, which was used to run the Mtest[®] program (DDL, Minnesota - USA) for graphical control and measurement of the results (Fig. 2). Twenty tracheal segments were tested measuring approximately 2.0 cm, equivalent to 10 tracheal rings of native tracheae and decellularized tracheae to perform this protocol.

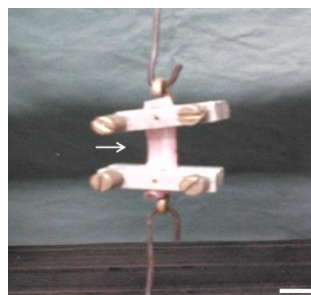


Fig. 2. Tracheal biomechanical test. Scale bar = 1 cm.

Statistical Analysis

Statistical analysis was used for tensile testing of tracheae. Technical analysis of variance for the model with a factor complemented by the multiple comparison test of Tukey [63], considering the 5% level of significance.

Results

Tracheal morphological characterization

The tracheae submitted to two different protocols (5 or 10 decellularization cycles) were analyzed histologically. The tracheas submitted 5 decellularization cycles had the respiratory epithelial cells and chondrocytes partially removed (Fig. 3B), whereas, the tracheas of the 10 decellularization cycles had the respiratory epithelium completely removed. Chondroblasts, chondrocytes and fibroblasts of the perichondrium, and part of the chondrocytes were present in the hyaline cartilage (Fig. 4B). Several cavities in the matrix known as cartilage lacunae, without cells in hyaline cartilage were observed in both treatments, and non-removed chondrocytes were also observed.

In both decellularization protocols the tracheae showed no loss of GAGs content by alcian blue staining if compared to native (control) tracheae (Fig. 3C-D and 4C-D). The area of collagen fibers was increased by Picrosirius staining, especially after 10 cycles of decellularization (Fig. 3F and 4F).

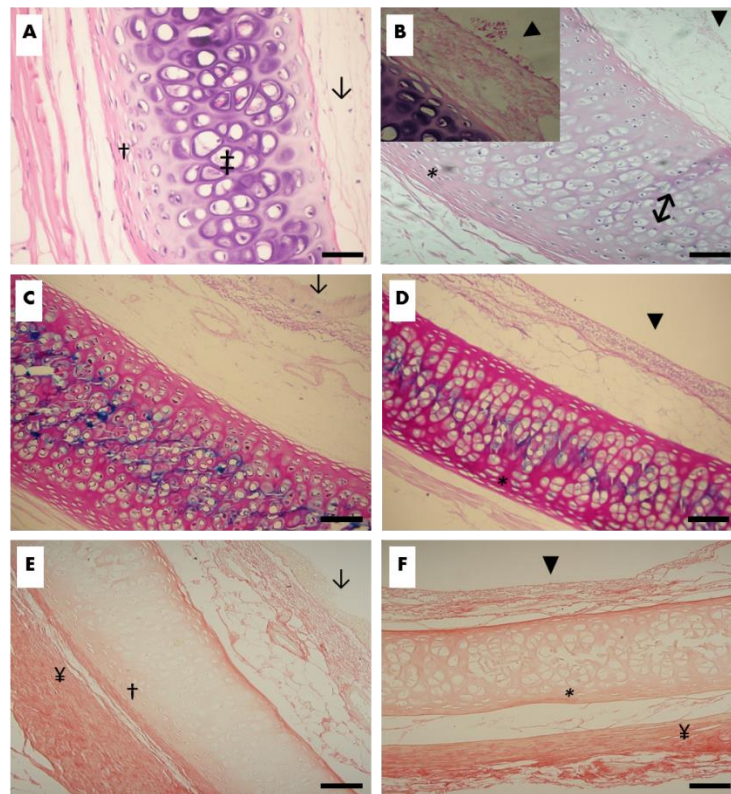


Fig. 3. Morphological panel of the tracheal rings with 5 cycles of decellularization.

Histological sections of tracheal segment before (untreated group: A, C, E) and after (treated group: B, D, F) decellularization with 10 cycles were stained with H&E (A,B), Alcian Blue (C,D) and Sirius red (E,F). Note some nuclei of hyaline cartilage are not completely removed after decellularization because the dense extracellular matrix compared to untreated group. All scale bars = 100 μ m. Morphological remarks: (‡) Hyaline cartilage in the untreated trachea. Note the normal morphological aspects of the cartilage. (↓) Hyaline cartilage area after decellularization. Note the presence of nuclei in the remaining cartilage due to the dense ECM. (†) Perichondrium in the untreated trachea. Note the normal morphological aspects. (*) Perichondrium after decellularization. Note that the decellularization protocols partially removed nuclei present in this area. (↓) Tracheal epithelium in the untreated trachea. Note the presence of the organized epithelium. (▼) Tracheal epithelium after decellularization. Note that the decellularization protocol partially removed the cells in this area. (¥) Fibrous perichondrium. Note the presence of fibroblasts nuclei and well-organized and thick type I

collagen fibers on the untreated trachea, however, there is a reduction of type I collagen fibers after 5 cycles decellularization.

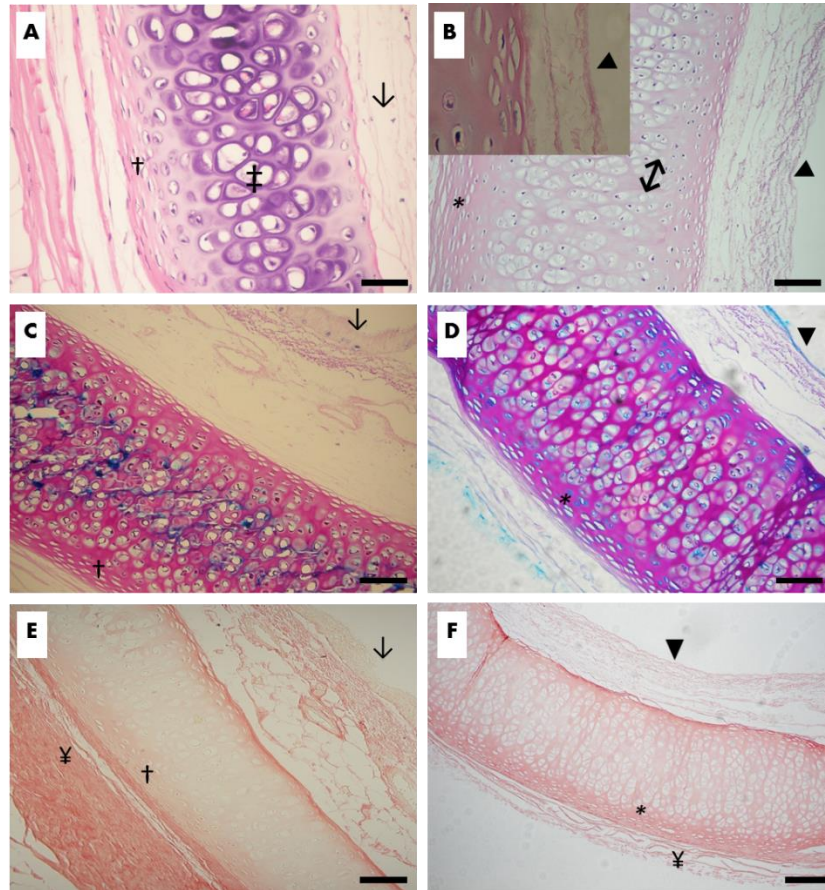


Fig. 4. Morphological panel of the tracheal rings with 10 cycles of decellularization.

Histological sections of tracheal segment before (untreated group: A, C, E) and after (treated group: B, D, F) decellularization with 10 cycles were stained with H&E (A,B), Alcian Blue (C,D) and Sirius red (E,F). Note some nuclei of hyaline cartilage are not completely removed after decellularization because the dense extracellular matrix compared to untreated group. All scale bars = 100 μ m. Morphological remarks: (‡) Hyaline cartilage in the untreated trachea. Note the normal morphological aspects of the cartilage. (†) Hyaline cartilage after decellularization. Note the presence of nuclei in the remaining cartilage due to the dense ECM. (†) Perichondrium of the untreated trachea. Note the normal morphological aspects. (*) Perichondrium after decellularization. Note that the decellularization protocols removed all

nuclei in this area. (↓) Tracheal epithelium of the untreated trachea. Note the presence of the organized epithelium. (▼) Tracheal epithelium after decellularization. Note that the decellularization protocol removed all nuclei in this area. (¥) Fibrous perichondrium. Note the presence of fibroblasts nuclei and well-organized and thick type I collagen fibers on the untreated trachea, however, there is an intense reduction of type I collagen fibers after 10 cycles of decellularization.

Tracheal residual DNA quantification

After 5 decellularization cycles, the amount of DNA decreased by 35% compared to the untreated (control) trachea. After 10 decellularization cycles, it decreased by 40% (Fig. 5).

	Control <i>in natura</i>	Decellularized with 5 cycles	Decellularized with 10 cycles
Weight (mg)	35.8 mg	35.8 mg	35.8 mg
DNA (ng/mg)	258.9 ng/mg	168.0 ng/mg	154.9 ng/mg

Fig. 5. Tracheal quantitative DNA analysis of the untreated tracheae and treated tracheae with decellularization cycles.

Tracheal residual toxicity

After 48 hours, the results showed that there was preservation of cell viability in both samples: untreated (control) and the tracheas submitted to decellularization. The mean MSCs control viability was 81.35% (Fig. 6) and the MSCs (exposed to the decellularized scaffolds) mean viability was 82.28% (Fig. 6). There was no difference in the percentages of apoptosis, necrosis and apoptosis/necrosis of control cells and test cells (Fig. 7), therefore suggesting that the contact of the decellularized trachea to MSCs did not induce cell necrosis or apoptosis after 48 hours.

However, the MSCs control mean viability increased to 97.94% after 15 days of culture (Fig. 6) while the MSC test mean viability was maintained at 82.75% (Fig. 6). The percentage of apoptosis, necrosis and apoptosis/necrosis of test cells increased when compared to control reaction percentages after 15 days of culture (Fig. 7).

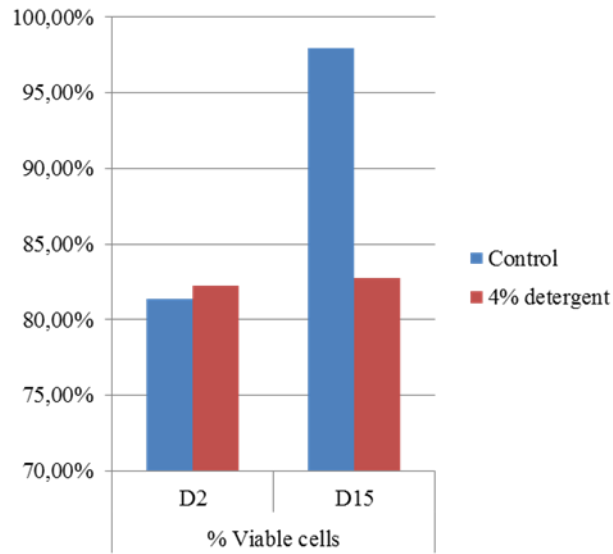


Fig. 6. Evaluation of the cell viability in two different periods of culture (n=3).

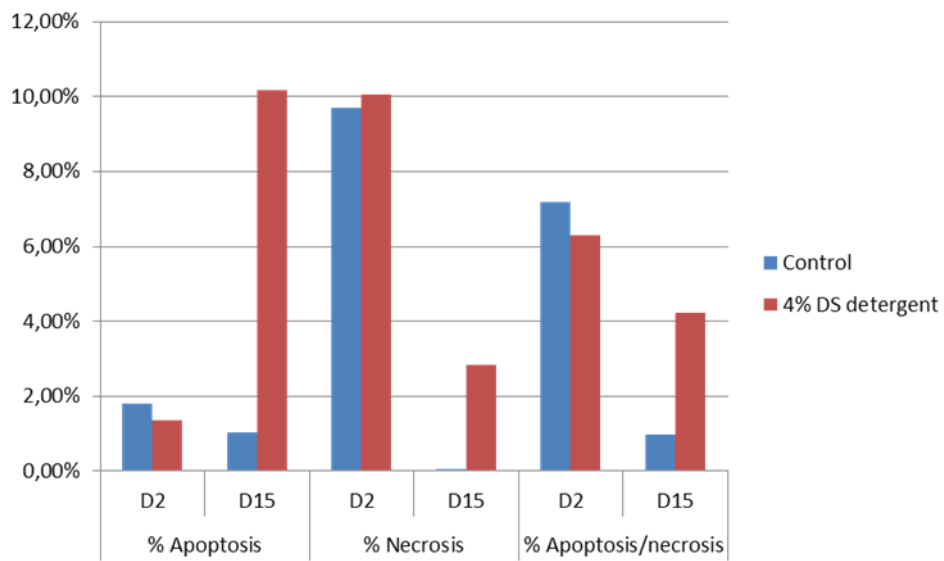


Fig. 7. Evaluation of apoptosis and necrosis cell in two different periods of culture (n=3).

Tracheal biomechanical characterization

The stiffness coefficient (deformability) of the decellularized tracheae decreased (48.41%) after 5 cycles of decellularization when compared to the mean stiffness of the untreated tracheae and decreased even further (49.90%) after 10 cycles of decellularization (Table 1).

The mean strength (tensile strength) of the decellularized tracheae increased 46% (5 cycles protocol) and 55% (10 cycles) compared to the mean strength of the untreated tracheae (Table 1).

There was a significant difference in the values of the untreated tracheae and decellularized tracheae with 5 and 10 cycles as seen in Table 1 ($p < 0.05$).

Table 1. Mean and standard deviation of the tensile test of the untreated tracheae and decellularized tracheae

	Untreated Trachea	5 cycles Decellularized Trachea	10 cycles Decellularized Trachea	p
Stiffness	2.683 (1.141)	1.384 (0.429)	1.344 (0.501)	$p < 0.01$
Resistance	9.025 (3.384)	13.235 (3.823)	14.056 (3.996)	$p < 0.01$
Maximum force (N)	9.025 (3.384)	13.235 (3.823)	14.056 (3.996)	$p < 0.01$
Deformation (mm)	3.555 (0.814)	9.806 (2.176)	10.917 (2.327)	$p < 0.01$

($p < 0,05$) Control vs decellularized with 5 and 10 cycles.

Discussion

The decellularization protocol with 5 and 10 cycles partially removed the chondrocytes in hyaline cartilage. In both protocols, there are several gaps without cells in hyaline cartilage,

but there are still remaining nuclei in this area due to dense ECM making it difficult to accomplish a complete decellularization process of this material as described by other authors [1,5,14,19,29,41,45,64,65]. Nevertheless, the presence of the remaining chondrocytes should be tolerated in the matrix remodeling and replacement of these cells by the transplant recipient cells [41]. MHC-I and MHC-II antigens are present on epithelial cells and subepithelial glands, but not in the hyaline cartilage of the tracheae, which reduces the probabilities of rejection by the recipient [13,41,62,65].

The 10 decellularization cycles produced a non-immunogenic tracheal scaffold given that there was a complete removal of respiratory epithelial cells conversely, the repetition of 5 cycles was unable to remove this immunogenic area of the tracheae, given that there are still visible respiratory epithelial cells.

A decellularization protocol must remove the potentially immunogenic material and preserve the components of the ECM such as collagen, fibronectin and laminin, which will be important in the scaffold recellularization, promoting cell adhesion, migration and vascularization [18,24,29,41,43-47]. Retention of these ECM molecules that are responsible for the mechanical strength of the tissue, such as collagen and GAGs, is also necessary to ensure the scaffold/tracheal functionality [41]. When compared with untreated control tracheae, the staining with alcian blue showed no loss of GAG contents in decellularized tracheae either with 5 or with 10 cycles. On the other hand, the Sirius red staining revealed a decrease in collagen fibers after the decellularization process, and this decrease occurred in greater intensity after 10 cycles of decellularization. Zang et al (2012) used a combined detergent-enzymatic decellularization method [1,5,18,26] and noted a significant reduction in the GAG content of the decellularized trachea, and decreased collagen content [18], confirming our findings. The tracheal hyaline cartilage plays a significant role in the structural function of the tracheal rings by keeping the airway open, in the presence of the variable

intrathoracic pressures created during breathing [41]. This structural property is a result of the association between the high osmotic pressure of the proteoglycan and GAGs with the tensile strength of the collagen fibers [41]. Sodium deoxycholate detergent is an ionic detergent that has a lesser impact on the ECM structure although when it is used repeatedly it may dramatically affect the tissue properties [43]. Haag et al (2012) showed that 9 cycles do not affect the structural and mechanical properties of the rat tracheae decellularized with this detergent [43]. The decellularization protocol used in our study with the same DS detergent demonstrated a loss of collagen, particularly after the 10 decellularization cycles.

Another important evaluated was the presence of DNA in the decellularized scaffolds. The histological analysis showed epithelial cell remnants and chondrocytes after 5 decellularization cycles as well as the presence of chondrocytes after 10 cycles. Indeed, many commercially available scaffolds have residual DNA after decellularization [21]. In our study the amount of DNA found after 5 and 10 decellularization cycles was higher than the acceptable criteria (<50 ng/mg) considered as an efficient decellularization process [22]. Berg et al (2014) showed that after 17 cycles of a detergent-enzymatic decellularization protocol, there were still some remaining chondrocytes, but the DNA quantitative analysis revealed 34 ng/mg (which is within the acceptable range for the amount of DNA, whereas) the untreated tracheae had 305 ng/mg [22]. Therefore, it is necessary to evaluate our findings in order to propose improvements in the decellularization protocols in order to achieve acceptable amounts of tracer DNA.

In regards to the residual toxicity after 48 hours, the results indicated the preservation of cell viability. Moreover, there was higher viability of cells that had contact with the decellularized trachea compared to control cells. Zang et al (2012) studied the detergent toxicity after 48 hours and found a similar result [18]. This result can be explained by the presence of growth factors and collagen which were not destroyed during the

decellularization. The control MSCs mean viability increased after 15 days of culture; while the test MSC mean was maintained, suggesting residual toxicity, which needs to be further investigated.

The apoptosis, necrosis and apoptosis/necrosis percentage of test cells increased when compared to control reaction percentages after 15 days of culture, suggesting the presence of residual sodium deoxycholate detergent in the previously decellularized tracheae represents toxicity after prolonged contact with MSCs. This residual toxicity may not affect the *in vivo* recellularization of the scaffolds, since the cell viability percentage is still high. It is expected that by carrying out further studies increasing the washing cycles of these tracheae, after decellularization, should minimize these problems.

The decellularized tracheae mean stiffness decreased after 5 cycles compared to the untreated tracheae stiffness mean and further decreased after 10 cycles of decellularization. The enzyme-detergent decellularization protocol previously described [1] reduced the stiffness by 26% [41] and the mean resistance of the decellularized tracheae increased if compared to the untreated tracheae. This last result was not observed in enzyme-detergent decellularization protocol [1] that caused an average loss of 24% of the tensile strength in the decellularized tracheae [41]. Despite the histology findings showing collagen loss after decellularization treatments, this was not followed by a loss of tensile strength. Changes in the amount of ECM components may affect the functional properties, particularly at the biomechanical level such as in tracheal stenosis which is often associated with a significant loss of proteoglycan rich in GAG and type I collagen [41].

The biomechanical weakness can also potentially lead to a tracheal collapse *in vivo* as a result of the negative pressure imposed by spontaneous breathing [41]. A compressive strength analysis in these tracheae might be useful to predict collapse given that there have been previous clinical reports of tracheal collapse by Macchiarini et al (2012), which were

probably a result of the reduced compressive strength [66]. Due to in vivo multidirectional forces, the decellularized tracheae may undergo collapse of its lumen [31]. The tensile strength is compared to the in vivo anastomosis suture strength, and the compressive force is necessary to preserve the tracheal mechanical integrity [66].

We conclude that the 5 decellularization cycle protocol is inefficient for removing the epithelial cells and the chondrocytes of the rabbit trachea. Conversely, the 10 cycle decellularization protocol, results in complete removal of all respiratory epithelial cells which can reduce the potential for post-transplantation tracheal graft rejection. Nonetheless, there are still many chondrocytes and some residual DNA (higher than the acceptable criteria) in addition to a reduction in the collagen content of the scaffolds. Such findings altogether may affect the mechanical strength during breathing, should these scaffolds be used. This will require further studies including orthotopic tracheal transplantation.

Acknowledgments

The authors would like to express their thanks to the staff of the Cell Engineering Laboratory of the Botucatu Medical School, UNESP – São Paulo State University; Brazil. The technical assistance of Márcio de Carvalho with DNA quantification is also gratefully acknowledged.

References

1. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnagui MA, Rees LE, Cogan TA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*. 2008; 372: 2023-30.
2. Shaari CM, Farber D, Brandwein MS, Gannon P, Urken ML. Characterizing the antigenic profile of the human trachea: implications for tracheal transplantation. *Head Neck*. 1998; 20: 522-7.

3. Wu W, Cheng X, Zhao Y, Chen F, Feng X, Mao T. Thoughts and progress. Tissue engineering of trachea-like cartilage grafts by using chondrocyte macroaggregate: experimental study in rabbits. *Artif Organs*. 2007; 31: 826-34.
4. Montovani JC, Nakajima V. Alterações epiteliais e cartilaginosas em cirurgia traqueal: estudo experimental em cobaias. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003; 69: 159-64.
5. Jungebluth P, Go T, Asnaghi A, Bellini S, Martorell J, Calore C, et al. Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009; 138: 586-93.
6. Weidenbecher M, Tucker HM, Awadallah A, Dennis JE. Fabrication of a neotrachea using engineered cartilage. *Laryngoscope*. 2008; 118: 593-8.
7. Baiguera S, Damasceno KL, Macchiarini P. Detergent-enzymatic method for bioengineering human airways. In: Lee C, Uygun K, editors. *Organ perfusion and culture methodology*. Boston, 2010: In press.
8. Bader A, Lorenz K, Richter A, Scheffler K, Kern L, Ebert S, et al. How site specific stem cell activation works – Interactive role of trauma cytokines and erythropoietin and its therapeutic potencial for acute and chronic wounds. *Rejuvenation Res*. 2011; 14: 57-66.
9. Sung SW, Won T. Effects of basic fibroblast growth factor on early revascularization and epithelial regeneration in rabbit tracheal orthotopic transplantation. *Eur J Cardio-Thorac Surg*. 2001; 19: 14-8.
10. Seguin A, Radu D, Holder-Espinasse M, Bruneval P, Fialaire-Legendre A, Duterque-Coquillaud M, et al. Tracheal replacement with cryopreserved, decellularized, or glutaraldehyde-treated aortic allografts. *Ann Thorac Surg*. 2009; 87: 861– 8.
11. Martinod E, Seguin A, Holder-Espinasse M, Kambouchner M, Duterque-Coquillaud M, Azorin JF, et al. Tracheal regeneration following tracheal replacement with an allogenic aorta. *Ann Thorac Surg*. 2005; 79: 942–9.

12. Elliott MJ, De Coppi P, Speggiorin S, Roebuck D, Butler CR, Samuel E, et al. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study. *Lancet*. 2012; 380: 994-1000.
13. Kim H. Influence of mesenchymal stem cells on cryopreserved tracheal allografts in rabbits. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013; 46: 328-39.
14. Tsukada H, Majid A, Kent MS, Ernst A, DeCamp MM, Gangadharan SP. Two-stage end-to-end reconstruction of long-segment tracheal defects with a bioabsorbable scaffold grafting technique in a canine model. *Ann Thorac Surg*. 2012; 93: 1088-93.
15. Grillo HC. Tracheal replacement: a critical review. *Ann Thorac Surg*. 2002; 73: 1995-2004.
16. Bibas BJ, Terra RM, Oliveira Júnior AL, Tamagno MFL, Minamoto H, Cardoso PFG, et al. Predictors for postoperative complications after tracheal resection. *Ann Thorac Surg*. 2014; 98: 277-82.
17. Martinod E, Seguin A, Radu DM, Boddaert G, Chouahnia K, Fialaire-Legendre A, et al. Airway transplantation: a challenge for regenerative medicine. *Eur J Med Res*. 2013; 18: 25-9.
18. Zang M, Zhang Q, Chang EI, Mathur AB, Yu P. Decellularized tracheal matrix scaffold for tissue engineering. *Plast Reconstr Surg*. 2012; 130: 532-40.
19. Delaere P, Vranckx J, Verleden G, De Leyn P, Raemdonck DV. Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy. *N Engl J Med*. 2010; 362: 138-45.
20. Jungebluth P, Alici E, Baiguera S, Le Blanc K, Blomberg P, Bozóki B, et al. Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study. *Lancet*. 2011; 378: 1997-2004.

21. Sun F, Pan S, Shi H-C, Zhang F-B, Zhang W-D, Ye G, et al. Structural integrity, immunogenicity and biomechanical evaluation of rabbit decellularized tracheal matrix. *J Biomed Mater Res Part A*. 2014.
22. Berg M, Ejnell H, Kovács A, Nayakawde N, Patil PB, Joshi M, et al. Replacement of a tracheal stenosis with a tissue-engineered human trachea using autologous stem cells: a case report. *Tissue Eng Part A*. 2014; 20: 389-97.
23. Haykal S, Salna M, Waddell TK, Hofer SO. Advances in tracheal reconstruction. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2014; 2: e178.
24. Haag JC, Jungebluth P, Macchiarini P. Tracheal replacement for primary tracheal cancer. *Head Neck Oncol*. 2013; 21: 171-7.
25. Baiguera S, Birchall MA, Macchiarini P. Tissue-engineered tracheal transplantation. *Transplantation*. 2010; 89: 485-91.
26. Conconi MT, De Coppi P, Di Liddo R, Vigolo S, Zanon GF, Parnigotto PP, et al. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. *Transplant Int*. 2005; 18: 727-34.
27. Yamashita M, Kanemaru S, Hirano S, Magruffov A, Tamaki H, Tamura Y, et al. Tracheal regeneration after partial resection: a tissue engineering approach. *Laryngoscope*. 2007; 117: 497-502.
28. Delaere PR, Van Raemdonck D. The trachea: The first tissue-engineered organ? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014; 147: 1128-32.
29. Baiguera S, Jungebluth P, Burns A, Mavilia C, Haag J, De Coppi P, et al. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. *Biomaterials*. 2010; 31: 8931-8.
30. Macchiarini P. Trachea-guided generation: déjà vu all over again?. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 128: 14-6.

31. Go T, Jungebluth P, Baiguero S, Asnaghi A, Martorell J, Ostertag H, et al. Both epithelial cells and mesenchymal stem cell-derived chondrocytes contribute to the survival of tissue-engineered airway transplants in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010; 139: 437-43.
32. Chang JW, Park SA, Park J-K, Choi JW, Kim Y-S, Shin YS, et al. Tissue-engineered tracheal reconstruction using three-dimensionally printed artificial tracheal graft: preliminary report. *Artif Organs.* 2014; 38: 95-105.
33. Gonfiotti A, Jaus MO, Barale D, Baiguera S, Comin C, Lavorini F, et al. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. *Lancet.* 2014; 383: 238-44.
34. Jones MC, Rueggeberg FA, Cunningham AJ, Faircloth HA, Jana T, Mettenburg D, et al. Biomechanical changes from long-term freezer storage and cellular reduction of tracheal scaffoldings. *Laryngoscope.* 2014; 125: 16-22.
35. Lott DG. What is the future of „organ transplantation“ in the head and neck? *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014; 22: 429-35.
36. Bucheler M, Haisch A. Tissue engineering in otorhinolaryngology. *DNA Cell Biol.* 2003; 22: 549-63.
37. Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Rossi-Ferreira R, Guilherme GRB, Moroz A, et al. Chondrocyte cultures in tri-dimensional scaffold: alginate hydrogel. *Acta Ortop Bras.* 2009; 17: 242-6.
38. Neagu M, Suciu E, Ordodi V, Păunescu V. Human mesenchymal stem cells as basic tools for tissue engineering: isolation and culture. *Rom J Biophys.* 2005; 15: 29-34.
39. Freshney RI. Introduction. In: *Culture of animal cells: a manual of basic technique.* 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2000. p. 1-8.
40. Birchall M, Macchiarini P. Airway transplantation: a debate worth having? *Transplantation.* 2008; 85: 1075-80.

41. Partington L, Mordan NJ, Mason C, Knowles JC, Kim H-W, Lowdell MW, et al. Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds. *Acta Biomater.* 2013; 9: 5251-61.
42. Jungebluth P, Haag JC, Lim ML, Lemon G, Sjoqvist S, Gustafsson Y, et al. Verification of cell viability in bioengineered tissues and organs before clinical transplantation. *Biomaterials.* 2013; 34: 4057-67.
43. Haag J, Baiguera S, Jungebluth P, Barale D, Gaudio CD, Castiglione F, et al. Biomechanical and angiogenic properties of tissue-engineered rat trachea using genipin cross-linked decellularized tissue. *Biomaterials.* 2012; 33: 780-9.
44. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials.* 2012; 33: 1771-81.
45. Badylak SF, Gilbert TW. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol.* 2008; 20: 109-16.
46. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials.* 2009; 30: 3749-56.
47. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006; 27: 3675-83.
48. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011; 32: 3233-43.
49. Macchiarini P. Bioartificial tracheobronchial transplantation – interview with Paolo Macchiarini. *Regen Med.* 2011; 6: 14-5.
50. Bagnato VS. Os fundamentos da luz laser. *Fis Esc.* 2001; 2: 4-9.

51. Bagnato VS, inventor. Uso de LEDs (light emitting diodes) para terapia bioestimuladora. BRPI0200200-0. 23 Jan 2002.
52. Evaristo TC, Alves FCMC, Moroz A, Mion W, Acorci-Valério MJ, Felisbino SL, et al. Light-emitting diode effects on combined decellularization of tracheae. A novel approach to obtain biological scaffolds. *Acta Cir Bras*. 2014; 29: 485-92.
53. Silva THG, Pazetti R, Aoki FG, Cardoso PFG, Valenga MC, Deffune E, et al. Assessment of the mechanics of a tissue-engineered rat trachea in an image-processing environment. *Clinics*. 2014; 69: 500-3.
54. Oliveira KC, Furcin APL, Rodrigues JFGM, Zamarrenho LG, Oliveira BG, Villaverde AB, et al. Avaliação da proliferação celular sob estresse nutricional e aplicação da bioestimulação. [Internet] [acesso 2014 out 30]. Disponível em: www.inicep.univap.br
55. Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg*. 2005; 23: 3-9.
56. Lubart R, Friedman H, Peled I, Grossman N. Light effect on fibroblast proliferation. *Laser Ther*. 1993; 5: 55-7.
57. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989; 56: 691-704.
58. Gur A, Cosut A, Sarac AJ, Cevik R, Nas K, Uyar A. Efficacy of different therapy regimes of low-power laser in painful osteoarthritis of the knee: a double-blind and randomized-controlled trial. *Lasers Surg Med*. 2003; 33: 330-8.
59. Roh JL, Kim DH, Rha KS, Sung MW, Kim KH, Park CI. Benefits and risks of mitomycin use in the traumatized tracheal mucosa. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 136: 459-63.
60. Nakagishi Y, Morimoto Y, Fujita M, Ozeki Y, Maehara T, Kikuchi M. Rabbit model of airway stenosis induced by scraping of the tracheal mucosa. *Laryngoscope*. 2005; 115: 1087-92.

61. Paiva FP, Maffili VV, Santos ACS. Curso de manipulação de animais de laboratório. Ministério da Saúde: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz; 2005.
62. Hysi I, Wurtz A, Zawadzki C, Kipnis E, Jashari R, Hubert T, et al. Immune tolerance of epithelium-denuded-cryopreserved tracheal allograft. *Eur J Cardio-Thorac Surg*. 2014; 45: 180-6.
63. Zar JH. *Biostatistical analysis*, 5ed. New Jersey: Prattice-Hall, 2009. 994p.
64. Hung SH, Su CH, Lee FP, Tseng H. Larynx decellularization: combining freeze-drying and sonication as an effective method. *J Voice*. 2013; 27: 289-94.
65. Liu Y, Nakamura T, Yamamoto Y, Matsumoto K, Sekine T, Ueda H, et al. Immunosupressant-free allotransplantation of the trachea: the antigenicity of tracheal grafts can be reduced by removing the epithelium and mixed glands from the graft by detergent treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000; 120: 108-14.
66. Baiguera S, Del Gaudio C, Jaus MO, Polizzi L, Gonfiotti A, Comin CE. Long-term changes to in vitro preserved bioengineered human trachea and their implications for decellularized tissues. *Biomaterials*. 2012: 3662-72.