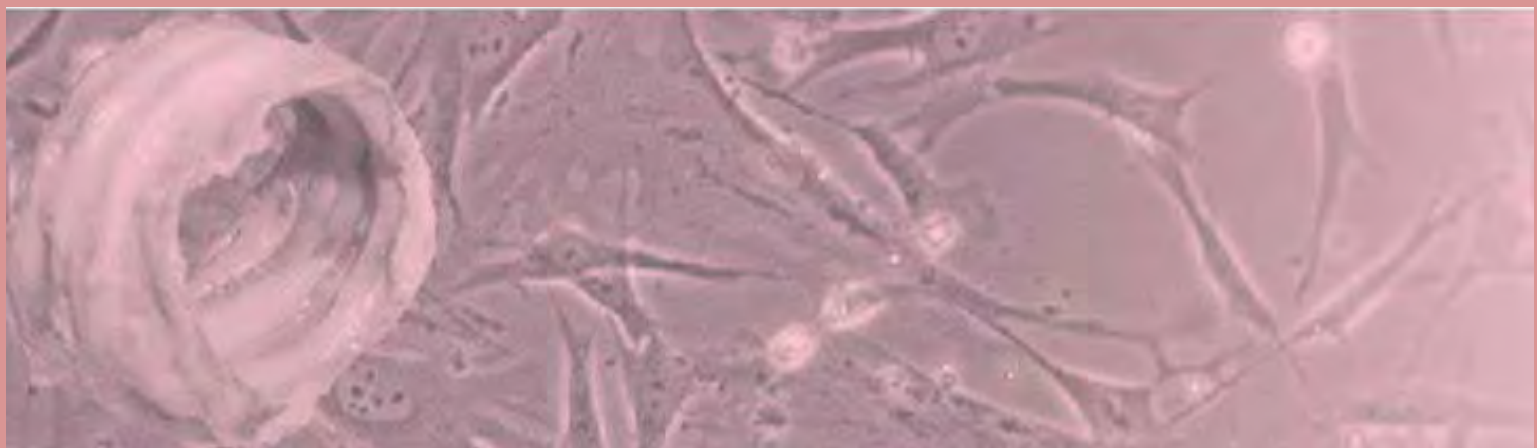


**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
UNESP**

Modelo experimental de neotraquéia em coelho utilizando técnicas de engenharia de tecidos

Thaiane Cristine Evaristo



Botucatu - SP

2011

Thaiane Cristine Evaristo

Modelo experimental de neotraquéia em coelho utilizando técnicas de engenharia de tecidos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica.

Orientadora: Prof. Dra. Elenice Deffune

Co-orientador: Prof. Dr. Raul Lopes Ruiz Júnior

Botucatu - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Evaristo, Thaianne Cristine.

Modelo experimental de neotraquéia emcoelho utilizando técnicas de engenharia de tecidos / Thaianne Cristine Evaristo. – Botucatu, 2011.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientadora: Elenice Deffune

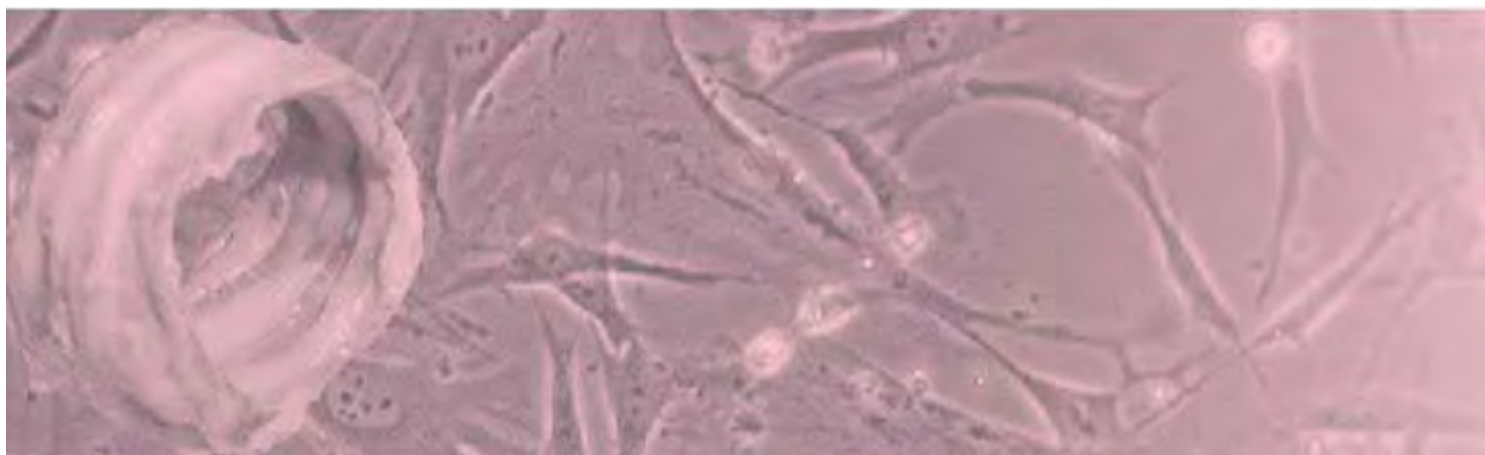
Co-orientador: Raul Lopes Ruiz Júnior

Assunto CAPES: 90400003

1. Biotecnologia. 2. Células-tronco. 3. Traquéia. 4. Regeneração (Biologia).

Palavras-chave: Medicina regenerativa; Traquéia; Engenharia de tecidos; Células-tronco mesenquimais; Descelularização

Dedicatória

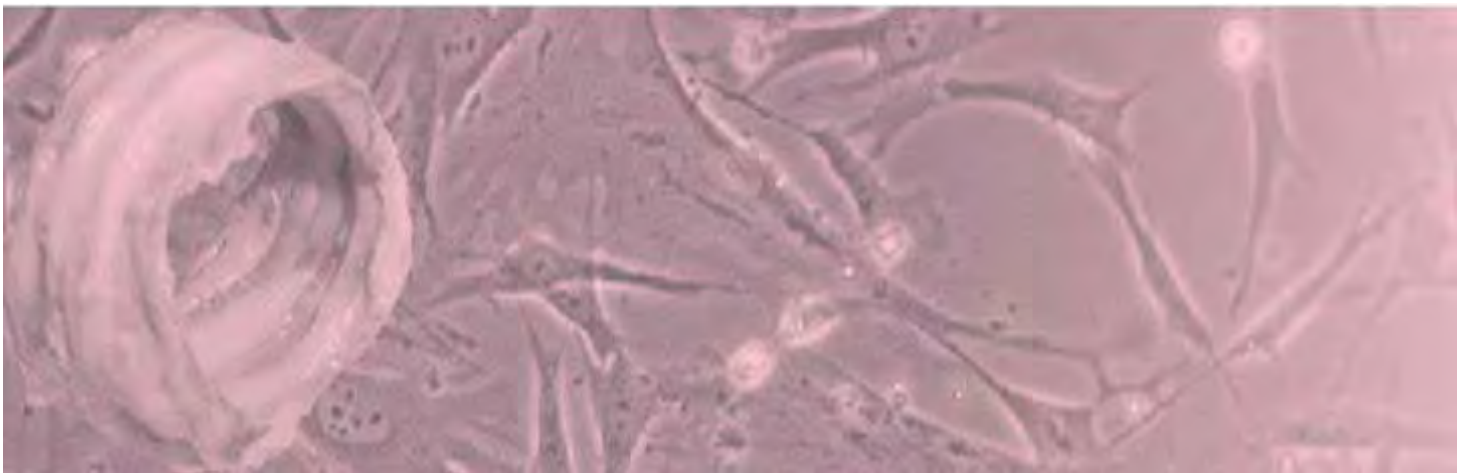


A meus pais e minhas irmãs!

A todos os animais! Não seria possível realizar esse trabalho sem eles.



Agradecimientos



À FAPESP, nosso órgão de fomento, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho. Nº do processo 2010/50155-2 e 2010/07980-2.

À Dra. Elenice Deffune, minha orientadora, pela oportunidade e credibilidade! Tenho imensa admiração por sua genialidade inesgotável, como profissional; e sua bondade irrefutável, como pessoa. Obrigada pelos ensinamentos diários e por promover o meu amadurecimento. Obrigada pela intensa fé na vida! Meu carinho por você é eterno!

Ao Dr. Raul Lopes Ruiz Júnior, meu co-orientador, pela paciência e dedicação! O seu incentivo foi muito importante para a elaboração desse trabalho! Obrigada por estar sempre disposto a ajudar!

À Dra. Rosana Rossi-Ferreira, pela compreensão, carinho e por sempre me receber com um sorriso sincero!

Ao Dr. Sérgio Luis Felisbino, obrigada pela disponibilidade do laboratório e por sempre apresentar idéias novas que contribuíram muito para a conclusão desse trabalho.

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

A toda equipe do Laboratório de Engenharia Celular: Aline Aparecida Del`Vescovo, Aline Garcia Aun, Andrei Moroz, Ângelo Biasi Govone, Aparecida Vitória Gonçalves de Souza, Armando de Mattos Carvalho, Daniel Basseto Jesuino, Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves, Flávia Ribeiro Nogueira, Gabriel Alves do Santos, Henrique de Souza Vieira, Josy Campanhã Vicentini de Oliveira, Juliane de Campos Inácio, Leandro Garcia Alvarado, Mariele Gobo, Michele Janegitz Acorci Valério, Ondina Silvia Cotrim, Priscila Murador, Regiane Marques Castro Olimpio, Regina Avelina de Moraes da Silva e Woner Mion.

À Aline Garcia Aun e Flávia Ribeiro Nogueira, pelo companheirismo e amizade verdadeira! Vamos lá TIME!

Ao Andrei Moroz, pelo importante suporte oferecido durante todo o trabalho.

À Aparecida Vitória Gonçalves de Souza, por seu ânimo inabalável e por sempre estar disposta a ajudar! Por ter me acolhido e me ensinado muito quando cheguei ao laboratório!

À Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves, pela incansável ajuda! Obrigada por estar presente em todas as etapas desse trabalho! Também não posso deixar de agradecer ao seu marido, Jaime de Santana Alves, por sempre nos salvar com as tecnologias da informática!

Ao Henrique de Souza Vieira, pelos conselhos e momentos de descontração!

À Josy Campanhã Vicentini de Oliveira, por sempre me transmitir calma e paciência! Pelo grande auxílio, seja com alguns cálculos, ou na cultura celular.

À Juliane de Campos Inácio, muito obrigada pelo companheirismo, momentos de desabafo e pelas oportunidades!

À Mariele Gobo, pela amizade verdadeira! Obrigada por sempre me ouvir e me aconselhar! Obrigada pelo companheirismo de sempre!

À Michele Janegitz Acorci Valério, ótima companheira de viagem, pela amabilidade e carinho! Sua ajuda foi indispensável com os testes de citometria de fluxo.

À Priscila Murador, pela disponibilidade em ensinar a todos do laboratório, sempre com a mesma vontade e carinho!

À Regiane Marques Castro Olimpio, muito obrigada por sempre ter uma palavra de conforto nos momentos difíceis!

À Regina Avelina de Moraes da Silva, pela amizade, carinho e por contagiar meus dias com a sua alegria. Muito obrigada por sempre ter um sim simpático aos meus pedidos.

Aos meninos da física médica, Woner Mion e Ângelo Biasi Govone, por todo o conhecimento compartilhado.

A todos que fazem falta na nossa equipe: Alexandro Fagner Ferreira, Fátima Regina Guimarães, Gabrielle Reinoldes Bizarria Guilherme, Juliana Ravelli Baldassarre Martins, Paula Scatena e Renan Padron Almeida.

À Juliana Ravelli Baldassarre Martins, por toda a sua generosidade e ajuda! Paula Scatena, por sua serenidade!

Às meninas, Ednéia Aparecida Santos Inácio e Rosana Alves Alcantra, pela limpeza e organização dos laboratórios.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular: Dra. Maria Inês Pardini, Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto, Adriana Camargo Ferrasi, Sílvia Maria Corvino, Rosângela Fernandes Escolástico, Maércio José de Oliveira Alho, Regina Célia Firmino, Lílian da Silva Reis Munhoz, Luis Gustavo Cano Munhoz, Luciana Bonome Zeminian, Aline AkiTanikawa, Sarita Fiorelli Dias Barreto e Natália Picelli.

À Juliana Lara Padovani, obrigada por sempre me apoiar e acreditar em mim! Sua amizade e estímulo foram determinantes para o meu ingresso no mestrado.

A toda equipe do Laboratório de Sorologia: Dra. Rita Maria Saccomano Henriques, Ângela Aparecida Dorini, Amauri Benedito de Paula Assis e Priscila Vieria Lima.

A toda equipe do Laboratório de Citometria de Fluxo: Dr. Paulo Machado de Abreu, Dra. Márjorie de Assis Golim, e Valéria Alves da Silva.

À Cleonice De Piere, Esmite Eloi Faria, Janisse Pena Bispo e Rita de Cássia Alvarado.

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 toda equipe do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

Ao Carlos Roberto Gonçalves Lima e Ednelson Henrique Bianchi, pela amizade, dedicação e por sempre me ajudar com os coelhos. Não teria sido possível a realização desse trabalho sem a contribuição de vocês.

Ao José Lucas de Carvalho, por seu trabalho sempre caprichoso!

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.

Aos meus pais, Odasilo Evaristo e Celestina Scaioni Evaristo, referências de amor, carinho e respeito! Encontro neles 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! Vocês são a razão de tudo!

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

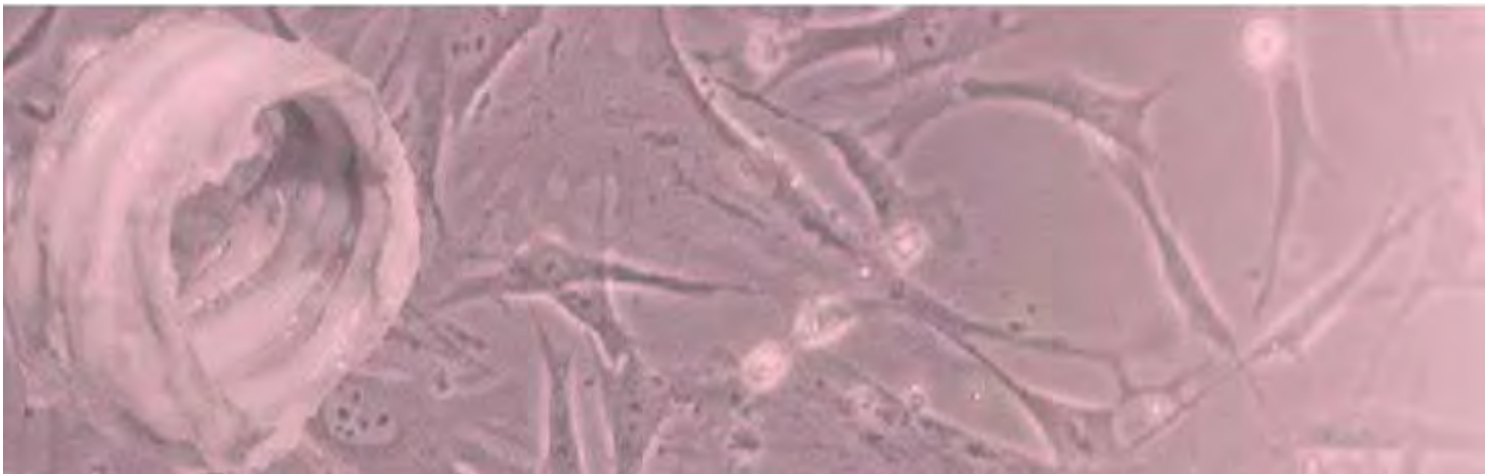
À Cidinha, obrigada por todo carinho e por sempre cuidar de mim! Você já faz parte da minha família.

Ao meu namorado, Inoã Nunes, por sempre ficar do meu lado. Obrigada pelo apoio, ajuda, estímulos e por sempre acreditar em mim! Obrigada por não me deixar desistir e por deixar meus dias mais felizes.

A toda minha família e amigos!

À Deus, por ter me proporcionado mais essa vitória!

Epigrafe



"Se antes de cada ato nosso nos puséssemos a prever todas as conseqüências dele, a pensar nelas a sério, primeiro as imediatas, depois as prováveis, depois as possíveis, depois as imagináveis, não chegaríamos sequer a mover-nos de onde o primeiro pensamento nos tivesse feito parar. Os bons e os maus resultados dos nossos ditos e obras vão-se distribuindo, supõe-se que de uma forma bastante uniforme e equilibrada, por todos os dias do futuro, incluindo aqueles, infindáveis, em que já cá não estaremos para poder comprová-los, para congratular-nos ou pedir perdão, aliás, há quem diga que isso é que é a imortalidade de que tanto se fala."

José Saramago

Lista de Figuras

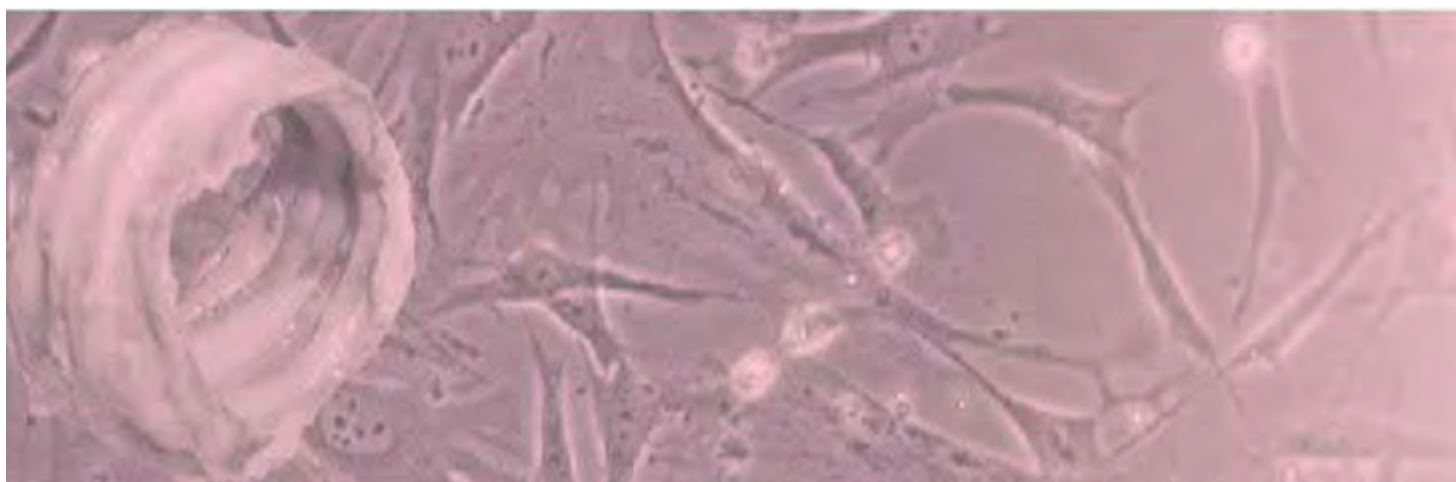


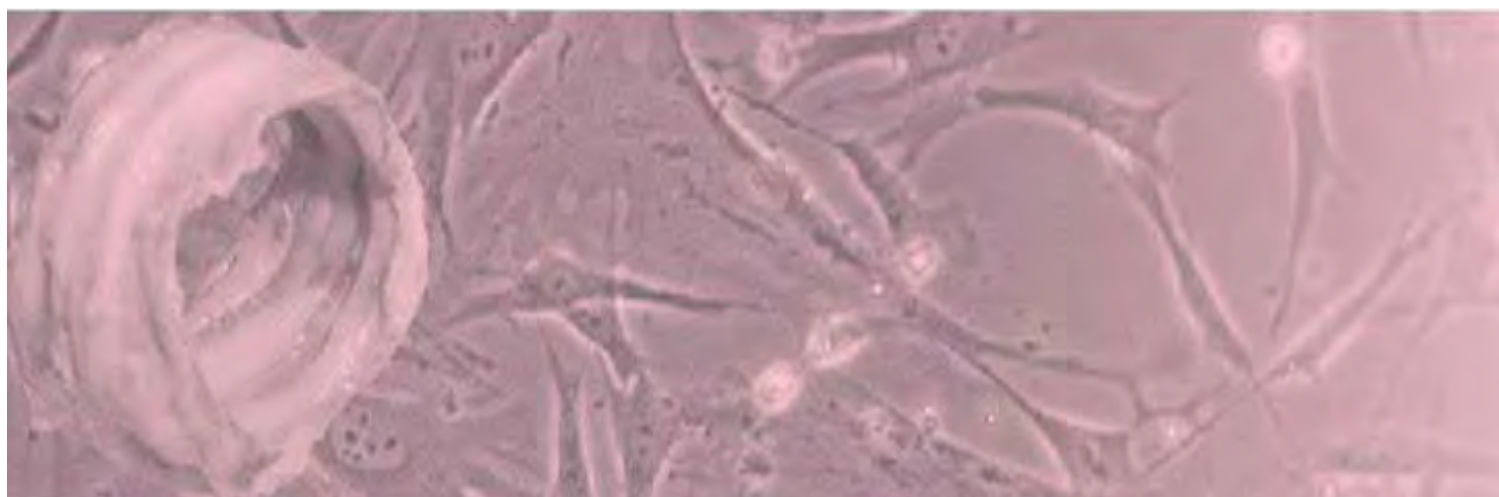
Figura 1. Segmento traqueal.....	24
Figura 2. Traquéia.....	26
Figura 3. Histologia da traquéia.....	26
Figura 4. Gráfico do número de publicações sobre engenharia de tecidos e traquéia no Pubmed de 1990 a 2008.....	28
Figura 5. Gráfico do número de publicações sobre reconstrução de engenharia de tecidos e traquéia no Pubmed de 1990 a 2008.....	28
Figura 6. Diferenciação das células-tronco mesenquimais.....	30
Figura 7. Histologia do tecido cartilaginoso – cartilagem hialina.....	33
Figura 8. Histologia do epitélio respiratório.....	37
Figura 9. <i>Screening</i> da área limpa.....	47
Figura 10. Nicho de CT.....	47
Figura 11. Fluxo laminar do nicho de CT.....	47
Figura 12. Manipulação no fluxo laminar.....	47
Figura 13. Estufa ThermoClass 100®.....	47
Figura 14. Microscópio invertido Zeiss Axiovert®.....	47
Figura 15. C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific).....	51
Figura 16. Amostras sob agitação.....	51
Figura 17. Primeiro protocolo de descelularização de anéis traqueais.....	51
Figura 18. Segundo protocolo de descelularização de anéis traqueais.....	52
Figura 19. Irradiação LED 630nm.....	53
Figura 20. Irradiação LED 475nm.....	53
Figura 21. Terceiro protocolo de descelularização de anéis traqueais.....	54
Figura 22. Terceiro protocolo de descelularização de anéis traqueais.....	54
Figura 23. Terceiro protocolo de descelularização de anéis traqueais.....	55
Figura 24. Quarto protocolo de descelularização de anéis traqueais.....	56
Figura 25. Implante dos segmentos traqueais <i>in vivo</i>	57
Figura 26. Coleta do TA de coelho.....	58
Figura 27. TA.....	58
Figura 28. Dissociação mecânica do TA.....	58
Figura 29. Câmera de Neubauer.....	59
Figura 30. Quadrantes da câmera.....	59
Figura 31. Imagem da câmara em microscopia de luz no aumento de 100X.....	59

Figura 32. Microencapsulação das CTMs em gel de CP.....	62
Figura 33. Frasco T25 cm ² com os fragmentos traqueais e MC apropriado.....	63
Figura 34. Frasco T25 cm ² com os raspados traqueais e MC apropriado.....	64
Figura 35. Traquéia descelularizada com sonda nasogástrica NR12 na sua luz.....	66
Figura 36. Traquéias pré e pós descelularização.....	68
Figura 37. Comparação das traquéias após os tratamentos de descelularização Com diferentes detergentes.....	69
Figura 38. Traquéias pré e pós descelularização com SDS 0,1% por 15 horas.....	70
Figura 39. Histologia do segundo protocolo.....	72
Figura 40. Histologia do segundo protocolo.....	73
Figura 41. Histologia do terceiro protocolo.....	75
Figura 42. Histologia do terceiro protocolo.....	76
Figura 43. Histologia do terceiro protocolo.....	77
Figura 44. Histologia do terceiro protocolo.....	78
Figura 45. Histologia do terceiro protocolo.....	79
Figura 46. Primeira etapa do quarto protocolo.....	80
Figura 47. Segunda etapa do quarto protocolo.....	81
Figura 48. Quadro resumo dos diferentes protocolos de descelularização.....	82
Figura 49. Implante <i>in vivo</i> do anel traqueal tratado com DS 4%.....	85
Figura 50. Histologia do implante tratado com DS 4%. Aumento de 10X.....	86
Figura 51. Histologia do implante tratado com DS 4%. Aumento de 20X.....	86
Figura 52. Histologia do implante tratado com DS 4%. Aumento de 10X.....	86
Figura 53. Histologia do implante tratado com DS 4%. Aumento de 10X.....	86
Figura 54. Implante <i>in vivo</i> do anel traqueal tratado com SDS 2%.....	88
Figura 55. Histologia do implante tratado com SDS 2%. Aumento de 10X.....	89
Figura 56. Histologia do implante tratado com SDS 2%. Aumento de 20X.....	89
Figura 57. Histologia do implante tratado com SDS 2%. Aumento de 20X.....	89
Figura 58. Histologia do implante tratado com SDS 2%. Aumento de 40X.....	89
Figura 59. Implante <i>in vivo</i> do anel traqueal tratado com Triton X – 100 2%.....	90
Figura 60. Histologia do implante tratado com Triton X - 100 2%. Aumento de 10X.....	91
Figura 61. Histologia do implante tratado com Triton X - 100 2%. Aumento de 10X.....	91
Figura 62. Histologia do implante tratado com Triton X - 100 2%. Aumento de 20X.....	91
Figura 63. Histologia do implante tratado com Triton X - 100 2%. Aumento de 20X.....	91

Figura 64. Células iniciais aderidas. Aumento de 5X.....	92
Figura 65. Formação de <i>clusters</i> . Aumento de 5X.....	92
Figura 66. Confluência de 80%. Aumento de 5X.....	92
Figura 67. CTMs aderidas. Aumento de 5X.....	93
Figura 68. CTMs aderidas. Aumento de 10X.....	93
Figura 69. CTMs aderidas. Aumento de 20X.....	93
Figura 70. Resultado da citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti-CD90 (<i>anti-rat</i>) da Caltag Laboratories®.....	94
Figura 71. Resultado da citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti-CD90 (<i>anti-rat</i> crossreactingwithrabbit) - Biolegend®.....	95
Figura 72. Resultado da citometria de fluxo utilizando os anticorpos produzidos <i>home made</i>	96
Figura 73. CTMs cultivadas coradas com o anticorpo anti-vimentina.....	96
Figura 74. Células formando lacunas no gel. Aumento de 20X.....	97
Figura 75. Três células em divisão mitótica, semelhante aos grupos isógenos. Aumento de 20X.	97
Figura 76. Gel com células corado com HE. Aumento de 20X.....	97
Figura 77. Lacunas formadas pelas células no gel. Aumento de 20X.....	97
Figura 78. Células iniciais aderidas. Aumento de 5X.....	98
Figura 79. Células iniciais aderidas. Aumento de 10X.....	98
Figura 80. Células iniciais aderidas. Aumento de 20X.....	99
Figura 81. Células iniciais aderidas. Aumento de 20X.....	99
Figura 82. Epitélio formado. Aumento de 20X.....	99
Figura 83. Epitélio formado. Aumento de 20X.....	99
Figura 84. Epitélio formado. Aumento de 5X.....	100
Figura 85. Epitélio formado. Aumento de 10X.....	100
Figura 86. Epitélio formado. Aumento de 20X.....	100
Figura 87. Epitélio formado. Aumento de 20X.....	100
Figura 88. Epitélio formado. Aumento de 20X.....	100
Figura 89. Epitélio formado. Aumento de 20X.....	100
Figura 90. Contaminação. Aumento de 20X.....	101
Figura 91. Lâmina controle – negativa.....	101
Figura 92. Lâmina positiva.....	101

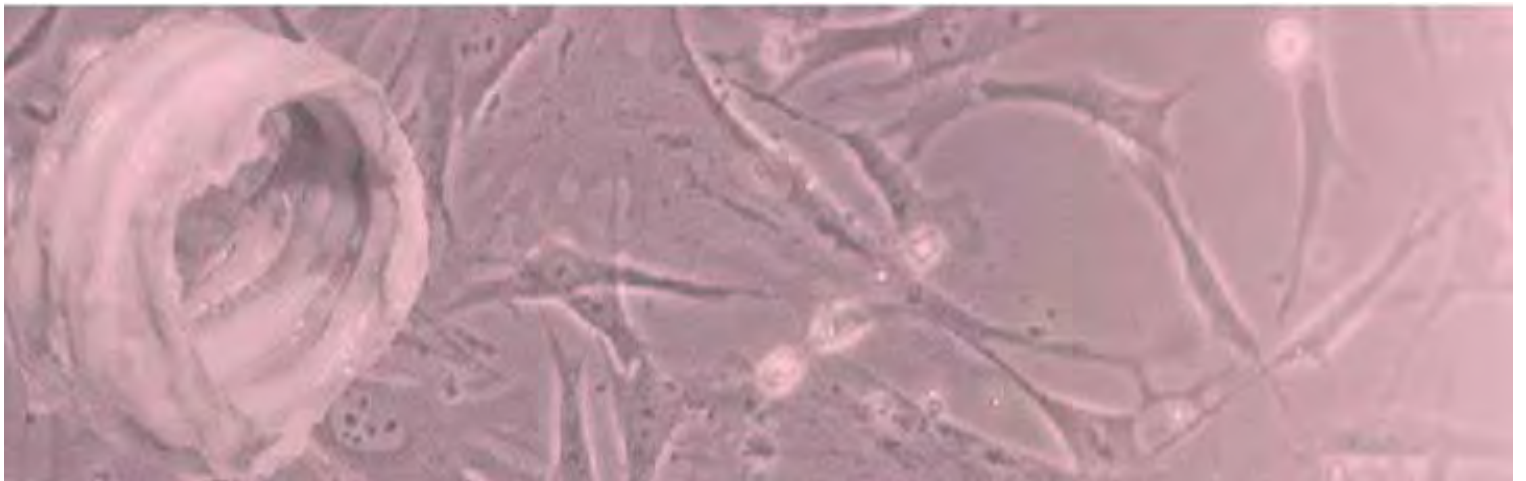
Figura 93. Cluster positivo.....	102
Figura 94. Lâmina positiva.....	102
Figura 95. Aplicação das CERs na face interna da traquéia descelularizada com o Triton X – 100 2%.....	103
Figura 96. Aplicação das CERs na face interna da traquéia descelularizada com o SDS 2%.....	104
Figura 97. Aplicação das CERs na face interna da traquéia descelularizada com o DS 4%.....	105
Figura 98. Etapas de construção do modelo de neotraquéia e seu revestimento interno com epitélio e externo com condrócitos.....	111

Lista de Abreviaturas



3D – três dimensões
AcMm - Anticorpos Monoclonais
CD - *clusters of differentiation*
CERs – Células Epiteliais Respiratórias
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CP – Concentrado de Plaquetas
CT – Células-Tronco
CTMs – Células-Tronco Mesenquimais
DECH - Reação do Enxerto Contra o Hospedeiro
DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DS – Deoxicolato de Sódio
ET – Engenharia Tecidual
FC – Fatores de Crescimento
FGF-2 - Fator de Crescimento de Fibroblastos do tipo 2
GAG - Glicosaminoglicanos
GP – Gel de Plaquetas
HE – Hematoxilina-Eosina
HLA - Antígeno Leucocitário Humano
ITS - Insulina-Transferrina- Ácido Selênio
LASER - *Light Amplified by Stimulated Emission Radiation*
LED - *Light Emitting Diode*
MC – Meio de Cultura
MHC - Maior Complexo de Histocompatibilidade
NH₄OH - Hidróxido de Amônio
PBS - Solução Salina Tamponada
PDGF - Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
PM - Pressão Mecânica
PRP – Plasma Rico em Plaquetas
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SFB – Soro Fetal Bovino
TA – Tecido Adiposo
TGF-β - Fator de Crescimento Transformante

Resumos



Evaristo, TC. Modelo experimental de neotraquéia em coelho utilizando técnicas de engenharia de tecidos. 2011. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Unesp.

Resumo

Injúrias traqueais são problemas na prática cirúrgica, pois apresentam dificuldades no tratamento. Atualmente, a engenharia tecidual (ET) é a única técnica para substituição traqueal que fornece promessa real. O uso de suportes naturais apresenta vantagens biológicas, mas faz-se necessário a descclularização desses materiais. Assim, o objetivo do presente trabalho é a descclularização de traquéias, com posterior aplicação das células epiteliais respiratórias (CERs) na face interna das traquéias descclularizadas; bem como, a diferenciação das células-tronco mesenquimais (CTMs) em condrócitos. O presente estudo foi efetuado com modelo em coelhos da raça Botucatu, pesando entre 3,0 e 4,0kg, provenientes do Biotério Central da Unesp. A utilização desses animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal. Foram realizados 54 diferentes protocolos de descclularização, que envolvem métodos físicos (congelamento, agitação, pressão mecânica-PM, irradiação eletromagnética não ionizante-LED 475nm e LED 630nm), associados com métodos químicos (Triton X-100, SDS e DS) e enzimáticos (DNase e RNase). Paralelamente, também foi realizado cultura celular das CTMs, com posterior diferenciação em condrócitos. A expansão *ex vivo* das CERs foi realizada por diferentes protocolos: fragmentos traqueais, lavado traqueal, raspado traqueal, *punch* dermatológico de 2mm e digestão por tripsina. As células obtidas foram aplicadas na face interna das traquéias descclularizadas. Com relação a PM, não se observa contribuição nos protocolos de descclularização. A irradiação com LED 475nm provoca remoção das células condrogênicas; já a irradiação com LED 630nm provoca aumento da proliferação celular. Sob o critério custo-benefício, a utilização dos processos enzimáticos não foi validada. Em relação aos detergentes, ocorre destruição superior da matriz extracelular das traquéias tratadas com SDS, quando comparada com as tratadas com DS e Triton X – 100. Além disso, as traquéias tratadas com SDS apresentam uma toxicidade residual do detergente que inibe a re-população das CERs. Foi caracterizada cultura de CTMs através de análises de citometria de fluxo e imunohistoquímica. A cultura condrogênica foi caracterizada através de análises histológicas. Os protocolos validados para expansão das CERs foram fragmentos traqueais e raspado traqueal, e as mesmas foram caracterizadas através de análise imunohistoquímica. O protocolo de descclularização da traquéia validado utiliza: congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm + irradiação do LED com comprimento de onda de 475nm +/- 20 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 30 minutos de exposição + detergente DS 4% durante 48 horas. Este mesmo protocolo também foi validado para a aplicação das CERs na face interna da traquéia descclularizada.

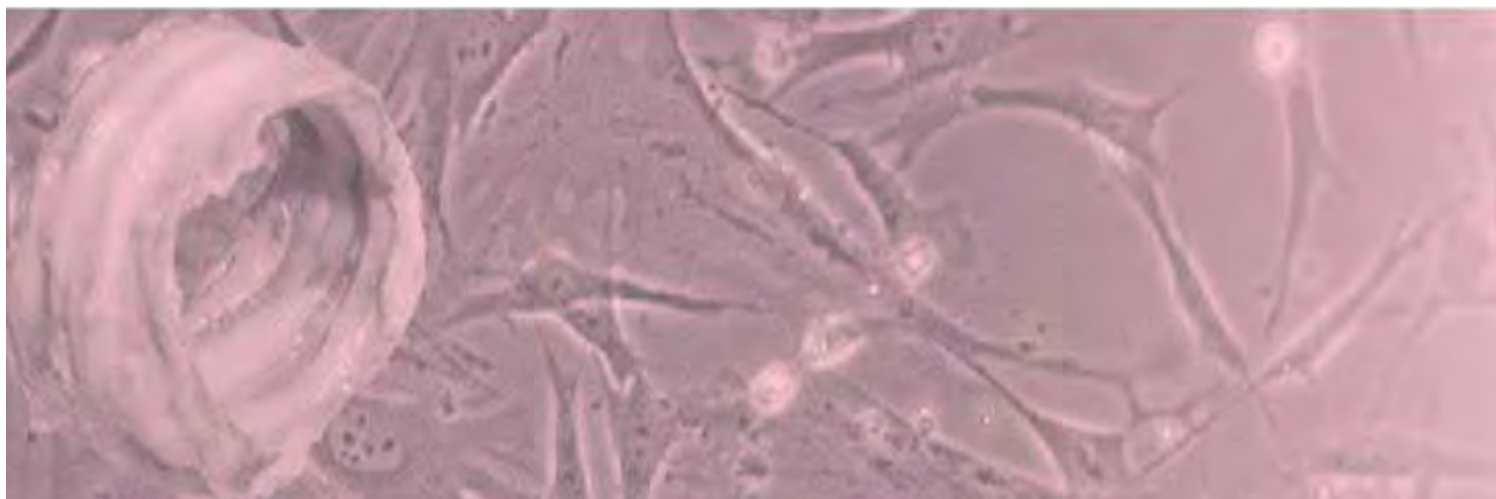
Palavras-chave: regeneração; traquéia; células-tronco mesenquimais.

Abstract

Tracheal injuries are a problem in surgical practice once they present difficulties in their treatment. Nowadays, tissue engineering (TE) is the only technique for tracheal replacement that provides real promise. There are biological benefits in using natural scaffolds, but the decellularization of such materials is necessary. Thus, the objective of this study is tracheal decellularization with subsequent application of respiratory epithelial cells (RECs) on the inner side of the decellularized cells, as well as the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) into chondrocytes. This study was carried out with model in Botucatu rabbits weighing between 3.0 to 4.0kg from the Animal Colony at Unesp. The use of such animals was approved by the Ethics Committee of Animal Experiments. Fifty-four different decellularization protocols were used; they involved physical methods (freezing, agitation, mechanical pressure - MP, non-ionizing electromagnetic irradiation - LED 475nm and LED 630nm), associated with chemical methods (Triton X-100, SDS and DS) and enzymatic ones (DNase and RNase). At the same time, a cell culture of the MSCs was done as well, with subsequent differentiation into chondrocytes. The *ex vivo* expansion of RECs was performed with different protocols: tracheal fragments, tracheal wash, scraped trachea, 2mm dermatological punch, and trypsin digestion. The cells obtained were applied to the inner side of the decellularized tracheae. Regarding MP, no contribution to the decellularization protocols is observed. Irradiation with LED 475nm causes the removal of chondrogenic cells whereas the irradiation with LED 630nm increases cell proliferation. Under the cost-benefit criterion, the use of enzymatic processes was not validated. As for the detergents, there is more destruction of the extracellular matrix of the tracheae treated with SDS when compared to those treated with DS and Triton X – 100. Besides, the tracheae treated with SDS show a residual toxicity of the detergent that inhibits the re-population of RECs. The MSC culture was categorized through an analysis of flow cytometry and an imunohistochemical analysis. The chondrogenic culture was characterized by histological analyses. The protocols validated to the expansion of RECs were tracheal fragments and scraped trachea, both characterized by imunohistochemical analysis. The trachea decellularization protocol uses: freeze/thaw + agitation 180 rpm + LED irradiation with wavelength of 475nm +/- 20 nm in the dose of 90 J/cm² adding up to 30 minutes of exposure + 4% DS detergent for 48 hours. This very protocol was also validated to the application of RECs on the inner side of the decellularized trachea.

Key words: reconstruction; trachea; mesenchymal stem cells.

Sumário



Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas

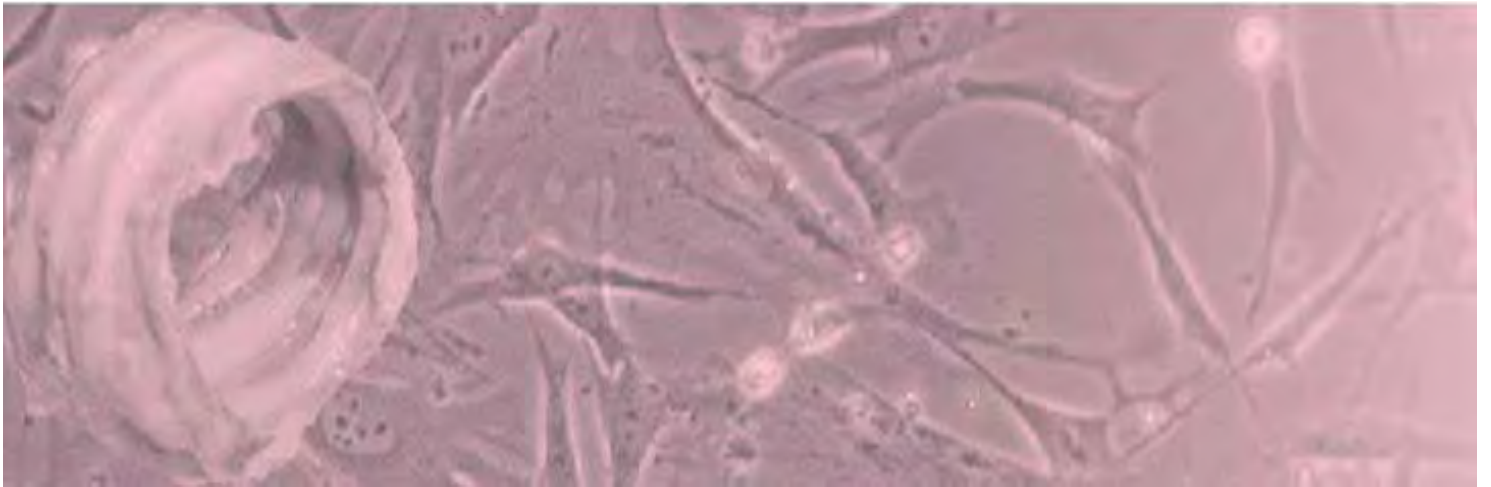
Resumo

Abstract

I – Introdução.....	24
I.1 - Aspectos gerais.....	24
I.2 - Células-Tronco.....	29
I.3 - Tecido Cartilaginoso.....	31
I.4 - Lesões de Cartilagem.....	33
I.5 - Engenharia Celular e Crescimento de Cartilagem.....	34
I.6 - Epitélio respiratório.....	36
I.7 - Sistema de histocompatibilidade.....	37
I.8 - Descelularização da Traquéia.....	38
I.9 - Laser e LED.....	42
I.10 - Modelos Animais.....	43
II – Objetivos.....	45
II.1 - Objetivo Geral.....	45
II.2 - Objetivos Específicos	45
III – Materiais e Métodos.....	47
IV – Resultados e Discussões.....	68
V – Conclusões.....	107
VI – Perspectivas.....	109
VII – Referências Bibliográficas.....	113

Anexos

Introdução



I – Introdução

I.1- Aspectos gerais

Transplantes traqueais têm sido assuntos de pesquisas por mais de quarenta anos sem sucesso.¹ Os grandes defeitos traqueais são problemas na prática cirúrgica, pois apresentam dificuldades para o tratamento.^{1,2,3} Ressecções da traquéia com reparo primário são as únicas opções de tratamento dos pacientes que apresentam lesões benignas ou malignas.^{1,4} Nas ressecções traqueais maiores que 30% da extensão do órgão em crianças ou 6 centímetros em adultos, as complicações operatórias são mais frequentes e necessitam de manobras complexas para o reparo.^{1,2,4} Dessa maneira, a substituição de seções longas só será possível se um tecido traqueal funcional e seguro for desenvolvido.^{1,4}



Figura 1. Segmento traqueal.

Fonte: <http://medcultura.blogspot.com/2008/11/primeiro-transplante-de-traqueia-do.html>

O transplante traqueal pode ser uma opção terapêutica nessa situação, mas sua aplicação clínica é limitada.² Transplantes de órgãos podem melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevivência de muitos pacientes, porém a falta de doadores de órgãos é evidente, assim a sobrevivência dos pacientes com falha terminal de qualquer órgão é muito arriscada.⁵

Algumas técnicas para substituição da traquéia; incluindo transplantes de auto-enxertos, alo-enxertos e materiais protéticos têm sido testadas clinicamente com sucesso limitado devido às infecções bacterianas, falha do material e complicações imunológicas.³ As complicações imunológicas ocorrem quando se insere um implante em um organismo, disparando uma reação tecidual em decorrência de incompatibilidade, já que se trata de um corpo estranho ao organismo.⁵ Uma consequência não favorável pode envolver formação de uma cápsula de tecido conectivo firme ao redor do implante ou uma inflamação crônica.⁵

Tecido originário do próprio paciente seria sempre o ideal para garantir segurança imunológica em função da minimização da reação do enxerto contra o hospedeiro (DECH),

reação comprometedora da viabilidade de qualquer transplante.^{5,6} No entanto, a disponibilidade de tecido autólogo para reparo de defeitos extensos apresenta disponibilidade limitada e insuficiente, dificuldade esta que vem encontrando soluções com as técnicas de cultura celular e engenharia de tecido (ET).⁵ O interesse na ET vem crescendo já que a regeneração de células, tecidos e órgãos é um dos maiores desafios para a medicina moderna.⁵

A ET consiste na regeneração de órgãos e tecidos, através do recrutamento de tecidos do paciente, dissociados em células que são cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, para serem reinsertados no paciente.^{5,7,8,9,10} Vários problemas devem ser resolvidos antes de usar ET em larga escala na prática clínica; isso inclui questões a respeito da fonte celular adequada, da identificação de um suporte para cada tipo de tecido de interesse, e a melhora das condições da cultura para garantir a viabilidade e as propriedades físico-químicas comparáveis com as do órgão nativo.^{5,7,8} A ET abre novos caminhos para gerar transplantes funcionais e vitais.^{4,10}

Pesquisadores têm trabalhado por décadas no cultivo de células e tecidos fora do organismo humano para a geração de tecidos do próprio paciente em quantidade e qualidade necessárias para a terapêutica.⁵ Desde meados da década de 80, a engenharia celular é considerada um campo de pesquisa independente com uma cooperação interdisciplinar entre os especialistas.⁵

Experimentos anteriores pré-clínicos das vias respiratórias são muito longos e complexos para aplicação clínica na rotina ou dependem de matrizes não biológicas.⁶ Entretanto, a ET dessas vias é a única técnica de muitas tentativas para substituição traqueal que parece fornecer alguma promessa real.^{10,11} São aplicados princípios de engenharia e ciência para criar substitutos biológicos com suportes biodegradáveis e células autólogas que restauram, mantêm ou melhoram as funções teciduais.^{10,11} Com um método inovador, a ET já tornou possível a substituição da traquéia em paciente que apresentava estenose traqueobrônquica tendo propiciado melhora na qualidade de vida.¹ Os resultados mostraram que uma via respiratória gerada por ET pode ser construída com propriedades mecânicas que permitem um funcionamento normal e livre dos riscos de rejeição.¹ Assim prova-se a evidência de que células autólogas combinadas com biomateriais apropriados podem fornecer, no futuro, soluções funcionais e bem-sucedidas para sérios distúrbios clínicos.¹

A traquéia pode ser considerada como um tubo fino reforçado de cartilagem que conecta a laringe ao brônquio principal.^{12,13}



Figura 2. Traquéia.

Fonte: http://www.webciencia.com/11_08traqueia.htm

O primórdio respiratório é indicado, aproximadamente no 28º dia, por um sulco mediano na extremidade caudal da parede ventral da faringe primitiva, a fenda laringotraqueal.^{14,15} O desenvolvimento embriológico da traquéia ocorre porque o endoderma que reveste o tubo laringotraqueal distal à laringe se diferencia em epitélio, nas glândulas da traquéia e no epitélio pulmonar.^{14,15} A cartilagem, o tecido conjuntivo e os músculos são derivados do mesênquima esplâncnico que circunda esse tubo.^{14,15} No final da quarta semana, a fenda já se evaginou para formar um divertículo laringotraqueal saculiforme (broto pulmonar), localizado na região ventral da porção caudal do intestino anterior.¹⁴ À medida que este divertículo se alonga, ele é envolvido pelo mesênquima esplâncnico e sua extremidade distal se dilata para formar um broto traqueal de forma globular.¹⁴

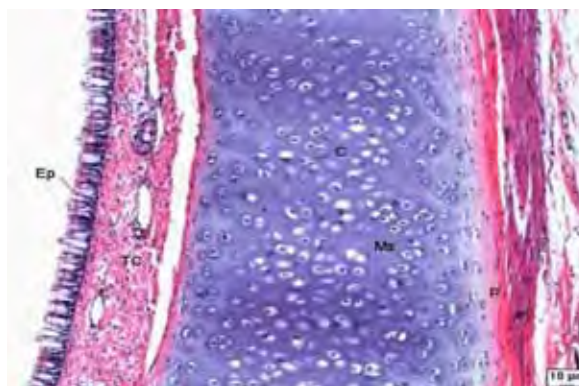


Figura 3. Histologia da traquéia.

Fonte: <http://www.pucrs.br/fabio/histologia/atlasvirtual/maxim/traqueia-38a11.htm>

A luz do tubo traqueal é coberta por um epitélio respiratório ciliado, e como todo tecido epitelial, o da traquéia é altamente reativo a lesões, induzindo a iniciação do processo

de cicatrização das células.¹² Quando esse processo não para ou quando ocorre a formação de cicatriz, a luz da traquéia se estreita e a passagem do ar pode ser obstruída.¹² No caso da traquéia ser afetada por estenose causada por tumores, queimaduras, traumas ou injúrias pós-entubação, deve-se realizar uma ressecção do segmento afetado a fim de evitar a obstrução ao fluxo aéreo.¹² Entretanto, esse processo interrompe a continuidade do epitélio e isso dificulta o transporte das micro partículas; além de apresentar desvantagens no processo de cicatrização, já que a capacidade regenerativa da cartilagem é baixa.^{3,12,16}

No caso de ressecções pequenas, a continuidade pode ser restaurada através de anastomoses, mas quando grandes ressecções são necessárias (por exemplo, mais de 50%), o defeito deve ser tratado com um implante ou um método de reconstrução, porque não é possível restaurar a continuidade com as suturas do processo de anastomose.¹² A reconstrução traqueal vem acompanhada de algumas complicações; tais como estenose, rejeição imune, necrose isquêmica, infecção e hemorragia.¹²

A traquéia é um tecido complexo, formado por condrócitos, células epiteliais respiratórias, matriz de colágeno e vasos sanguíneos.¹² Os condrócitos podem ser coletados das cartilagens das orelhas, septos nasais ou articulações; as células epiteliais podem ser coletadas da mucosa nasal e dos brônquios; e 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.¹² A cartilagem do septo nasal é uma fonte potencial para estudos nessa área; já que, além, da cartilagem hialina do septo nasal ser muito semelhante a cartilagem da traquéia, ela também é fonte para células epiteliais e tecidos conectivos.^{5,6,17} Porém, elas crescem tão rápido, que a apoptose ocorre em passagens precoces, quando compara-se com as células bronquiais.¹

A cultura separada de vários tipos celulares diferentes *in vitro* já mostrou ser um sucesso; e algumas combinações de cartilagem ou tecido fibroso e células epiteliais da traquéia já foram reportadas, mas a incorporação de vasos arteriais e venosos ainda é um desafio, já que a vascularização da traquéia nativa é complexa.¹² Oxigenação e nutrição inadequadas *in vitro* são fatores limitantes para a fabricação de tecidos complexos.⁵ Além disso, a traquéia construída por ET deve ser lateralmente rígida para prevenir o colapso durante a inspiração e longitudinalmente flexível para permitir os movimentos do pescoço.¹²

As preocupações com a reconstrução da traquéia são crescentes nos últimos anos. Esta informação é facilmente identificada ao se analisarem as publicações no Pubmed

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com a pesquisa da palavra chave *tissue engineering trachea*. A figura 4 evidencia este interesse.

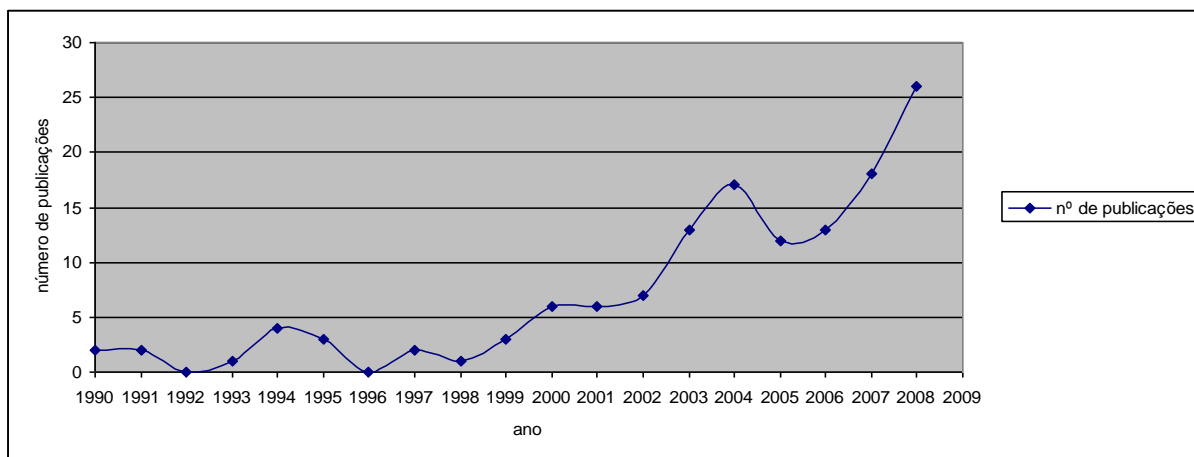


Figura 4. Gráfico do número de publicações sobre engenharia de tecidos e traquéia no Pubmed de 1990 a 2008.

Durante o período compreendido entre 1990 e dezembro de 2008, 136 publicações foram indexadas no Pubmed sobre o tema acima. Neste mesmo intervalo, 850 artigos foram publicados com a palavra-chave: *trachea reconstruction* (figura 5). O padrão de distribuição de artigos é relativamente homogêneo com alguns pontos fora da curva, o que mostra a preocupação com o tipo de problema.

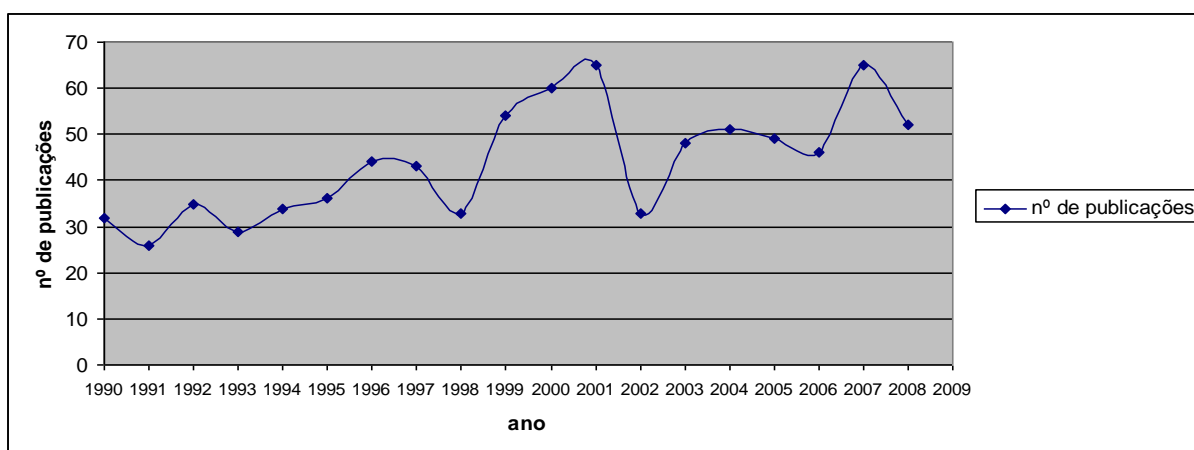


Figura 5. Gráfico do número de publicações sobre reconstrução de engenharia de tecidos e traquéia no Pubmed de 1990 a 2008.

Frente a estes 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.

O conhecimento de que a diferenciação de célula-tronco é possível, tornou a realidade da ET mais promissora. Dentro desta ótica faremos uma revisão sobre o assunto.

I.2 – Células-Tronco

As células-tronco (CT) foram primeiramente descritas por Friedenstein et al, em 1966.^{7,18} Descobriram que elas aderem a placas de cultura, assemelham-se a fibroblastos *in vitro* e formam colônias.⁷ Essas são células imaturas com duas características essenciais: elas são capazes de auto-replicação e elas são capazes de promover o surgimento de vários tipos de células maduras do organismo; além disso, na cultura, elas possuem uma viabilidade notável e capacidade proliferativa.⁸ Todas essas características fazem delas a fonte celular favorita para a ET.^{8,19,20}

A medula óssea possui células-tronco hematopoiéticas adultas, que originam progenitores linfóides e mielóides, e as células-tronco não-hematopoiéticas adultas que são precursoras de tecidos não-hematopoiéticos; entre essas últimas, tem as células progenitoras endoteliais, células-tronco mesenquimais (CTMs), células progenitoras adultas multipotentes, células MIAMI e células-tronco muito pequenas semelhantes às embrionárias.¹⁹

As CTMs ou unidades formadoras de colônias fibroblásticas são células-tronco não-hematopoiéticas multipotentes que se aderem a placas de cultura.^{7,18,22} São células que podem ser isoladas de medula óssea, de tecido adiposo, de vários tecidos fetais e numerosos outros tecidos de adultos.²⁰ As vantagens da coleta das CTMs do tecido adiposo; como: procedimento cirúrgico simples, aliado à confirmação do sucesso destas células em comparação com as de medula óssea, quanto à capacidade de diferenciação, frequência de colônias obtidas e morfologia, conferem as CTMs derivadas do tecido adiposo capacidade de serem utilizadas em medicina regenerativa.¹⁹

O interesse neste tipo celular cresceu exponencialmente nos últimos anos devido ao seu grande potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos lesados, como demonstrado em inúmeros estudos pré-clínicos e clínicos.¹⁸ Em um meio de cultura celular com fatores de crescimento e de diferenciação específicos, as CTMs podem originar várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo, neurônios e estroma medular.^{7,8,18,19}

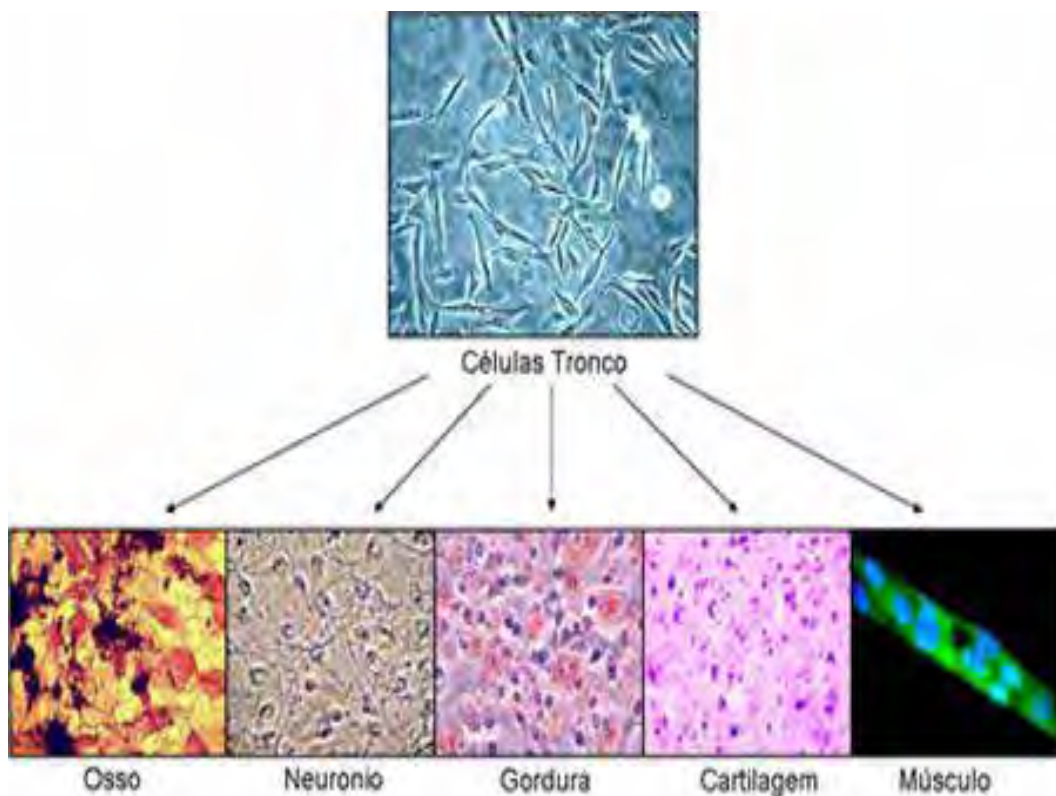


Figura 6. Diferenciação das células-tronco mesenquimais.
 Fonte: <http://www.geneticaplicada.com.br/tecnologia.php>

As células-tronco hematopoiéticas e não-hematopoiéticas têm diferenças relevantes quanto ao fenótipo, com diferentes antígenos de superfície de membrana, os *clusters of differentiation* (CDs).^{19,23} As CTMs possuem os marcadores CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD166, e também apresentam as moléculas de adesão CD29, CD106, CD166, e não possuem os marcadores hematopoiéticos CD11, CD14, CD34 e CD45 e nem o marcador endotelial CD31.^{19,20,23} Elas também são negativas para CD40, CD80 e CD86.^{20,23} A expressão variável de muitos marcadores ocorre devido a variação da fonte tecidual, o método de isolamento e cultura, e diferentes espécies.²³

A Sociedade Internacional para Terapia Celular estabeleceu critérios para que uma célula possa ser definida como CTM: deve ser aderente ao frasco de cultura durante várias passagens, deve ser capaz de se diferenciar em cartilagem, tecido ósseo e tecido adiposo, deve expressar CD73, CD90 e CD105, não deve expressar c-kit, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α e os antígenos leucocitários humanos (HLA-DR).¹⁹

Para usar essas células na medicina regenerativa, devemos isolá-las e proliferá-las sem a perda da capacidade de pluripotência e de proliferação no estado de diferenciação.⁸ Muitos

estudos têm isolado as CTMs e tem controlado *in vitro* a sua diferenciação em tecido cartilaginoso e osso utilizando fatores de crescimento específicos, com o objetivo de usar esta nova tecnologia no reparo de tecidos de origem mesenquimal lesados.⁷ O meio de cultura Knockout DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) é empregado como uma alternativa para o isolamento mais rápido das CTMs em cultura, principalmente quando se deseja diferenciá-las em outros tecidos de linhagem mesenquimal, como a cartilagem.⁷

Diferenciação é o processo que leva à expressão de características fenotípicas de células maduras *in vivo*.²⁴ Não se pode dizer que esse processo é completo ou irreversível.²⁴ A diferenciação ocorre através de duas vias principais no organismo vivo: constante renovação tecidual e em resposta à traumas na cicatrização do tecido.²⁴ As condições necessárias para a indução de um processo de diferenciação são alta densidade celular, aumento das interações célula-célula e célula-matriz e presença de vários fatores de diferenciação.²⁵ Está claro que se fornecer condições corretas e apropriadas para o meio-ambiente das células que estão em cultura, um processo de diferenciação parcial ou até mesmo completo poderá ocorrer.²⁴

I.3 - Tecido cartilaginoso

O tecido cartilaginoso é um tipo especializado de tecido conjuntivo de consistência rígida, avascular, desprovido também de vasos linfáticos e nervos.^{7,26} Desempenha a função de suporte de tecidos moles, reveste superfícies articulares, onde absorve choques, facilita o deslizamento dos ossos nas articulações e apresenta papel importante no crescimento dos ossos longos.^{19,26,27} O tecido cartilaginoso contém células, os condrócitos, e abundante matriz extracelular; e suas funções dependem principalmente da estrutura dessa matriz, que é constituída por colágeno ou colágeno mais elastina, em associação com macromoléculas de proteoglicanos (proteínas + glicosaminoglicanos), ácido hialurônico e diversas glicoproteínas.²⁶

Conforme as necessidades funcionais do organismo, as cartilagens se diferenciam em três tipos: cartilagem hialina, que é a mais comum e cuja matriz possui delicadas fibrilas constituídas principalmente de colágeno tipo II (superfícies articulares da maioria dos ossos, anéis da traquéia e nas cartilagens laríngea, costal e nasal); cartilagem elástica, que possui poucas fibrilas de colágeno tipo II e abundantes fibras elásticas (epiglote, orelha externa, conduto auditivo e algumas das menores cartilagens da laringe); e cartilagem fibrosa, que

apresenta matriz constituída preponderantemente por fibras de colágeno tipo I (algumas sínfises, tuba auditiva, discos intervertebrais e certas áreas de inserção do tendão no osso).^{26,27}

As cartilagens, exceto as articulares e as fibrosas, são envolvidas pelo pericôndrio, que contém vasos sanguíneos e linfáticos e nervos.²⁶ A parte mais superficial do pericôndrio é formada por fibras de colágeno tipo I (camada fibrosa); porém à medida que se aproxima da cartilagem, o número de células aumenta gradativamente (camada condrogênica); essas células são os condroblastos e as células condrogênicas.^{26,27} Além de ser uma fonte de novos condrócitos para o crescimento, o pericôndrio é responsável pela nutrição, oxigenação e eliminação dos refugos metabólicos da cartilagem.²⁶

A cartilagem hialina é a mais freqüente no corpo humano; no adulto, encontramos principalmente na parede das fossas nasais, traquéia e brônquios, na extremidade ventral das costelas e recobrando as superfícies articulares dos ossos longos.²⁶ A matriz desse tipo de cartilagem é flexível então proporciona um meio de difusão para os nutrientes e excretas que chegam e saem do pericôndrio e seus condrócitos.²⁷ Ela é constituída de fibrilas de colágeno tipo II associadas ao ácido hialurônico, proteoglicanos e glicoproteínas.^{20,23} Os componentes glicosaminoglicanos (GAG) das proteoglicanas são *hialuronam*, condroitim-4-sulfatado, condroitim-6-sulfatado e queratam sulfatado.^{26,27,28} Além disso, encontra-se nessas matrizes dezenas de proteínas e glicoproteínas não-colagênicas, sendo que a maioria delas tem função de adesão entre a célula e a matriz e de interação entre os diferentes componentes da matriz.²⁸ O colágeno mais abundante nas cartilagens é o tipo II (85-90% do total de colágeno), que é o principal componente das fibrilas e é altamente específico, por isso pode ser considerado o maior marcador da diferenciação dos condrócitos.²⁸

A histogênese da cartilagem hialina ocorre a partir do mesênquima, e aparece pela primeira vez nos embriões durante a quinta semana.^{26,28,29,30} Em áreas onde a cartilagem deverá se desenvolver, o mesênquima se condensa para formar centros de formação de cartilagem.^{29,30} Outra modificação observada consiste no arredondamento das células mesenquimatosas, que retraem seus prolongamentos e, multiplicando-se rapidamente formam aglomerados celulares e essas células recebem o nome de condroblastos.^{26,30} Em seguida, começa a síntese da matriz, o que afasta os condroblastos uns dos outros; e finalmente, a multiplicação mitótica destas células dá origem aos grupos de condrócitos.^{26,28,29,30} Os condrócitos periféricos da cartilagem hialina apresentam forma alongada; porém, mais profundamente, são arredondados e aparecem em grupos de até oito células, chamados grupos isógenos, porque suas células são originadas de um único condroblasto.²⁶

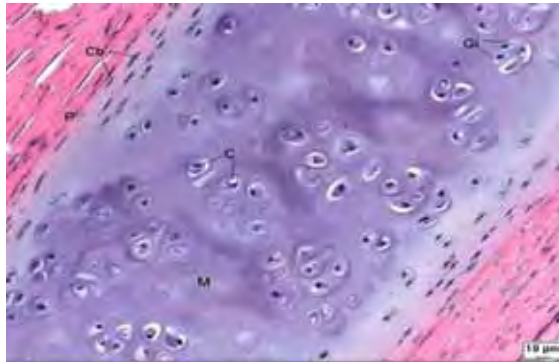


Figura 7. Histologia do tecido cartilaginoso – cartilagem hialina.

Fonte: <http://www.pucrs.br/fabio/histologia/atlasvirtual/maxim/cart-hial-resp-12a1.htm>

Os condrócitos são células especializadas que produzem e mantêm a matriz extracelular das cartilagens.²⁸ São células altamente diferenciadas, construtoras solitárias de um tecido único, o qual precisa ser ao mesmo tempo firme e maleável.²⁸ A estrutura dos condrócitos é relativamente simples, entretanto a matriz extracelular produzida por eles é complexa e única em estrutura, composição e organização.²⁸

I.4 - Lesões de Cartilagem

A cartilagem que sofre lesão não se regenera bem, salvo em crianças.^{17,26} Quando ocorre lesão de uma cartilagem, células do pericôndrio invadem a área destruída e dão origem a tecido cartilaginoso que repara a lesão, mas quando a área é extensa, ou mesmo, algumas vezes, em lesões pequenas, o pericôndrio, em vez de formar novo tecido cartilaginoso, forma uma cicatriz de tecido conjuntivo denso.²⁶

Estima-se que cerca de um milhão de pessoas por ano necessitem de tratamento relacionado a defeitos em cartilagens; e os estudos têm demonstrado que há um declínio na atividade de crescimento da cartilagem com o aumento da idade.⁷

A regeneração da cartilagem é uma necessidade frequente nas cirurgias de cabeça e pescoço, mas os tecidos cartilagosos apresentam uma capacidade regenerativa limitada, como já foi dito antes; dessa forma, o reparo das lesões da cartilagem continua um desafio para os clínicos.^{3,17} No caso de dano a cartilagem, transplante é uma das poucas soluções clínicas disponíveis atualmente; contudo, a falta de doadores de órgãos limita essa probabilidade.⁸ A ET pode ser a solução para esse problema.¹

I.5 – Engenharia celular e crescimento de cartilagem

Depois de escolher a fonte celular para a ET, inicia-se com o desenvolvimento, seleção e processamento dos suportes para cultura celular, que podem ser polímeros naturais (colágeno, agarose, alginato, fibrina, hialuronato, gelatina e glicosaminoglicana) e suportes de polímeros sintéticos degradáveis.^{5,7,17} A ET cultiva as células do próprio paciente em suportes biodegradáveis e absorvíveis na forma do órgão a ser substituído, assim conhecimentos específicos dos mecanismos envolvidos na degradação do suporte apresentam importância decisiva para a ET, já que produtos resultantes da degradação ou mudanças no pH podem enfraquecer drasticamente a vitalidade e proliferação celular.⁵

Podemos usar vários sistemas de cultura para a expansão dos condrócitos: cultura em sistema tridimensional em esponjas de colágeno, fibrina, gel de agarose, hidrogel de alginato, quitosana e outros.⁷

O suporte deverá ser biocompatível de maneira que minimize o máximo de reações imunológicas; biodegradável, onde os produtos de degradação não devam ser citotóxicos, tumorigênicos, nefrotóxicos ou causar qualquer outro efeito tóxico ao organismo.^{7,19} Além disso, o suporte deve apresentar outras propriedades, como: carreadora (liberação e transporte de substâncias sinalizadoras), adesão (fixação celular), biodegradabilidade (bom contato com os compartimentos do tecido nativo), ligação (aumenta a integração entre fibrilas de colágeno nos compartimentos do tecido de reparo e nativo), elasticidade (de acordo com as propriedades do tecido) e também deve criar um micro meio ambiente estável, tridimensional com porosidade (migração celular) suficiente para garantir o crescimento dos condrócitos.^{7,17}

Os condrócitos necessitam de um arcabouço em três dimensões (3D) para crescerem e preservarem a morfologia e produção de componentes de matriz próprios de condrócitos quando em cultura celular.^{5,7,19,31} Caso contrário, quando cultivados em monocamadas, as células tendem a aderir ao fundo do recipiente de cultura, e passam por um processo de desdiferenciação, onde adquirem características fibroblastóides, indicando perda do seu fenótipo arredondado, param de produzir colágeno tipo II e proteoglicanas, e passam a produzir componentes de matriz fibroblástica como colágeno tipo I (característico da fibrocartilagem e não da cartilagem hialina).^{3,5,7,19,17,31,32} Para a produção de um tecido cartilaginoso funcional, é crucial evitar a desdiferenciação dos condrócitos durante o processo de engenharia de cartilagem.⁷

A cultura de condrócitos em hidrogel de alginato constitui o método mais indicado para o isolamento dessas células, porque se trata de um polissacarídeo polimerizado de

constituição atóxica, biocompatível e injetável em modelos animais.^{7,31} Os condrócitos suspensos em alginato não aderem à matriz, facilitando a sua recuperação depois de cultivados, permitindo o estudo da expressão protéica e genética; além disso, através desse método, consegue-se manter a expressão do fenótipo diferenciado e restaurar condrócitos não diferenciados.⁷

Entretanto, recentemente tem-se procurado associar o uso de suportes com fatores de crescimento (FC) específicos (fator de crescimento transformante beta - TGF- β , Fator de Crescimento de Fibroblastos do tipo 2 -FGF-2, Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas – PDGF) para a regeneração da cartilagem aumentando a proliferação dos condrócitos e produção dos componentes específicos da matriz cartilaginosa; o ideal seria um suporte que possa gerar ao mesmo tempo uma superfície de apoio para a cultura de condrócitos e simultaneamente a liberação de FC.^{7,19} O FGF-2 é um fator de crescimento muito potente na estimulação da angiogênese.³³

Os FC TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 induzem a diferenciação condrogênica de CTMs em condrócitos, mas eles não agem com o mesmo efeito.⁷ Estudos demonstraram que TGF- β 2 e TGF- β 3 promovem condrogênese com maior potência do que o TGF- β 1, causando um maior acúmulo de glicosaminoglicano e uma maior deposição de colágeno tipo II do que as células que foram tratadas com TGF- β 1.⁶ O TGF- β 2 não apenas aumenta a condrogênese, como também induz o crescimento de tecido conectivo, resultando em neovascularização.^{3,6}

O FC insulina-1 e uma concentração elevada de glicose regulam a proliferação celular e aumentam a síntese de matriz extracelular, processo crucial para a formação de cartilagem.^{3,5,6}

Investigando o papel da plaqueta idealizou-se a sua utilização, sob a forma de gel, como arcabouço 3D para cultura celular baseando-se na secreção de uma série de hormônios interfaceados com a adesão, cicatrização e neovascularização dos seus grânulos.^{7,19} A trombina é um potente ativador de plaquetas, ou seja, ela induz a liberação dos FC; então, para a formação do gel, devem-se misturar plasma rico em plaquetas (PRP), ou concentrado de plaquetas (CP), com trombina e cloreto de cálcio para antagonizar o efeito anticoagulante, resultando na ativação do concentrado de plaquetas com o desenvolvimento de um gel de plaquetas (GP) viscoso.⁷

A possibilidade do uso do PRP ou do CP como um arcabouço 3D em forma de gel para a sustentação das células possui diversas vantagens; entre elas, ser um material biológico, que apresenta fácil reabsorção após a fase de transplantação, pode ser produzido com

concentrado de plaquetas do próprio transplantado, trata-se de um material barato, de fácil obtenção, de origem autóloga, ser um material disponível porque é produzido através de concentrados de plaquetas que são parte do estoque nos serviços de transfusão, e por isso também são testados sorologicamente com o rigor da legislação brasileira para hemoterapia³⁴, além de rico em FC (PDGF e TGF) que estimulam a síntese de matriz extracelular.^{7,19}

Os FC que são liberados estimulam funções celulares como migração, proliferação, diferenciação e angiogênese, facilitando a cicatrização e regeneração de tecidos.¹⁹

O sucesso da propagação das células *in vitro*, o controle de suas diferenciações e de suas funções específicas são pré-requisitos decisivos para a geração de transplantes relevantes clinicamente.⁵ Dessa maneira, as células e os tecidos devem ser suplementados com todas as substâncias que eles não são capazes de produzir sozinhos.⁵ Geralmente os meios de cultura (MC) são compostos por aminoácidos, sais, vitaminas e outros aditivos.⁵ A osmolaridade e a concentração eletrolítica decisivamente influenciam na diferenciação do tecido cultivado; portanto, esses parâmetros devem ser ajustados individualmente.⁵ Para profilaxia contra infecções, devem-se adicionar antibióticos e antimicóticos para compensar a falta de sistema imune *in vitro*.⁵ A adição de soro fetal bovino (SFB) e FC é usualmente necessária para induzir a proliferação das células, mas, ao mesmo tempo, esses mitogênicos podem estimular a desdiferenciação das células e dos tecidos *in vitro*.⁵ Para alcançar a diferenciação das células proliferadas, SFB e os FC devem ser reduzidos no meio ou substituídos por fatores de diferenciação adequados.⁵

O MC para condrócitos não deve ter SFB, mas deve apresentar alta concentração de glicose e deve ser acrescido com algumas substâncias condroindutoras, como dexametasona, insulina-transferrina- ácido selênico (ITS), ácido ascórbico e TGF- β 1.¹⁹

I.6 – Epitélio respiratório

Os epitélios são constituídos por células entre as quais se encontra pouca substância extracelular; e estas células se aderem firmemente umas às outras, formando camadas celulares contínuas que revestem a superfície externa e as cavidades do corpo.¹³ Os epitélios de revestimento sempre estão apoiados numa camada de tecido conjuntivo que contém os vasos sanguíneos para nutrição do epitélio.¹³ Os epitélios que revestem a árvore respiratória são de origem endodérmica.¹³

A luz da traquéia é recoberta pelas células epiteliais respiratórias (CERs) que formam o epitélio pseudo-estratificado prismático ciliado, com células mucosas chamadas

caliciformes; e entre as suas funções, as principais são: proteção, secreção e transporte mediado por cílios de partículas aderidas ao muco nas passagens aéreas.¹³



Figura 8. Histologia do epitélio respiratório.

Fonte: <http://ossuperpulmoes.saude.pt/>

O uso de epitélio respiratório gerado *in vitro* é principalmente indicado na cirurgia reconstrutiva de traquéia e laringe.⁵ O epitélio respiratório funcional é um fator decisivo para a desobstrução mucosa no trato respiratório, que não deve ser enfraquecida após a cirurgia reconstrutiva da traquéia.⁵ Como nos cultivos de enxertos de pele, são usadas matrizes de colágeno como suporte para ET do epitélio respiratório.⁵ Um suporte com porosidade é um importante parâmetro para preservar as características específicas teciduais do epitélio respiratório.⁵

I.7 – Sistema de histocompatibilidade

O maior complexo de histocompatibilidade (MHC) é um grupo de genes que codificam as moléculas de superfície que são responsáveis pelo reconhecimento imune e a sinalização entre as células.² O MHC também é conhecido como antígeno leucocitário humano (HLA) e está localizado no cromossomo 6 e pode ser dividido em 4 regiões: A, B, C e D.² Os loci HLA-A, HLA-B e HLA-C codificam os antígenos de classe I; ao passo que, o HLA-D codifica os antígenos de classe II.² Os antígenos de classe I estão presentes na superfície de todas as células nucleadas e plaquetas e podem ser detectados usando anticorpos monoclonais diretos contra o complexo de classe I inteiro, ou contra os componentes individuais (A, B e C).² Os antígenos MHC de classe II são expressos normalmente nas células envolvidas no reconhecimento e na resposta imune, como as células B, os macrófagos, os monócitos, várias células apresentadoras de antígenos e algumas células T.² A região HLA-

D é dividida em três loci distintos: DP, DQ e DR, que podem ser detectados por anticorpos monoclonais diretos contra qualquer loci.²

A traquéia humana contém compartimentos de tecidos altamente antigênicos, que são morfológicamente diferentes das regiões menos antigênicas.² As glândulas salivares menores e a mucosa traqueal são muito antigênicas; já a cartilagem contém condrócitos distribuídos que também são antigênicos, mas são envolvidos por uma barreira da matriz não antigênica.²

I.8 – Descelularização da traquéia

Atualmente, tem-se usado suportes biológicos derivados de tecido e órgãos descelularizados em estudos pré-clínicos com animais e em aplicações clínicas em humanos.³⁵ A utilização desses materiais naturais apresentam vantagens biológicas; porém, é necessário que se faça um preparo rigoroso que garanta a descelularização para evitar a reação imunológica no hospedeiro.^{16,36} Antígenos celulares xenogênicos e alogênicos são reconhecidos como estruturas estranhas ao hospedeiro e assim induzem uma resposta inflamatória ou uma rejeição imuno-mediada do tecido.³⁵

O objetivo de qualquer protocolo de descelularização é remover todo o material celular e nuclear, preservando a composição, atividade biológica e integridade mecânica da matriz extracelular restante.^{35,36} Além disso, as substâncias utilizadas neste processo precisam ainda ter mínimo efeito residual, para não inibir o crescimento celular após implantação da matriz no organismo.³⁶ O protocolo mais completo de um processo de descelularização inclui uma combinação de técnicas físicas, químicas e enzimáticas.³⁵

Os métodos físicos rompem as membranas celulares e liberam seus conteúdos, facilitando o processo subsequente de lavagem para remoção dos conteúdos celulares.³⁵ Esses métodos são geralmente insuficientes para alcançar uma descelularização completa, então devem ser combinados com outros métodos químicos.³⁵ Os métodos físicos incluem congelamento, pressão direta, sonicação e agitação.³⁵

O rápido congelamento de um tecido forma cristais de gelos intracelulares que rompem as membranas causando a lise celular.³⁵ Porém, as mudanças de temperatura devem ser cuidadosamente controladas para prevenir a formação de gelo que rompa também a matriz extracelular.³⁵ Após a aplicação desse método, é necessário fazer a remoção dos materiais celulares.³⁵ 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 apresentam uma matriz extracelular organizada de forma tão densa, como por exemplo o fígado e o pulmão.³⁵ A

agitação mecânica e a sonicação devem ser utilizadas simultaneamente com tratamentos químicos para auxílio da lise celular e remoção dos *debris* celulares.³⁵ Em todos esses procedimentos, a velocidade ótima, volume de reagente e comprimento da agitação mecânica dependem da composição, volume e densidade do tecido.³⁵

Métodos químicos envolvem tratamentos com soluções alcalinas e ácidas, detergentes não-iônicos, detergentes iônicos, soluções hipotônicas e hipertônicas, entre outras.³⁵

Os tratamentos com soluções alcalinas e ácidas são usados nos protocolos de descclularização para solubilizar os componentes citoplasmáticos das células, assim como, removerem os ácidos nucléicos (RNA e DNA).³⁵ Por exemplo, ácido acético, ácido peracético, ácido sulfúrico, ácido hidrolórico e hidróxido de amônio (NH_4OH) podem efetivamente romper as membranas celulares e organelas intracelulares.³⁵ Porém, esse químicos também podem dissociar moléculas importantes como o conteúdo glicosaminoglicano dos tecidos colagenosos.³⁵

Os detergentes não-iônicos têm sido usados amplamente nos protocolos de descclularização por causa de seus efeitos relativamente suaves nas estruturas teciduais.³⁵ Esses detergentes rompem as interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, mas não alteram a conformação funcional porque deixam as interações proteína-proteína dos tecidos intactas.³⁵ O triton X-100 é o detergente não iônico mais amplamente utilizado nos protocolos de descclularização.³⁵ Ele apresenta um efeito prejudicial pequeno no conteúdo glicosaminoglicano, quando comparado com outros agentes de descclularização.^{37,38}

Os detergentes iônicos são eficientes na solubilização das membranas celulares citoplasmáticas e nucleares, mas tendem denaturar as proteínas rompendo as interações proteína-proteína.^{35,21} Os mais comumente utilizados são dodecil sulfato de sódio (SDS), deoxicolato de sódio (DS) e triton X-200.³⁵

O SDS faz parte da composição química de muitos cosméticos, produtos para higiene e limpeza.³⁶ Ele é muito eficiente na remoção de componentes celulares de um tecido.³⁵ Comparado com outros detergentes, o SDS promove uma remoção muito completa dos restos nucleares e de proteínas citoplasmáticas, como a vimentina.^{16,35}

O DS é extraído da bile e também remove restos celulares, mas pode causar grande rompimento da arquitetura tecidual nativa quando comparado com o SDS.³⁵ Pode ser associado a métodos enzimáticos ou a outros detergentes (não iônicos/ mistos).³⁶

Choque osmótico com uma solução hipotônica ou hipertônica é usado para lisar as células dentro dos tecidos e dos órgãos.³⁵ Um tratamento em uma solução hipotônica por 11

horas seguido de um tratamento em solução hipertônica pode causar lise celular, mas geralmente não remove os restos celulares resultantes dos tecidos; assim, tratamentos enzimáticos ou químicos adicionais são tipicamente necessários para facilitar a remoção dos *debris* celulares.³⁵

As técnicas enzimáticas de descclularização incluem o uso da digestão de proteases e nucleases.³⁵ A tripsina é uma das enzimas mais comumente usadas nos protocolos de descclularização, já que é altamente específica.³⁵ As endonucleases catalisam a hidrólise das ligações interiores das cadeias de ribonucleotídeo e desoxiribunecleotídeo, enquanto as exonucleases catalisam a hidrólise das ligações terminais dessas cadeias, levando a degradação do RNA e do DNA.³⁵ Os métodos enzimáticos de descclularização provocam um efeito adverso nos componentes extracelulares de tecidos e órgãos.³⁵ Tratamento prolongado com tripsina/EDTA reduz o conteúdo de laminina e fibronectina da matriz extracelular, mas não afeta a quantidade de colágeno.³⁵

A eficiência desses protocolos de descclularização e as alterações na matriz extracelular dependem da fonte, da composição e da densidade do tecido de interesse.³⁵

Há métodos disponíveis para determinar a eficiência da remoção do material celular dos tecidos.³⁵ Os corantes padrões hematoxilina e eosina podem servir como uma primeira linha de inspeção para determinar se estruturas nucleares podem ser observadas.³⁵ Métodos imunohistoquímicos também podem ser utilizados para proteínas intracelulares específicas, tais como actina e vimentina.³⁵

Os métodos de descclularização descritos acima incluem uma ampla variedade química, e são usados por causa de suas habilidades inerentes de danificar as células.³⁵ Se esses químicos permanecerem dentro do tecido em concentrações altas após o tratamento, eles podem ser tóxicos às células hospedeiras após implantados *in vivo*.³⁵

Um estudo recente comparou a descclularização de cartilagem articular produzida por ET através de vários métodos diferentes; comparando SDS, tributíil fosfato, triton X-100 e solução hipotônica/hipertônica.¹⁶ Sendo que todos esses tratamentos foram realizados juntamente com as enzimas DNase e RNase.¹⁶

O tratamento com SDS, nas concentrações de 1% ou 2%, é um tratamento efetivo para a descclularização de cartilagem articular produzida por ET; porém o SDS a 2% pareceu ser mais promissor, sendo que o tempo de aplicação também influenciou significativamente.¹⁶ Por exemplo, tratamento com SDS a 2% por uma hora resultou em uma diminuição de 33% no conteúdo de DNA, porém com preservação do conteúdo glicosaminoglicano e de

colágeno.¹⁶ Já o tratamento com SDS na mesma concentração, mas durante oito horas, promoveu uma descelularização histológica completa e uma redução de 46% no conteúdo de DNA, mas com perda significativa no conteúdo glicosaminoglicano e uma redução menos pronunciada no conteúdo de colágeno.¹⁶

Os tratamento com triton X-100 e tributil fosfato não mostraram resultados promissores, com um efeito mínimo na descelularização do tecido e redução clara no conteúdo glicosaminoglicano.¹⁶ Porém, o tratamento com o tributil fosfato com duração de 48 horas promove a descelularização histológica completa, mas a redução do conteúdo glicosaminoglicano começa a ocorrer após 8 horas de tratamento.¹⁶ O tratamento com as soluções hipotônica/hipertônica também não se mostrou viável porque ele apresenta um efeito residual enorme nas propriedades funcionais do tecido.¹⁶

Muitas evidências apontam que matrizes acelulares obtidas por um método detergente-enzimático, utilizando DS e DNase I, podem substituir órgãos, como bexiga, uretra e intestino delgado, porque elas permitem adesão celular e crescimento e são remodeladas *in vivo*.³² Além disso, a presença de células autólogas no enxerto representa um fator importante que pode aumentar a sua biocompatibilidade.³² Já foi demonstrado que as matrizes traqueais obtidas por esse método podem servir de suporte *in vitro* para a adesão de condrócitos e células epiteliais traqueais; deste modo, sugerindo uma alternativa para a técnica de ET no reparo ou substituição dos defeitos traqueais.³² Além disso, essas matrizes também podem estimular *in vivo*, o crescimento das células hospedeiras, a formação de matriz e a anastomose dessa novas células com a matriz do hospedeiro.³² Essas características podem prevenir a formação de estenoses.³²

Vários estudos utilizaram vários ciclos desse método detergente-enzimático para a descelularização de traquéias. Esse tratamento é um método simples e eficiente para a descelularização de matrizes traqueais; já que os antígenos MHC desaparecem, mas há a preservação da integridade estrutural muito similar à traquéia nativa.⁴ Tratamento com 17 e 18 ciclos de descelularização com esse método detergente-enzimático não foram capazes de descelularizar um espécime de traquéia completamente.^{4,32} As células epiteliais, as glândulas e as células positivas para os marcadores MHC classe I e II desaparecem, mas vários condrócitos apresentam-se nos anéis de cartilagem da traquéia tratada.^{4,32} Porém, após 25 ciclos, as células epiteliais e glandulares são removidas; e os poucos condrócitos visíveis apresentavam-se distorcidos e a maioria anucleares.¹ Além disso, a traquéia tratada permanece com a mesma arquitetura de um órgão nativo.¹ Essa quantidade de ciclos também é necessária

para remoção completa da expressão dos antígenos HLA-A, HLA-B e HLA-C, embora uma quantidade baixa de expressão de MHC de classe II ainda possa ser observada em poucas áreas.¹

Com esse protocolo, é possível remover os antígenos HLA da matriz doadora, e prontamente colonizá-la com as células epiteliais e CTMs condrogênicas do receptor.¹

A matriz extracelular representa uma parte ativa nos aspectos diversos de regulação da biologia celular que é essencial para o funcionamento normal dos tecidos; por isso que os estudos recentes de bioengenharia estão focando na aplicação de matriz extracelular derivada de materiais de suportes bioativos.¹ Suportes derivados de tecidos descelularizados têm mostrado sucesso na adesão *in vitro*, crescimento e função de vários tipos celulares; e são usados nos animais e nos homens satisfatoriamente, atuando no crescimento e remodelamento.¹

O maior desafio é construir por meio de técnicas de ET uma via respiratória funcional que é uniforme e altamente eficiente na cultura celular na superfície externa e interna da matriz tubular tridimensional, co-cultivando diferentes tipos celulares.¹ Estabelecer um protocolo de modelo experimental de neotraquéia sobre uma estrutura tridimensional autóloga recobrimo-a externamente com o tecido cartilaginoso e internamente com epitélio respiratório é o desafio deste projeto.

I.9 - LASER e LED

No final do século XIX e início do século XX, o eletromagnetismo desenvolvido por James Clerk Maxwell conjuntamente com a Teoria Quântica de Einstein, aliaram-se a óptica oferecendo embasamentos suficientes para exploração da luz em diversas áreas do conhecimento.⁴⁰ A óptica é um campo dentro da física que lida não somente com a propagação, mas também com a produção da luz e com os mecanismos de interação com a matéria.^{40,41}

Atualmente, o LASER (Light Amplified by Stimulated Emission Radiation) e o LED (Light Emitting Diode) são fontes emissoras de luz muito utilizadas, principalmente na área médica.^{40,41} O LASER é um dispositivo composto por um meio ativo, o qual pode ser um gás, um cristal sólido ou substâncias líquidas, que quando excitadas por uma fonte de energia externa geram luz com bandas espectrais extremamente estreitas, as quais se estendem do infravermelho remoto ao ultravioleta, com propriedades especiais: coerência espacial e temporal, monocromaticidade, pequena divergência, intensa energia e pulsos ultracurtos ao

contrário das características das fontes de luz convencionais.⁴⁰ Estas propriedades permitem o destaque da aplicabilidade do LASER na medicina como o seu uso em procedimentos cirúrgicos, fisioterapêuticos e processos de reparação tecidual.⁴¹ Isto se deve a capacidade dos tecidos biológicos, isto é, absorver a energia luminosa transformando-a em processos biológicos, os quais dependerão da quantidade de energia, do comprimento de onda, do tempo de exposição e irradiância.^{40,41}

O LED é um dispositivo semicondutor, que emite luz quando uma tensão é aplicada.^{40,42} É um componente eletrônico moderno semelhante ao LASER de diodo (LASER semicondutor), utilizado em diversas áreas, como na LEDterapia de baixa intensidade, leitores de código de barra, semáforos, painéis de anúncio, celulares, entre outros.^{40,42}

As fontes de emissão de luz LASER e LED de baixa intensidade são semelhantes do ponto de vista da luz emitida, pois ambas possuem uma banda espectral estreita, embora o LED tenha um espectro de ação eletromagnético mais amplo, fator importante para o seu uso na Terapia Fotodinâmica e na odontologia, em relação ao LASER. A diferença básica dessas fontes está no fato de a luz emitida pelo LED ser ausente de coerência e colimação.⁴² Entre os benefícios do LED destacam-se: energia eficiente, tamanho compacto, baixa voltagem e baixo aquecimento.⁴³

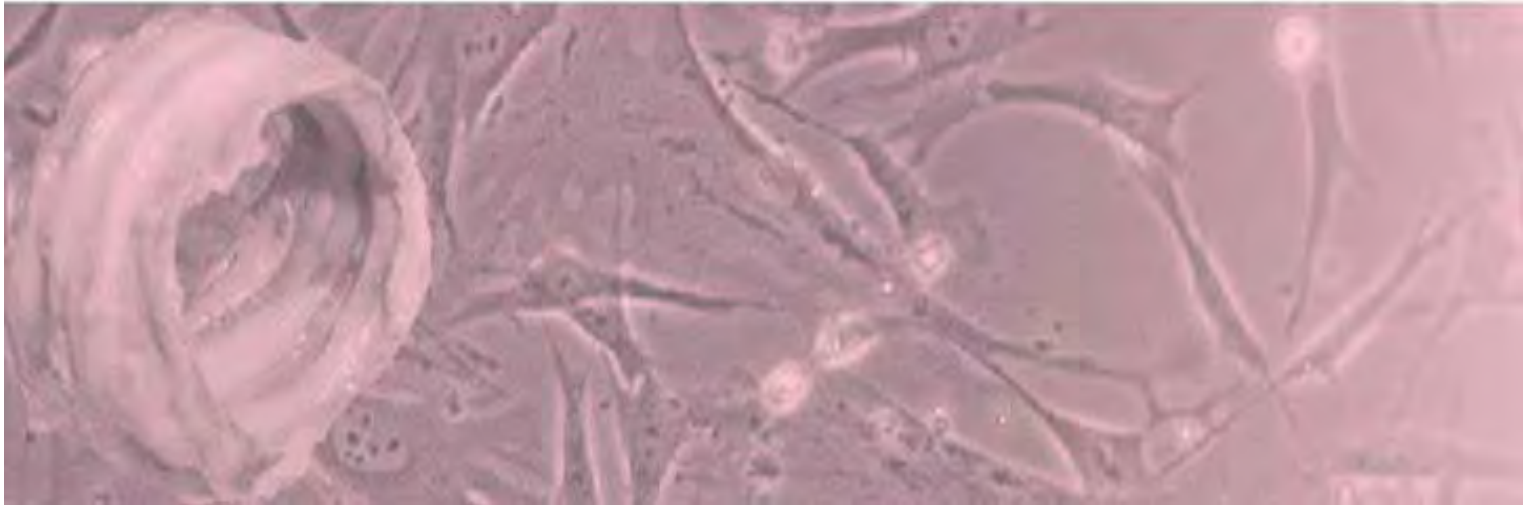
I.10 - Modelos animais

A escolha do modelo animal depende do objetivo da pesquisa.¹² Para a aplicação de ET de traquéia, devem ser usados animais maiores, como, por exemplo, bodes/cabras e carneiros/ovelhas; porque o diâmetro traqueal, espessura da parede do órgão e tamanho e quantidade das células podem ser comparados mais fidedignamente com a traquéia humana.¹²

Bodes/cabras apresentam o complexo laringotraqueal superficial e de fácil acesso, a traquéia é semelhante em relação ao tamanho e a forma com a traquéia do homem e a traquéia cervical é longa, o que deve reduzir a chance de infecções ascendentes.¹² Porém, em muitos casos, a regurgitação desses ruminantes tornam os estudos impossíveis.¹²

Não há um consenso a respeito do uso de diferentes modelos animais na pesquisa traqueal, mas há vários estudos que utilizam coelhos para as pesquisas dessa área.¹²

Objetivos



II - Objetivos

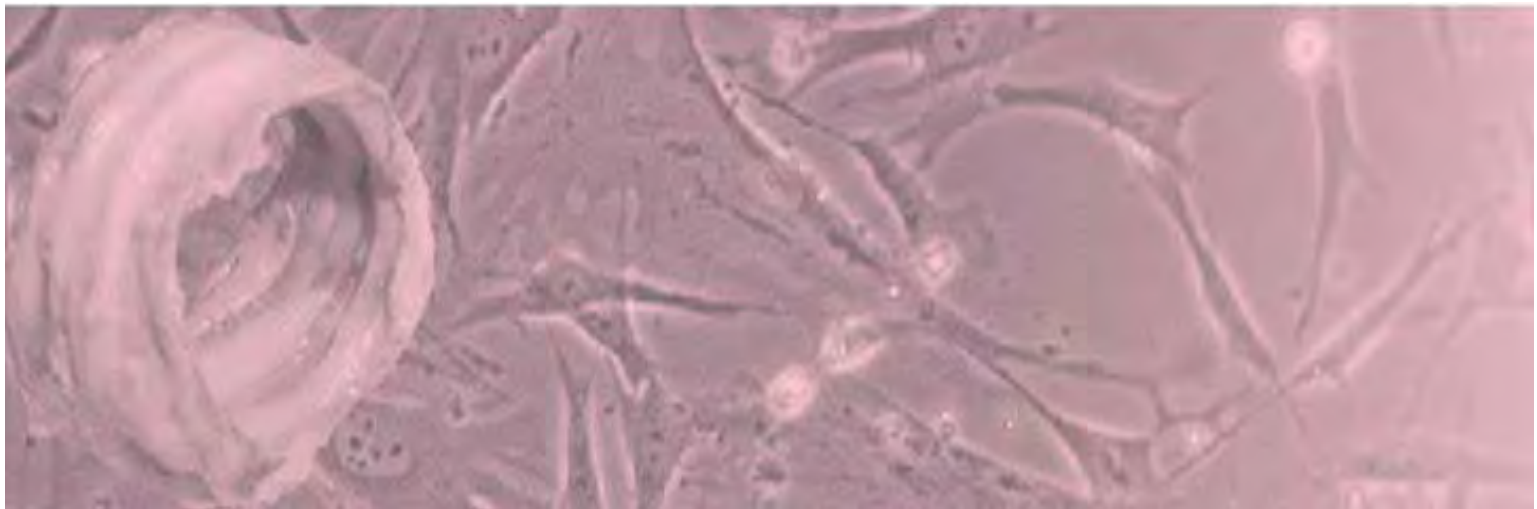
II.1 - Objetivo Geral

Propor a construção de modelo de traquéia para enxerto utilizando técnicas de engenharia de tecidos.

II.2 - Objetivos Específicos

1. Desenvolver técnica de descaracterização antigênica de traquéia retirada de animal doador-coelho como proposta de preparo de modelo tridimensional de suporte para enxerto de traquéia.
2. Obtenção de CTMs a partir de tecido adiposo.
3. Programar a cultura de condrócito a partir de CTM de tecido adiposo.
4. Expandir *ex vivo* o epitélio de revestimento traqueal pseudo-estratificado prismático ciliado a partir de biópsia de epitélio de mesma origem.
5. Propor reconstrução de neotraqueia com revestimento de epitélio na face interna da traquéia descelularizada.

Materiais e Métodos



III - Materiais e Métodos

Instalações

Este trabalho foi desenvolvido em três laboratórios da Unesp de Botucatu: Laboratório Experimental de Cirurgia, onde foram realizadas as coletas das amostras (traquéias, CTMs e CERs) dos animais; Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências, onde foram realizadas as imunohistoquímicas e Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro, onde foram realizadas as demais etapas.



Figura 9. *Screening* da área limpa.



Figura 10. Nicho de CT.



Figura 11. Fluxo laminar do nicho de CT.



Figura 12. Manipulação no fluxo laminar.



Figura 13. Estufa Thermo Class 100[®].



Figura 14. Microscópio invertido Zeiss Axiovert[®].

Animais

O presente estudo foi efetuado com modelo em coelhos da raça Botucatu, pesando entre 3,0 e 4,0kg, provenientes do Biotério Central da Unesp. 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 751.

Os animais foram mantidos em condições adequadas no Biotério da Cirurgia Experimental sob cuidados de técnico especializado.

Para facilitar o entendimento das diferentes fases, faremos a apresentação das mesmas em diagramas.

Etapa 1: Obtenção da traquéia como arcabouço

a – Coleta da traquéia de coelho

b – Descelularização da traquéia de coelho

c – Análise histológica

Etapa 2: Obtenção das CTMs

a – Coleta das CTMs

b – Plaqueamento e amplificação

c – Caracterização fenotípica por citometria de fluxo

Etapa 3: Diferenciação condrogênica

a – Preparo do GP

b – Aplicação das CTMs no GP

c – Análise histológica e imunohistoquímica

Etapa 4: Expansão *ex vivo* do epitélio traqueal

a – Coleta das biópsias dos epitélios respiratórios

b – Plaqueamento e expansão

c – Imunohistoquímica

Etapa 5: Aplicação das CERs na luz traqueal descclularizada

a – Aplicação das células epiteliais/cm²

b – Cultura durante 7 dias

c – Análise histológica

Etapa 1 – Obtenção da traquéia como arcabouço

Foi realizado um banco de traquéias através da colaboração de diferentes alunos de pós-graduação. Quando os coelhos dos experimentos desses alunos tinham eutanásia agendada, o segmento traqueal era retirado. Desta forma, nenhum animal precisou ser sacrificado exclusivamente para a pesquisa.

Os coelhos foram anestesiados com injeção por via intramuscular de Ketamina e Xilasina.^{44,45,46} Em posição supina, foram fixados à goteira de Claude-Bernard, em ventilação espontânea sem intubação endotraqueal. Após tricotomia, antisepsia e isolamento por campos estéreis da região anterior do pescoço, realizada cervicotomia mediana interessando a pele e o tecido celular subcutâneo. Com auxílio de afastadores a traquéia foi exposta desde a laringe até a entrada do tórax. Realizada a secção transversal da traquéia a 1 cm da laringe e a 1cm da entrada do tórax, seguida do descolamento das estruturas retro traqueais.

Depois os animais foram sacrificados com injeção intravenosa letal de pentobarbital.⁴⁷

Os segmentos de traquéias retirados foram imediatamente lavados com solução salina estéril a 0,9%, para retirar o excesso de sangue. Depois foram transportados com HEPES mais antibiótico até o laboratório de engenharia celular, onde foram submetidos à dissecação microscópica para a retirada da maior quantidade possível de tecido conjuntivo para a realização dos diferentes protocolos de descelularização. Quando esses protocolos não foram realizados em seguida, as traquéias foram conservadas na ausência de criopreservador em freezer -80°C. Para posterior realização dos protocolos de descelularização, essas traquéias foram descongeladas em banho-maria, lavadas com solução salina tamponada (PBS), sob agitação, três vezes, e a quarta lavagem realizada com HEPES.

Foram realizados vários protocolos de tratamento das traquéias, a fim de encontrar o método que mais se aproxima do objetivo da descelularização, ou seja, a remoção completa dos antígenos HLA das matrizes doadoras para posterior colonização com as células epiteliais e CTMs condrogênicas do receptor. Assim, foram testados métodos físicos (congelamento, agitação, pressão direta, irradiação eletromagnética não ionizante), associados com métodos químicos (Triton X-100, SDS e DS) e enzimáticos (DNase e RNase). Feito isso, as traquéias foram conservadas em freezer -80°C ou geladeira.

Primeiro protocolo

Foi realizado com traquéia recém-coletada, ou seja, que não foi submetida ao processo de congelamento. Retirou-se um anel da traquéia para a análise histológica pré-tratamento, e o restante do fragmento traqueal foi submerso em solução contendo SDS 0,1%, a 37° C, por um período de 15 horas, sob agitação de 180 rpm no C24 *Incubator shaker* (*New Brunswick Scientific*).³⁶ O fragmento foi então lavado, sob agitação, com PBS acrescido de 10% de sulfato de gentamicina; sendo que foram realizadas 5 lavagens, com duração de 10 minutos cada.³⁶ Retirou-se mais um anel para a análise histológica pós-tratamento, e a traquéia foi armazenada em álcool 70% a 4°C.³⁶ Os fragmentos histológicos foram preparados, cortados e corados com hematoxilina-eosina (HE).



Figura 15. C24 *Incubator shaker* (*New Brunswick Scientific*).



Figura 16. Amostras sob agitação.

Amostra		1
Métodos Físicos	Agitação	
Métodos Químicos	SDS 0,1%	
Tempo	15 horas	

Figura 17. Primeiro protocolo de descelularização de anéis traqueais.

Segundo protocolo

Foram testados doze tratamentos diferentes, baseando-se no artigo de Elder *et al.*, 2009. As traquéias utilizadas também eram recém-coletadas, e elas foram divididas, porque cada protocolo foi realizado com um fragmento de traquéia de 3 a 4 anéis. As soluções base dos doze protocolos incluíram EDTA 0,02%, antibiótico-antimicótico 1% em 10 ml de PBS, e esses tratamentos foram aplicados a 37° C sob agitação de 180 rpm no C24 *Incubator shaker* (New Brunswick Scientific).¹⁶ As soluções enzimáticas possuíam 0,5 mg/mL DNase Tipo I, 50 mg/mL RNase.¹⁶ Após os tratamentos, as traquéias foram lavadas por 2 horas em PBS a 37° C sob agitação de 180 rpm no C24 *Incubator shaker* (New Brunswick Scientific); depois foram preparadas para a análise histológica e coradas com HE.¹⁶ As amostras 1 e 2 (amarelo) são controles da reação, isto é, os fragmentos traqueais foram submersos apenas nas soluções base, na ausência de detergentes e enzimas, mas ficaram sob agitação durante 8 e 24 horas, respectivamente.

Amostra		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Métodos Físicos	Agitação	Amarelo	Amarelo	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul
	SDS 1%			Azul	Azul	Azul	Azul								
Métodos Químicos	SDS 2%							Azul	Azul	Azul	Azul				
	Triton X-100 2%											Azul	Azul	Azul	Azul
Métodos Enzimáticos	DNase I/RNase			Azul		Azul		Azul		Azul		Azul		Azul	
Tempo	8 horas	Amarelo		Azul	Azul			Azul	Azul			Azul	Azul		
	24 horas		Amarelo			Azul	Azul			Azul	Azul			Azul	Azul

Figura 18. Segundo protocolo de descellularização de anéis traqueais.

Terceiro protocolo

Foram testados vários protocolos diferentes, baseando-se nos resultados observados no segundo protocolo, ou seja, os mesmos detergentes foram utilizados (Triton X-100 e SDS). Neste experimento utilizou-se um aparelho de LED, desenvolvido junto ao Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu, com potência de 25 mW e densidade de potência de 1 mW/cm² nos comprimentos de onda 475 nm +/- 20 nm (luz azul) e 630 nm +/- 20 nm (luz vermelha). Assim, as traquéias foram submetidas a uma única

irradiação eletromagnética não ionizante, com LED em modo contínuo nos comprimentos de onda 475 nm +/- 20 nm e 630 nm +/- 20 nm com dose de 15 J/cm² totalizando 10 minutos de exposição. Além disso, essas traquéias foram submetidas à pressão mecânica (PM). Nesse terceiro protocolo, não houve utilização das enzimas (DNase e RNase). As traquéias utilizadas foram descongeladas em banho-maria, depois foram lavadas com salina, sob agitação de 150 rpm no C24 *Incubator shaker* (New Brunswick Scientific), a 37°C durante 10 minutos. Essa etapa de lavagem com salina foi repetida, e ainda, uma terceira lavagem foi realizada com HEPES. Dando continuidade, essas traquéias foram colocadas em placas de Petri estéreis para aplicação dos LEDs, que foi realizada por um aluno da física médica. Uma placa foi irradiada com LED no comprimento de onda 475 nm +/- 20 nm e a outra com LED no comprimento de onda de 630 nm +/- 20 nm, totalizando 10 minutos de exposição em cada uma. Depois as traquéias foram divididas em fragmentos de 3 a 4 anéis; e esses fragmentos foram colocados em seus respectivos tubos Falcon estéreis de 15 ml com as suas respectivas soluções de descelularização. A PM foi realizada a cada hora, e as soluções de tratamento foram trocadas. Assim, nos tratamentos que incluíram ação mecânica por 8 horas, essa pressão foi realizada 8 vezes; já nos tratamentos de 24 horas, a ação mecânica foi realizada nas primeiras 12 horas, totalizando 12 vezes.

As soluções base dos protocolos incluíram EDTA 0,02%, antibiótico-antimicótico 1% em 10 ml de PBS, e esses tratamentos foram aplicados a 37° C sob agitação de 180 rpm no C24 *Incubator shaker* (New Brunswick Scientific).¹⁶ Após os tratamentos, as traquéias foram lavadas por 2 horas em PBS a 37° C sob agitação de 180 rpm no C24 *Incubator shaker* (New Brunswick Scientific); depois foram preparadas para a análise histológica e coradas com HE.¹⁶



Figura19. Irradiação LED 630nm.



Figura 20. Irradiação LED 475nm.

Amostra		1	2	3	4	5	6	7
Métodos Físicos	Congelamento	■	■	■	■	■	■	■
	Agitação	■	■	■	■	■	■	■
	Pressão Mecânica		■	■	■	■	■	■
Métodos Químicos	SDS 2%						■	■
	Triton X-100 2%				■	■		
Tempo	8 horas		■		■		■	
	24 horas	■		■		■		■

Figura 21. Terceiro protocolo de descclularização de anéis traqueais.

Amostra		8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Métodos Físicos	Congelamento	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Agitação	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	LED 475nm	■	■			■	■			■	■		
	LED 630nm			■	■			■	■			■	■
Métodos Químicos	SDS 2%									■	■	■	■
	Triton X-100 2%					■	■	■	■				
Tempo	8 horas	■		■		■		■		■		■	
	24 horas		■		■		■		■		■		■

Figura 22. Terceiro protocolo de descclularização de anéis traqueais.

Amostra		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Métodos Físicos	Congelamento	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul
	Agitação	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul
	Pressão Mecânica	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul
	LED 475nm	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Azul	Azul	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	LED 630nm	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Métodos Químicos	SDS 2%	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	Triton X-100 2%	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Tempo	8 horas	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	24 horas	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo

Figura 23. Terceiro protocolo de descelularização de anéis traqueais.

Quarto protocolo

Esse protocolo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, três diferentes doses de LED no comprimento de onda 475 nm +/- 20 nm foram testadas: 30J/cm², 60J/cm² e 90J/cm². Diante desse primeiro teste, a segunda etapa foi realizada, associando-se única irradiação de LED no comprimento de onda 475 nm +/- 20 nm e os tratamentos com os detergentes: SDS, Triton X-100 e DS. Foram realizados quatro protocolos.

As traquéias utilizadas foram descongeladas em banho-maria, depois foram lavadas com salina, sob agitação de 150 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)*, a 37°C durante 10 minutos. Essa etapa de lavagem com salina foi repetida, e ainda, uma terceira lavagem foi realizada com HEPES. Dando continuidade, essas traquéias sofreram única irradiação de LED no comprimento de onda 475 nm +/- 20 nm. Depois as traquéias foram divididas em fragmentos de 3 a 4 anéis; e esses fragmentos foram colocados em seus respectivos tubos Falcon estéreis de 15 ml com as suas respectivas soluções de descelularização. As soluções base dos quatros protocolos incluíram EDTA 0,02%, antibiótico-antimicótico 1% em 10 ml de PBS, e esses tratamentos foram aplicados a 37° C sob agitação de 180 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)*.¹⁶ Após os tratamentos, as traquéias foram lavadas por 2 horas em PBS a 37° C sob agitação de 180 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)*; depois foram preparadas para a análise histológica e coradas com HE.¹⁶

Amostra		1	2	3	4	5	6	7	8
Métodos Físicos	Congelamento	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Azul	Azul	Azul	Azul
	Agitação	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Azul	Azul	Azul	Azul
	LED 475nm	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Azul	Azul	Azul	Azul
Métodos Químicos	SDS 2%	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	Triton X-100 2%	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	Deoxicolato de sódio 4%	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Tempo	24 horas	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	48 horas	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo

Figura 24. Quarto protocolo de descclularização de anéis traqueais.

Implante dos segmentos traqueais *in vivo*

Os protocolos de descclularização validados, sob o ponto de vista histológico, precisam também ser avaliados após o implante *in vivo*. Para isto, o implante dos segmentos traqueais descclularizados com os tratamentos mais eficazes, que foram elencados através da histologia, foi realizado.

Os coelhos foram anestesiados com injeção por via intramuscular de Ketamina e Xilasina.^{44,45,46} Pequena incisão de pele na face externa das orelhas desses animais foi realizada, com posterior divulsão dos tecidos, e então, os fragmentos descclularizados foram implantados.

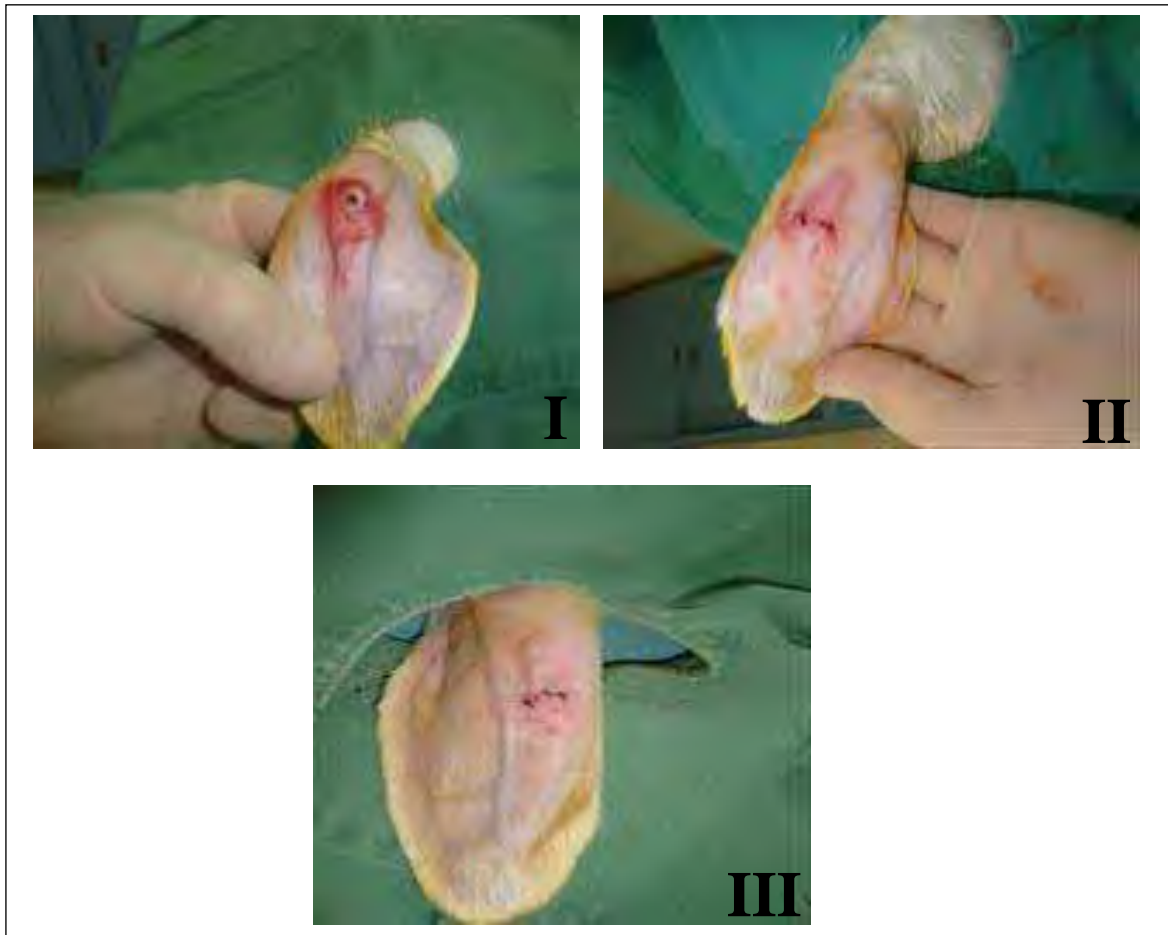


Figura 25. Implante dos segmentos traqueais *in vivo*. **I** – Segmento traqueal descelularizado sendo implantado na face externa da orelha do coelho. **II e III** – Segmento traqueal descelularizado já implantado.

Após trinta dias, os coelhos foram sacrificados com injeção intravenosa letal de pentobarbital.⁴⁷ As orelhas foram retiradas, e toda a região peri-implante foi preparada para análise histológica e corada com HE.

.Etapa 2 – Obtenção das CTMs

Foram utilizados os mesmos coelhos da etapa 1, que já seriam sacrificados.

A área a ser utilizada para a coleta do tecido adiposo (TA), isto é, região dorso-anterior dos animais, foi submetida à tricotomia e anti-sepsia. Realizou-se pequena incisão expondo o TA, o qual foi pinçado, retirado e transferido para um tubo cônico de 50 ml contendo HEPES com antibiótico. O material foi então dividido e pesado em duas partes iguais para a realização de duas técnicas diferentes, dissociação mecânica e digestão enzimática, a fim de se obter as CTMs.



Figura 26. Coleta do TA de coelho.



Figura 27. TA.

A dissociação mecânica foi realizada com auxílio de *cell scraper* para o desprendimento das células do TA, em placas de Petri contendo meio HEPES e antibiótico. Em seguida, as células juntamente com o líquido foram transferidas para uma seringa, a qual foi mantida por 10 minutos na posição vertical (com o bisel para baixo) para a separação dos *debris*. O material foi transferido para um tubo Falcon e centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm. O *pellet* foi ressuspenso com 1 ml de MC. Retirou-se alíquota de 30 μ l do *pellet* para a contagem celular em câmara de Neubauer.



Figura 28. Dissociação mecânica do TA.

Na digestão enzimática, a amostra de TA foi colocada na solução enzimática de Colagenase Tipo I (InvitrogenTM) e ficou na estufa, ou seja, em atmosfera úmida a 5% de CO₂ e 37° C durante 15 horas. Após essa ação enzimática, a reação foi inativada com SFB. O material foi centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm. Formado o *pellet*, aspirou-se o sobrenadante e o material foi centrifugado novamente com SFB para remoção completa da

enzima. O *pellet* foi ressuspensão com 1 ml de MC. Retirou-se alíquota de 30 μ l do *pellet* para a contagem celular em câmara de Neubauer.



Figura 29. Câmera de Neubauer.

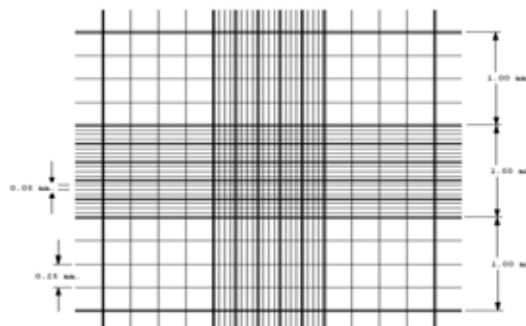


Figura 30. Quadrantes da câmara.

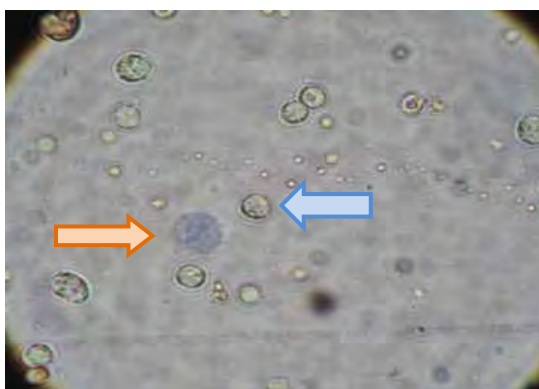


Figura 31. Imagem da câmara em microscopia de luz no aumento de 100X. As células viáveis estão representadas pela seta azul, já as células inviáveis apresentam o citoplasma corado com azul de Trypan (seta laranja).

Fonte: Oliveira, 2009.

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 25cm² de área de cultura (Nunc[®]) e dar seguimento à cultura. O meio utilizado foi o DMEM Knockout[®] (Invitrogen[™]), suplementado por: 5mL de antibiótico/antimicótico (Invitrogen[™]), 5mL de L-glutamina (Invitrogen[™]), 5mL de aminoácidos essenciais (Invitrogen[™]), 2,5mL de aminoácidos não essenciais (Invitrogen[™]) e 50ml de SFB (Invitrogen[™]).¹⁹

As células permaneceram em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ (Thermo Class 100[®]).¹⁹ 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 75cm² (NuncTM).¹⁹ Após a terceira passagem em tripsina, as células foram criopreservadas em DMSO (LGC BiotecnologiaTM) 10% SFB, em nitrogênio líquido na temperatura de -196°C.¹⁹

Caracterização por citometria de fluxo

A caracterização das CTMs foi realizada após terceira passagem em cultura, com os marcadores (proteínas) de superfície, através do uso de anticorpos específicos para citometria de fluxo, técnica 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 células de coelho, foram usados dois anticorpos *anti-rat* como controles positivos para as CTMs: 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 (AcMm) do protocolo MSC, produzidos pelo Laboratório de Pesquisa de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, que foram obtidos na dissertação de Moroz em 2009, e complementados por Almeida no mesmo ano. Esses clones foram produzidos a partir de CTM de medula óssea de coelho. Os AcMm obtidos *home made* utilizados foram: MSC1-160A69 (+ com 78,8% de CTM) e MSC1-160A30 (+ com 84,57% de CTM).

A produção de AcMm segue as seguintes etapas: imunização, fusão celular, *screening*, clonagem, novo *screening*, amplificação dos clones, determinação de classe e subclasse de imunoglobulina e confirmação da monoclonalidade.¹⁹ Utiliza-se CTMs isoladas de medula óssea de coelho, expandidas *in vitro*, cultivadas por duas semanas e criopreservadas; então os antígenos, proteínas de membrana, são apresentados em sua forma integral.¹⁹ Quando se deseja anticorpos da classe IgG para utilização em citometria de fluxo, adota-se o protocolo longo de imunização.¹⁹

Caracterização por imunohistoquímica

Essa etapa foi realizada no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências.

A caracterização por imunohistoquímica também foi realizada após a terceira passagem da cultura, utilizando-se o anticorpo anti-vimentina (Sigma-Aldrich), para confirmação do fenótipo de CTM. Vimentina é uma proteína da família dos filamentos

intermediários, que são uma característica importante das células eucarióticas. Eles compõem o citoesqueleto, juntamente com microtúbulos e microfilamentos de actina. Esse filamento é usado como marcador para tecidos derivados do mesoderma.

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

- 1- Fixação das lâminas em formol tamponado 10% com PBS pH 7,4 durante 5 – 10 minutos.
- 2- Três lavagens de 5 minutos cada, com PBS.
- 3- Permeabilização da membrana com Triton X – 100 0,3% em PBS durante 10 minutos.
A ação do detergente se faz necessária para permeabilizar a membrana plasmática para que os anticorpos atinjam as proteínas no citoplasma.
- 4- Três lavagens de 5 minutos cada, com PBS.
- 5- Bloqueio da peroxidase endógena, com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% em metanol, durante 10 minutos, sem exposição à luz.
- 6- Três lavagens de 5 minutos cada, com PBS com *tween* 20 0,05%.
- 7- Bloqueio protéico com BSA 3% em PBS com *tween* 20 0,05% durante 1 hora.
- 8- Aplicação do anticorpo primário, anti-vimentina, durante 16 horas em câmara úmida a 4°C.
- 9- Três lavagens de 5 minutos cada, com PBS com *tween* 20 0,05%.
- 10- Aplicação do anticorpo secundário durante 1 hora em bancada.
- 11- Três lavagens de 5 minutos cada, com PBS.
- 12- Revelação de 5 minutos com DAB/água/H₂O₂ sem exposição à luz.
- 13- Contra-corar com hematoxilina durante 10 segundos e lavar em água corrente.
- 14- Submeter a desidratação (álcool 70/80/90/100/100/100), álcool-xilol, xilol I, II e III durante 1 minuto cada.
- 15- Montar com permout.

Etapa 3 – Diferenciação condrogênica

Foi utilizado protocolo descrito por Moroz, 2009 e modificado por Silva, 2010.

A microencapsulação das CTMs foi realizada após terceira passagem em cultura, em gel de CP mais fatores para garantir cultura 3D necessária para a diferenciação condrogênica.

Bolsa de CP vencida, descarte de banco de sangue, foi congelada em freezer -30°C e descongelada em temperatura ambiente. Foi adicionado então, 1ml de trombina humana para

a extrusão dos grânulos das plaquetas não rompidos pelo congelamento, e a bolsa foi mantida no banho-maria durante 15 minutos sob agitação constante. Dando continuidade, este CP foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante formado é o que interessa para a produção do gel.

Foi colocado em placas de Petri estéreis, 2ml do CP mais fatores com cuidado para evitar a formação de bolhas. Então, foi adicionado 300µl das CTMs, 130µl de gluconato de cálcio e rapidamente 130µl de trombina humana. Após a gelificação, esperou-se 10 minutos para o acréscimo do MC.



Figura 32. Microencapsulação das CTMs em gel de CP.

O meio de diferenciação condrogênica utilizado foi o Knockout DMEM-F12, sem SFB, suplementado de dexametasona, piruvato de sódio, TGF-β2 e insulina-transferrina-ácido selênico-ácido linoleico (ITS⁺Premix BD Biosciences).¹⁹

As células permaneceram em cultura por 21 dias com trocas do MC três vezes na semana.¹⁹ Foi realizada visualização diária das placas ao microscópio invertido (Zeiss Axiovert[®]).¹⁹ Após 21 dias, os arcabouços foram retirados das placas e encaminhados para análise histológica.¹⁹

Os arcabouços foram fixados em formol 10% para posterior inclusão em historesina.¹⁹ Após o ajuste do micrótomo para realizar cortes histológicos de 5µm de espessura, a microtomia foi realizada.¹⁹ Depois os cortes foram corados com HE e azul de toluidina.¹⁹ A coloração HE foi realizada da seguinte forma: imersão das lâminas em hematoxilina de Harris por 30 minutos; lavagem em água corrente por 10 minutos; imersão em solução diferencial por 1 minuto; imersão em eosina por 5 minutos; lavagem por 10 segundos em água corrente e montagem da lâmina em *permout* e lamínula.¹⁹ A coloração em azul de toluidina ocorre na seguinte sequência: imersão das lâminas neste corante por 5 minutos; lavagem em água corrente por 10 segundos e montagem da lâmina.¹⁹

Etapa 4 – Expansão *ex vivo* do epitélio traqueal

Os animais foram anestesiados, seguindo o mesmo protocolo citado na etapa 1, para a coleta do epitélio pseudo-estratificado respiratório. Para expansão *ex vivo* dessas células, foram realizados cinco protocolos, seguindo indicações de literatura especializada e propostas originais. Esses protocolos foram denominados: Fragmentos traqueais; Lavado traqueal; Raspado traqueal; *Punch* dermatológico de 2mm e Digestão enzimática.

O MC utilizado nesses cinco protocolos foi o de queratinócitos sem soro fetal (Invitrogen), suplementado com 25µg/ml de extrato de pituitária bovina, 0,4ng/ml de fator de crescimento epidermal recombinante, e 0,03mmol/l de cloreto de cálcio; sendo que o MC foi trocado três vezes na semana.

Fragmentos traqueais

Pequena abertura na traquéia, a 1 cm da laringe, foi realizada e dois anéis traqueais foram retirados. Esses anéis foram transportados ao laboratório de Engenharia Celular em solução estéril de HEPES contendo penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/ml). Em fluxo laminar, esses anéis traqueais foram fragmentados em amostras de 4-5 mm de tamanho, e colocadas em frasco de 25cm² (NuncTM) com MC apropriado, citado acima.

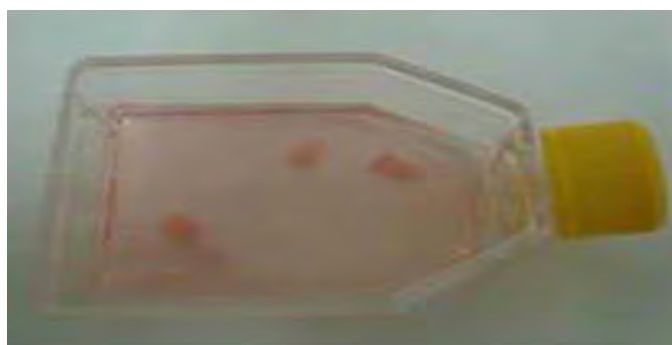


Figura 33. Frasco T25 cm² com os fragmentos traqueais e MC apropriado.

Lavado traqueal

Solução fisiológica foi injetada, com auxílio de seringa estéril, através de uma fissura realizada cirurgicamente na traquéia. Rapidamente, parte dessa solução foi sugada; já que a maioria vai direto para os pulmões. Essa solução foi transferida para um tubo Falcon estéril, e posteriormente, foi plaqueada em frasco de 25cm² (NuncTM) com MC apropriado.

Raspado traqueal

Pequena abertura na traquéia, a 1 cm da laringe, foi realizada e dois anéis traqueais foram coletados. Esses anéis foram transportados ao laboratório de Engenharia Celular em solução estéril de HEPES contendo penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/ml). Em fluxo laminar, esses anéis traqueais foram abertos e, com auxílio de tesoura estéril, raspagens da luz traqueal foram realizadas. Posteriormente, esses raspados, visíveis a olho nu, foram plaqueados em frasco de 25cm² (Nunc™) com MC apropriado.



Figura 34. Frasco T25 cm² com os raspados traqueais e MC apropriado.

Punch dermatológico de 2 mm

Pequena incisão na traquéia foi realizada, o *punch* dermatológico foi aplicado através dessa fissura e um fragmento de 2 mm foi retirado da luz traqueal. Esse fragmento foi transportado ao laboratório de Engenharia Celular em solução estéril de HEPES contendo penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/ml). Em fluxo laminar, ele foi plaqueado em frasco de 25cm² (Nunc™) com MC apropriado.

Digestão enzimática

As biópsias do epitélio pseudo-estratificado respiratório foram retiradas e colocadas em PBS a 4°C.¹ Foram transportadas em PBS gelado contendo penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/ml) e colocadas em etanol a 70% por 30 segundos, e em seguida, em uma solução contendo 5 mL de tripsina a 1% (Sigma-Aldrich), 15ml de PBS e 800µl de penicilina e estreptomicina em um tubo de centrifuga de um dia para o outro a 4°C.¹ Após 24 horas, os tecidos foram aquecidos a 37°C por 45 minutos.¹ Para neutralizar a solução de tripsina, foi adicionado meio completo DMEM com SFB 10% (PAA, Yeovil, UK), penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/ml).¹ Feito isso, a suspensão celular foi centrifugada a

1000 rpm por 10 minutos, o *pellet* celular foi ressuspensionado em DMEM completo, as células foram semeadas em um volume final de 5 ml nos frascos de 25 cm², e as culturas foram colocadas na estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 2-3 dias para aderência.¹ Depois o MC foi alterado para o específico de queratinócitos.¹

Caracterização por imunohistoquímica

Essa etapa foi realizada no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências.

Após a primeira passagem, a imunohistoquímica 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 através da ligação da beta-catenina à proteína transmembrana caderina.

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

- 1- Fixação das lâminas em formol tamponado 10% com PBS pH 7,4 durante 5 – 10 minutos.
- 2- Três lavagens de 5 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 5 minutos cada, com PBS com tween 20 0,05%.
- 5- Bloqueio protéico com BSA 3% em PBS com tween 20 0,05% durante 1 hora.
- 6- Aplicação do anticorpo primário, beta-catenina (Dako), durante 16 horas em câmara úmida a 4°C.
- 7- Três lavagens de 5 minutos cada, com PBS com tween 20 0,05%.
- 8- Aplicação do anticorpo secundário durante 1 hora em bancada.
- 9- Três lavagens de 5 minutos cada, com PBS.
- 10- Revelação de 5 minutos com DAB/água/H₂O₂ sem exposição à luz.
- 11- Contra-corar com hematoxilina durante 10 segundos e lavar em água corrente.
- 12- Submeter a desidratação (álcool 70/80/90/100/100/100), álcool-xilol, xilol I, II e III durante 1 minuto cada.
- 13- Montar com permout.

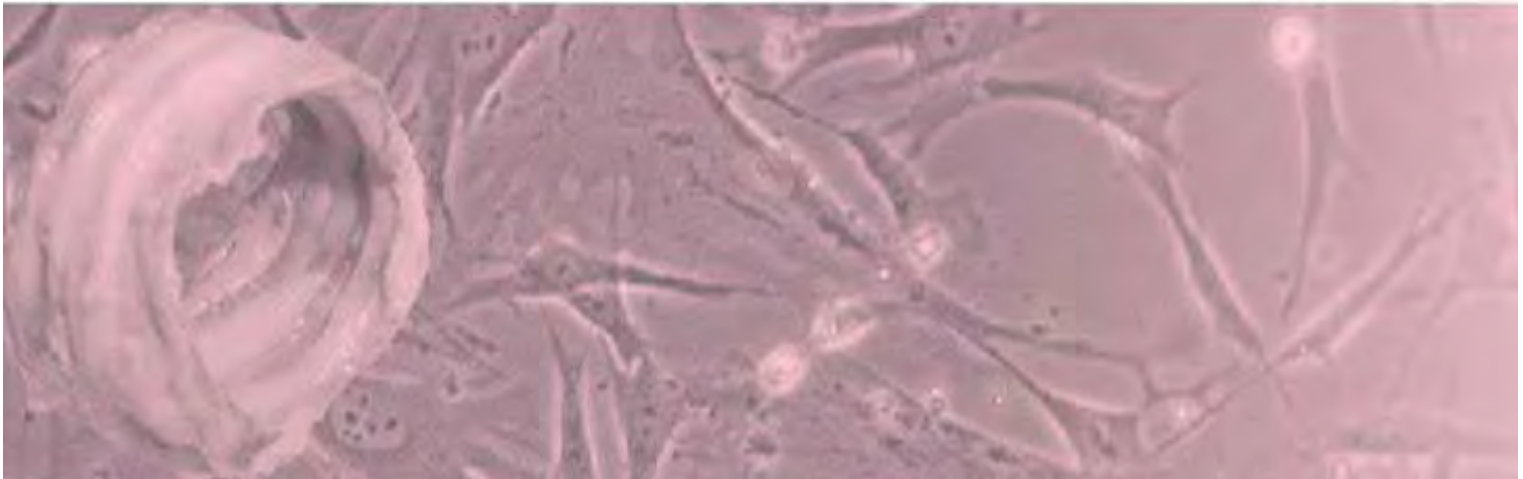
Etapa 5 – Aplicação das CERs na face interna da traquéia descelularizada

Em fluxo laminar, as traquéias descelularizadas com os três protocolos validados na etapa 1, foram separadas em placas de Petri estéreis. Sondas nasogástricas NR12 estéreis (tubo de PVC atóxico siliconizado - Embramed) foram colocadas no interior dessas traquéias e uma das extremidades das traquéias foram fechadas com auxílio de fio nylon nº 6.0 (tubo de PVC atóxico siliconizado - Embramed), também estéril. Então, com uma pipeta, 1×10^6 CERs foram aplicadas em MC de queratinócitos, entre a face externa da sonda nasogástrica e a luz traqueal. Posteriormente, as outras extremidades das traquéias foram fechadas com fio nylon nº 6.0 (tubo de PVC atóxico siliconizado – Embramed) e foram mantidas em cultura durante uma semana, tempo necessário para aderência das CERs na luz das traquéias. Após este período, essas traquéias foram preparadas para análise histológica e coradas com HE.



Figura 35. Traquéia descelularizada com sonda nasogástrica NR12 na sua luz. As duas extremidades da traquéia fechadas com fio nylon nº 6.0 para manter as CERs no seu interior.

Resultados e Discussão



IV – Resultados e Discussão

Etapa 1 – Obtenção da traquéia como arcabouço

Através da colaboração de diferentes alunos de pós-graduação, foi possível realizar a formação de um banco de traquéias, com um n de aproximadamente 40 traquéias.

Independentemente da diversidade dos protocolos, após os tratamentos químicos, os segmentos traqueais ficaram opacos, com cor perolada, mais rígidos ao toque e não friáveis, como demonstrado na Figura 36.

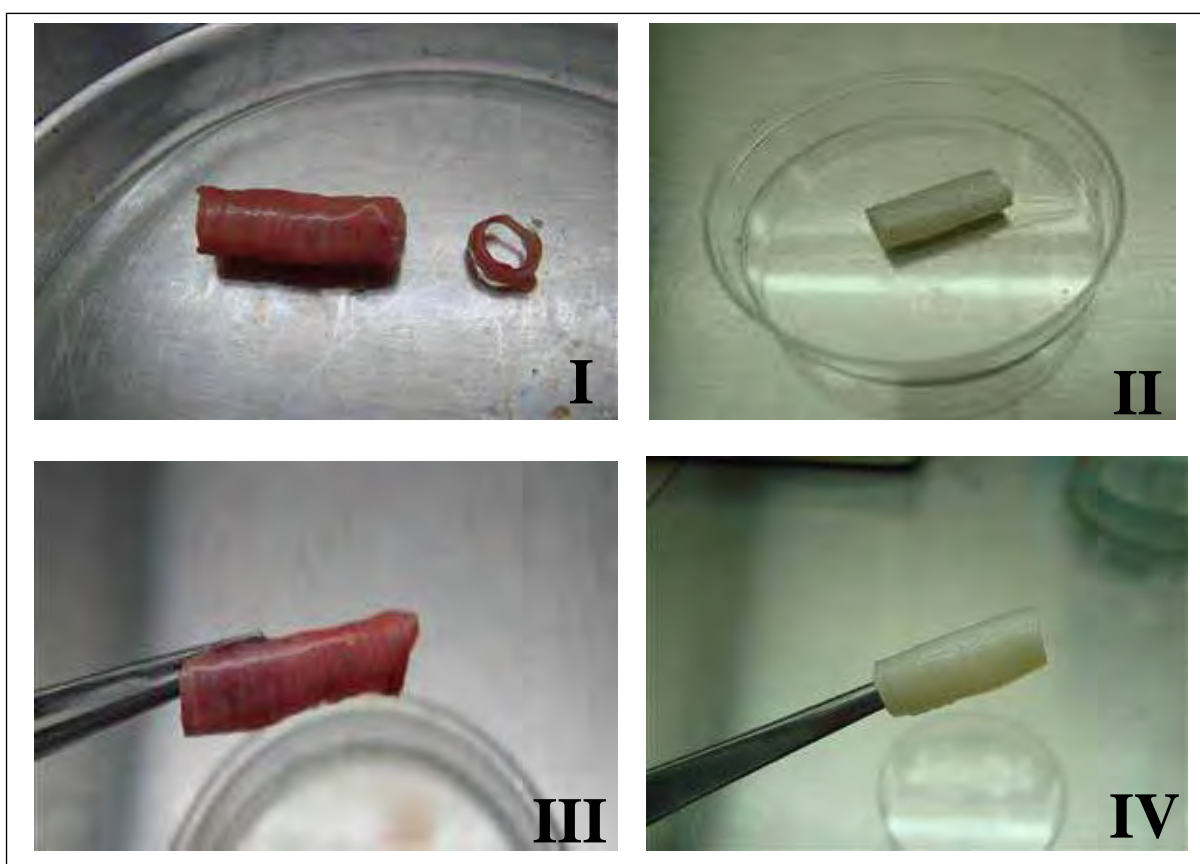


Figura 36. Traquéias pré e pós descellularização. **I e III** – Traquéias pré-tratamento. **II e IV** – Traquéias pós-tratamento.

As traquéias tratadas com o detergente SDS na concentração de 2% apresentaram uma característica não identificada nas traquéias tratadas com Triton X-100 2% ou DS 4%. Sistemáticamente, as traquéias tratadas com SDS ficaram mais rígidas ao final dos tratamentos, enrijecimento este que determinou uma apresentação semi-circular (formato de C). Este fato se deve à provável destruição da matriz extracelular. Na Figura 37 observa-se o aspecto das traquéias após tratamento por DS, SDS e Triton X - 100 respectivamente.

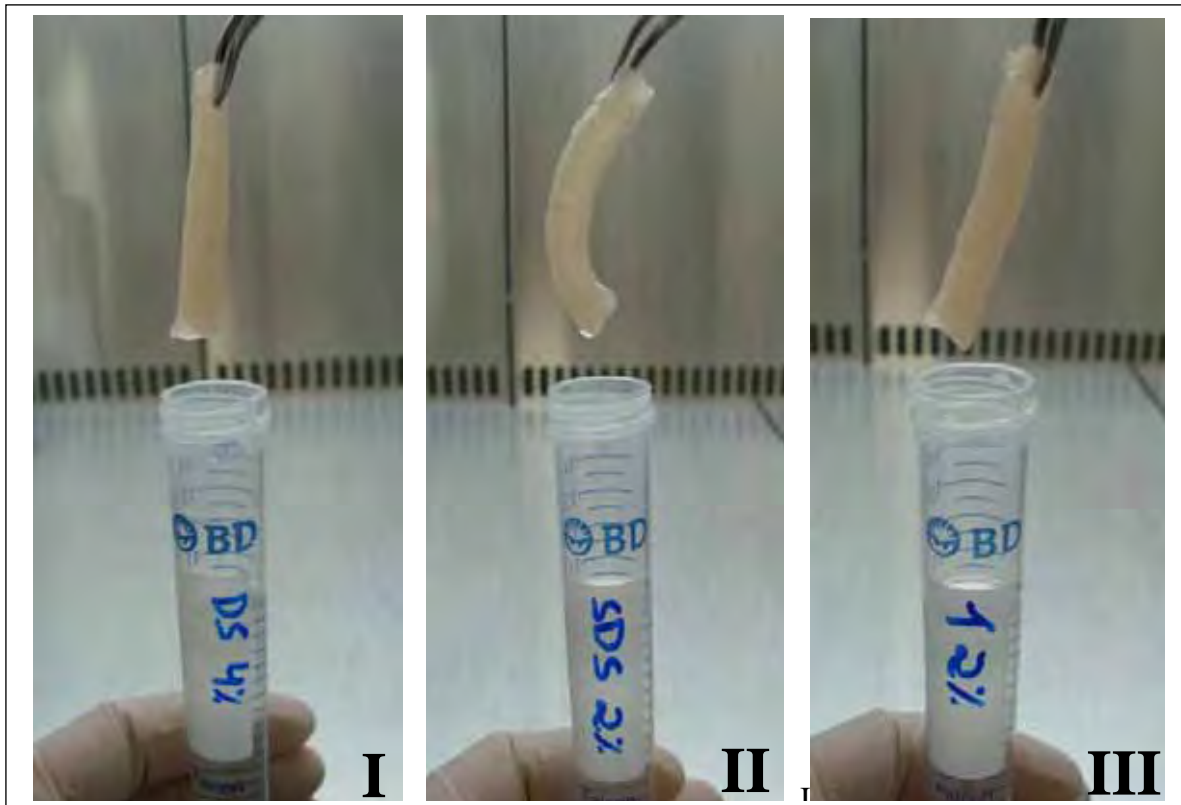


Figura 37. Comparação das traquéias após os tratamentos de descélularização com diferentes detergentes. **I** – Traquéia tratada com Deoxicolato de Sódio 4% durante 48 horas. **II** – Traquéia tratada com SDS 2% durante 48 horas. **III** – Traquéia tratada com Triton X-100 2% durante 48 horas.

Conforme descrito nos Materiais e Métodos, uma diversidade de protocolos foi testada. A seguir analisaremos particularidades de cada protocolo.

Primeiro protocolo

No tratamento com SDS 0,1%, a 37° C, por um período de 15 horas, sob agitação, observa-se destruição parcial do tecido da traquéia, com sinais de calcificação; e ainda há presença de núcleos. Assim, o protocolo não foi validado.

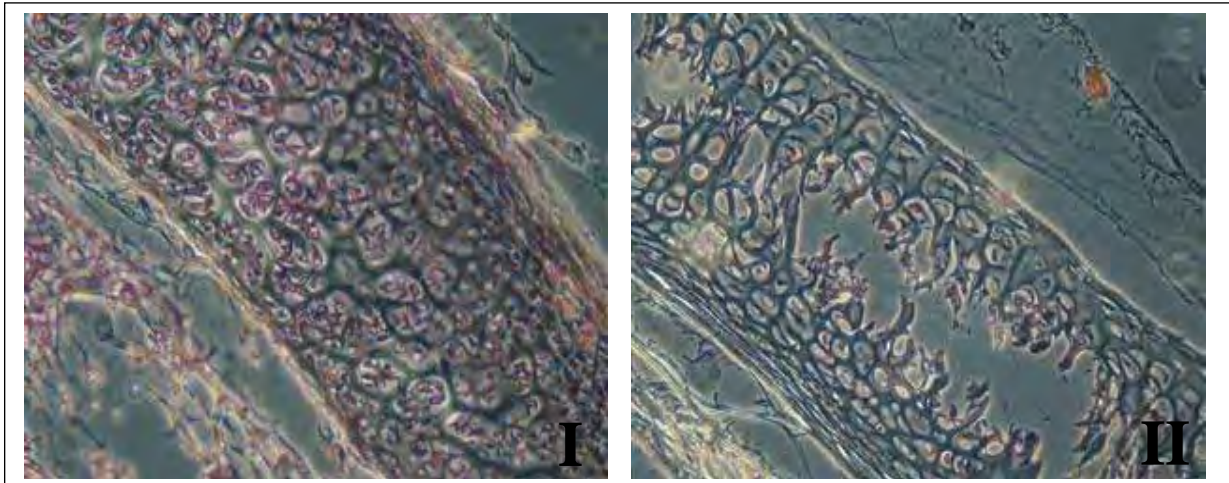


Figura 38. Traquéias pré e pós descclularização com SDS 0,1% por 15 horas.
I – Traquéia pré-tratamento. **II** – Traquéia pós-tratamento.

Quitzan, 2009 utiliza esse protocolo para descclularizar artérias e o SDS nessa concentração se mostrou eficiente; porém, a traquéia é formada por cartilagem bastante rígida e isso dificulta a descclularização. Por isso, foi necessário aumentar a concentração desse detergente nos protocolos seguintes.

Segundo protocolo

Este protocolo tem como objetivo identificar a contribuição dos diferentes detergentes em presença ou não de enzimas sob a ação do tempo.

No controle de 8 horas, observa-se um aspecto histológico normal. No controle de 24 horas, o tecido conjuntivo frouxo mais externo apresenta-se mais friável e a cartilagem mantém-se íntegra, com lacunas e núcleos de condrócitos evidentes.

É notável que, mesmo com aumento de 10 a 20 X a concentração do detergente SDS, associado ao uso de RNase e DNase, não houve diferença histológica. Ocorreu a ruptura interna da cartilagem com sinais de calcificação, mas permanecem íntegros os núcleos. Nem mesmo com o uso dos tratamentos mais longos (24h) ocorreu eliminação completa de DNA.

Nossos achados corroboram com Elder e cols. 2009.¹⁶ Os autores descrevem que isso pode ter ocorrido porque o SDS alcançou eficientemente uma lise completa das membranas nucleares e celulares, porém o tratamento das enzimas não degradou o DNA completamente.¹⁶ Possivelmente, o mesmo deve ter ocorrido ao associar Triton X – 100 2% às enzimas. O aumento na quantidade de nucleases poderia determinar melhores resultados.¹⁶ Assim, verificou-se que o uso das enzimas nas concentrações utilizadas não contribui nos protocolos de descclularização. A literatura especializada já aponta que elevadas quantidades

de enzima devem ser utilizadas para se obter resultados satisfatórios.¹ Levando em consideração custo-benefício, essa técnica não foi validada.

Ao comparar os detergentes Triton X-100 e SDS em concentrações idênticas (2%), observa-se que o Triton X-100 aparece como menos agressivo na descclularização do que o SDS em relação à destruição da matriz extracelular restante. Possivelmente, essa destruição ocorre devido ao SDS ser um detergente iônico. Como já foi dito anteriormente, os detergentes iônicos são eficientes na solubilização das membranas celulares citoplasmáticas e nucleares, mas tendem desnaturar as proteínas rompendo as interações proteína-proteína.^{35,21} Além disso, as traquéias tratadas com SDS apresentam maior rigidez, o que dificulta a microtomia, provocando quebra do material.

Já os detergentes não-iônicos, como o Triton X - 100 agem de forma mais suave nas estruturas teciduais. Este detergente rompe as interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, mas não altera a conformação funcional. As interações proteína-proteína dos tecidos permanecem intactas.³⁵ O Triton X-100 é menos prejudicial ao conteúdo glicosaminoglicanas, quando comparado com outros agentes de descclularização.^{37,38}

Dessa maneira, nenhum dos diferentes protocolos testados apresentou eficiência, sob o ponto de vista histológico.

Estes resultados podem ser visualizados nas Figuras 39 e 40.

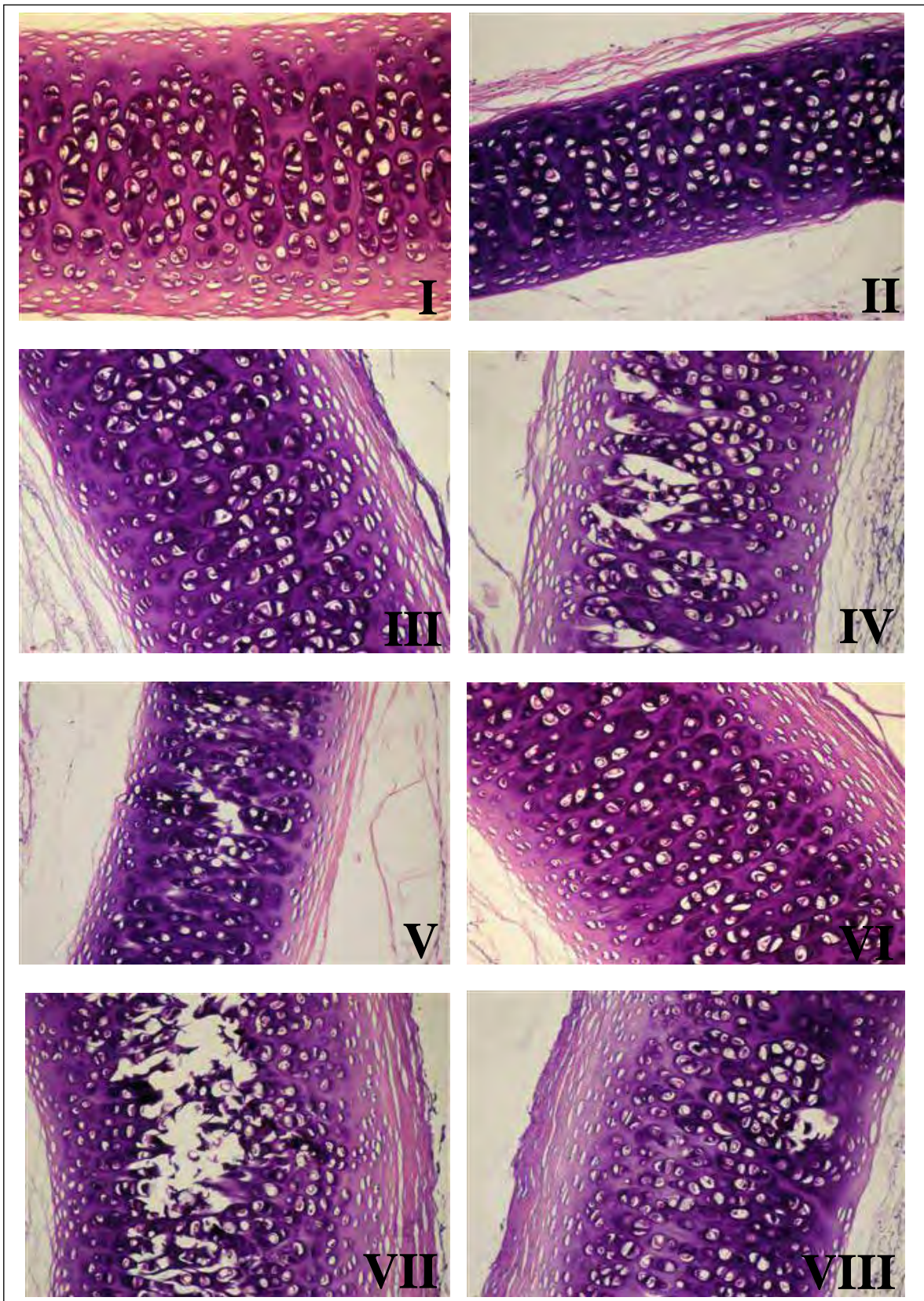


Figura 39. Histologia do segundo protocolo. **I** – Controle – 8h. **II** – Controle – 24h. **III** – SDS 1% com enzima – 8h. **IV** – SDS 1% sem enzima – 8h. **V** - SDS 1% com enzima – 24h. **VI** - SDS 1% sem enzima – 24h. **VII**- SDS 2% com enzima – 8h. **VIII** - SDS 2% sem enzima – 8h.

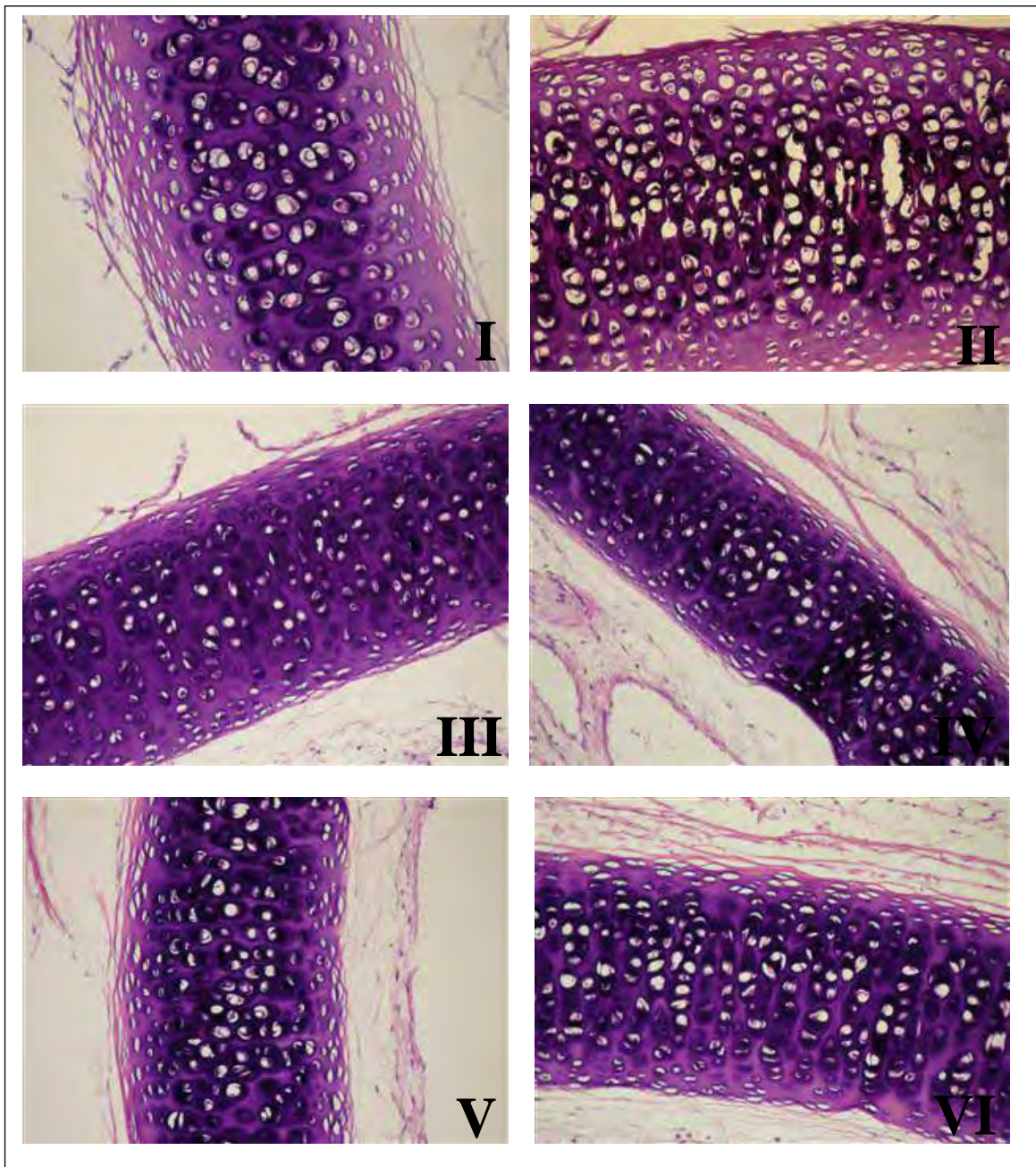


Figura 40. Histologia do segundo protocolo. **I** - SDS 2% com enzima – 24h. **II**- SDS 2% sem enzima – 24h. **III** – Triton X-100 2% com enzima – 8h. **IV** – Triton X-100 2% sem enzima – 8h. **V** - Triton X-100 2% com enzima – 24h. **VI** - Triton X-100 2% sem enzima – 24h.

Terceiro protocolo

Para facilitar a visualização dos resultados, as características histológicas deste terceiro protocolo foram divididas em cinco quadros, respectivos às três tabelas dos materiais e métodos.

O objetivo deste protocolo foi determinar a contribuição da pressão mecânica, associada aos detergentes (SDS e Triton X-100) sob a ação do tempo. Observa-se que a pressão mecânica não trouxe nenhuma contribuição efetiva aos protocolos de descelularização, ou seja, a pressão mecânica não facilitou o desprendimento celular, apenas dissociou os tecidos de sustentação das traquéias. Este resultado já era esperado, pois a pressão mecânica só é eficiente nos tecidos e órgãos que não apresentam uma matriz extracelular organizada de forma tão densa.³⁵ Na Figura 41, confere-se os resultados referentes a Figura 21 dos materiais e métodos, juntamente com os controles da reação.

Com relação à irradiação com LED, foi possível observar que as traquéias irradiadas com LED no comprimento de onda de 630nm +/- 20nm na dose de 15J/cm² apresentaram um aumento na dimensão da sua cartilagem, assumindo o oposto do objetivo dos protocolos de descelularização, isto é, ocorreu proliferação celular. A literatura mostra que a irradiação com LED 630nm +/- 20nm em doses inferiores a 10J/cm² estimula a proliferação celular.^{48,49} Observa-se esse estímulo também na dose de 15J/cm².

Já o tecido cartilaginoso submetido à irradiação com LED no comprimento de onda de 475nm +/- 20 nm na dose de 15J/cm² apresentou várias lacunas sem células, como esperado; já que o LED 475 nm +/- 20 nm em doses superiores a 10J/cm² provoca dano celular.^{48,49} Porém, mesmo nessas lâminas ainda há células presentes; por isso a necessidade de se aumentar a intensidade da irradiação com LED no comprimento de onda de 475nm +/- 20 nm e os tempos de tratamentos com os detergentes.

As Figuras 42 e 43 demonstram esses resultados, referentes a Figura 22 dos materiais e métodos.

Ao associar pressão mecânica, irradiação com LED nos comprimentos de onda 475nm +/- 20nm e 630nm +/- 20nm na dose de 15J/cm², e tratamentos químicos, observa-se os mesmos resultados citados nos parágrafos anteriores, assim, pode-se reafirmar que a pressão mecânica não contribui de forma visível no desprendimento celular. Estes resultados podem ser visualizados nas Figuras 44 e 45, e são referentes aos protocolos da Figura 23 dos materiais e métodos.

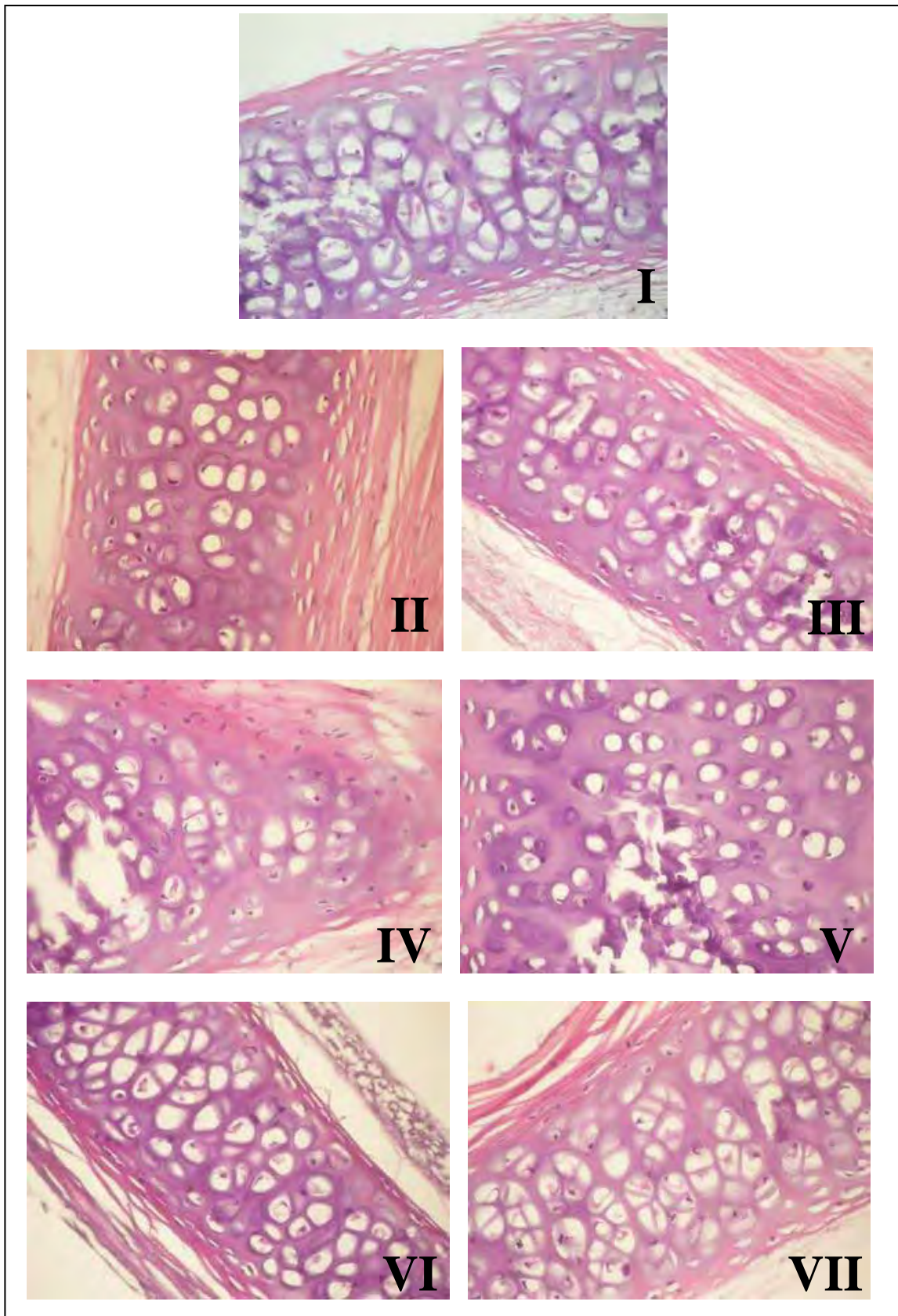


Figura 41. Histologia do terceiro protocolo. **I** - Controle - 24h. **II**- Controle pressão mecânica - 8h. **III** - Controle pressão mecânica - 24h. **IV** - Pressão mecânica + Triton X-100 2% - 8h. **V** - Pressão mecânica + Triton X-100 2% - 24h. **VI** - Pressão mecânica + SDS 2% - 8h. **VII** - Pressão mecânica + SDS 2% - 24h.

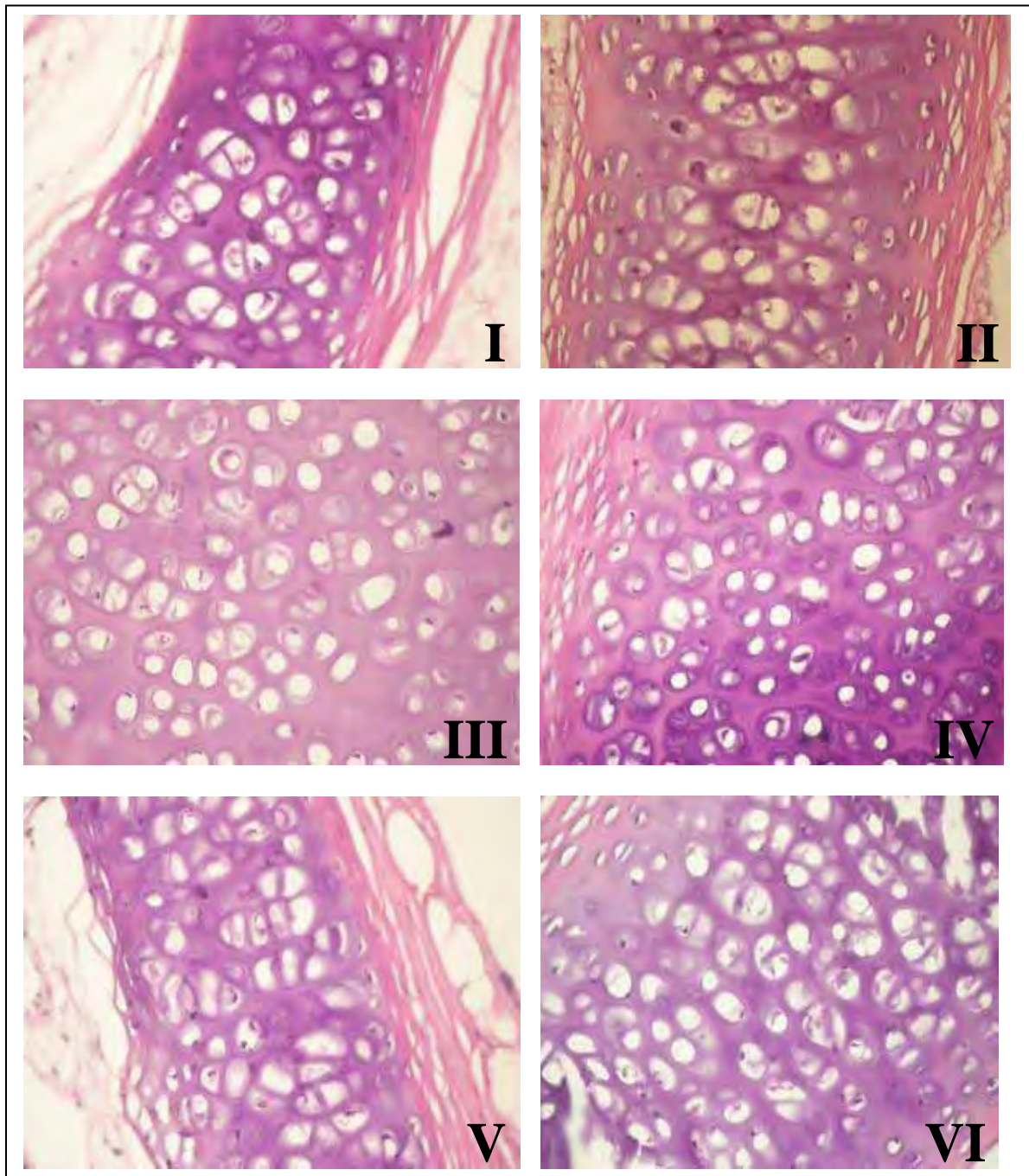


Figura 42. Histologia do terceiro protocolo. **I** - Controle LED 475nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ - 8h. **II**- Controle LED 475nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ - 24h. **III** - Controle LED 630nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ - 8h. **IV** - Controle LED 630nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ - 24h. **V** - LED 475nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + Triton X-100 2% - 8h. **VI** - LED 475nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + Triton X-100 2% - 24h.

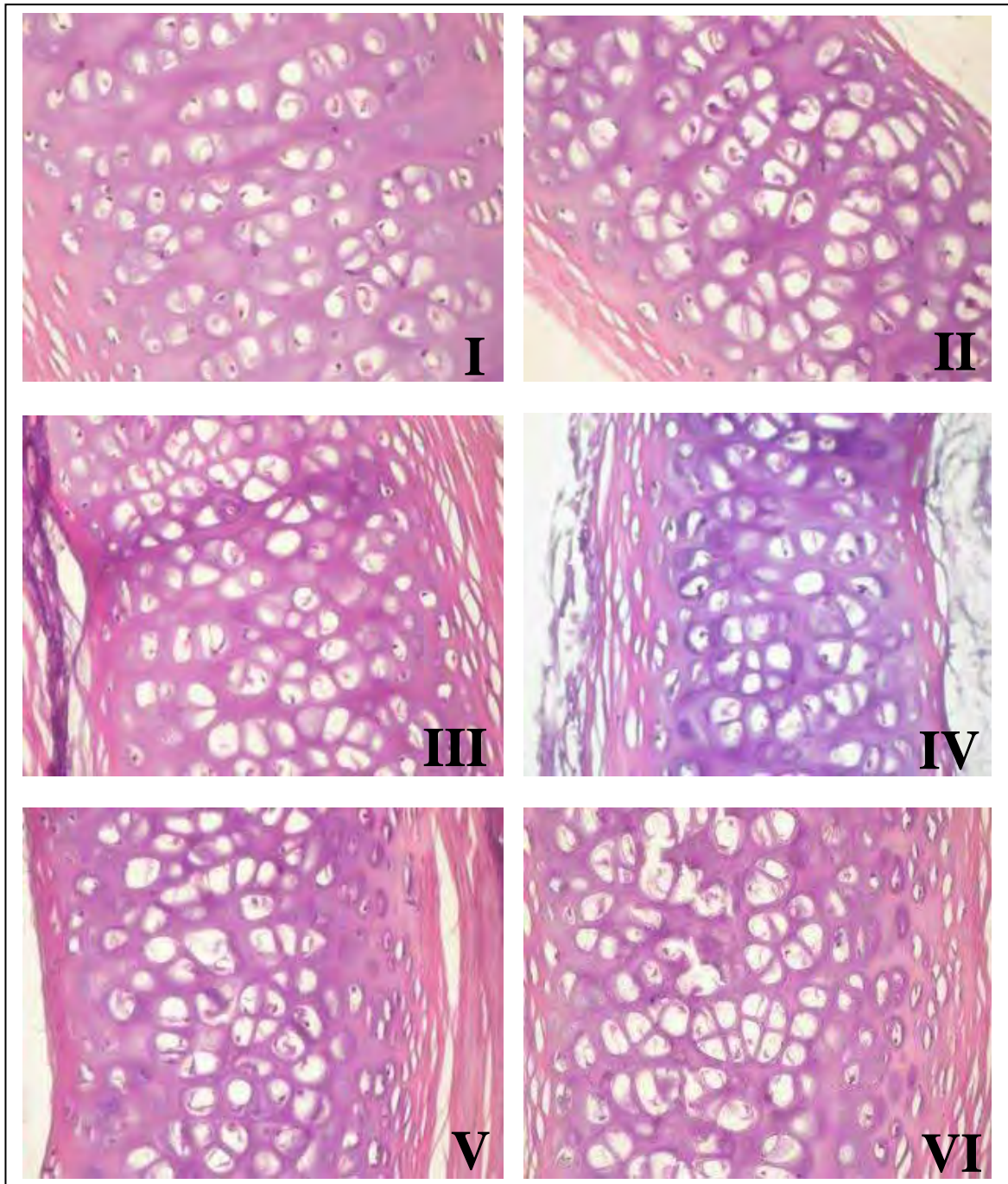


Figura 43. Histologia do terceiro protocolo. **I** - LED 630nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + Triton X-100 2% - 8h. **II**- LED 630nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + Triton X-100 2% - 24h. **III** - LED 475nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + SDS 2% - 8h. **IV** - LED 475nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + SDS 2% - 24h. **V** - LED 630nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + SDS 2% - 8h. **VI** - LED 630nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + SDS 2% - 24h.

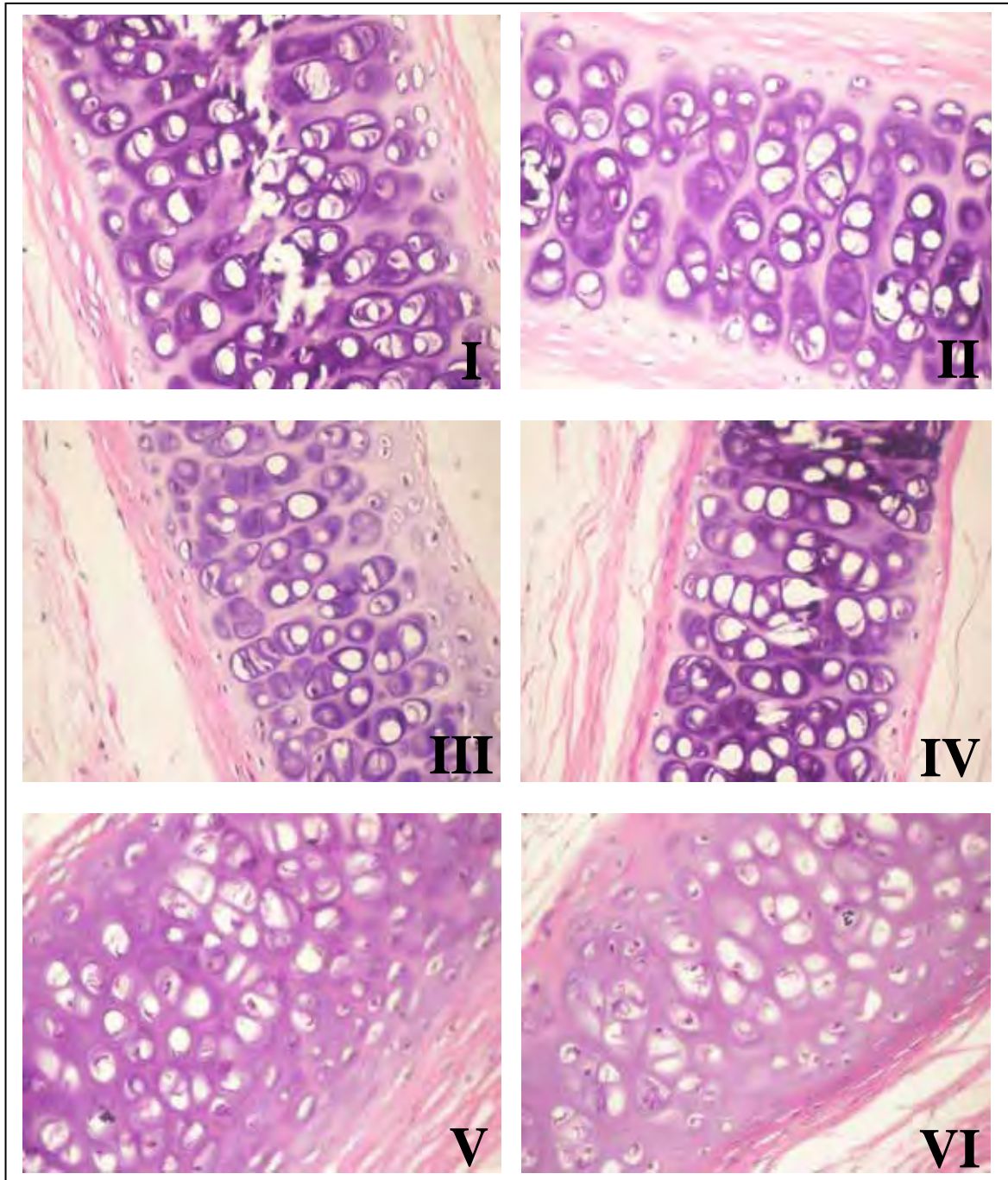


Figura 44. Histologia do terceiro protocolo. **I** – Controle pressão mecânica + LED 475nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ - 8h. **II**- Controle pressão mecânica + LED 475nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ - 24h. **III** – Controle pressão mecânica + LED 630nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ - 8h. **IV** – Controle pressão mecânica + LED 630nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ - 24h. **V** – Pressão mecânica + LED 475nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + Triton X - 100 2% - 8h. **VI** – Pressão mecânica + LED 475nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + Triton X - 100 2% - 24h.

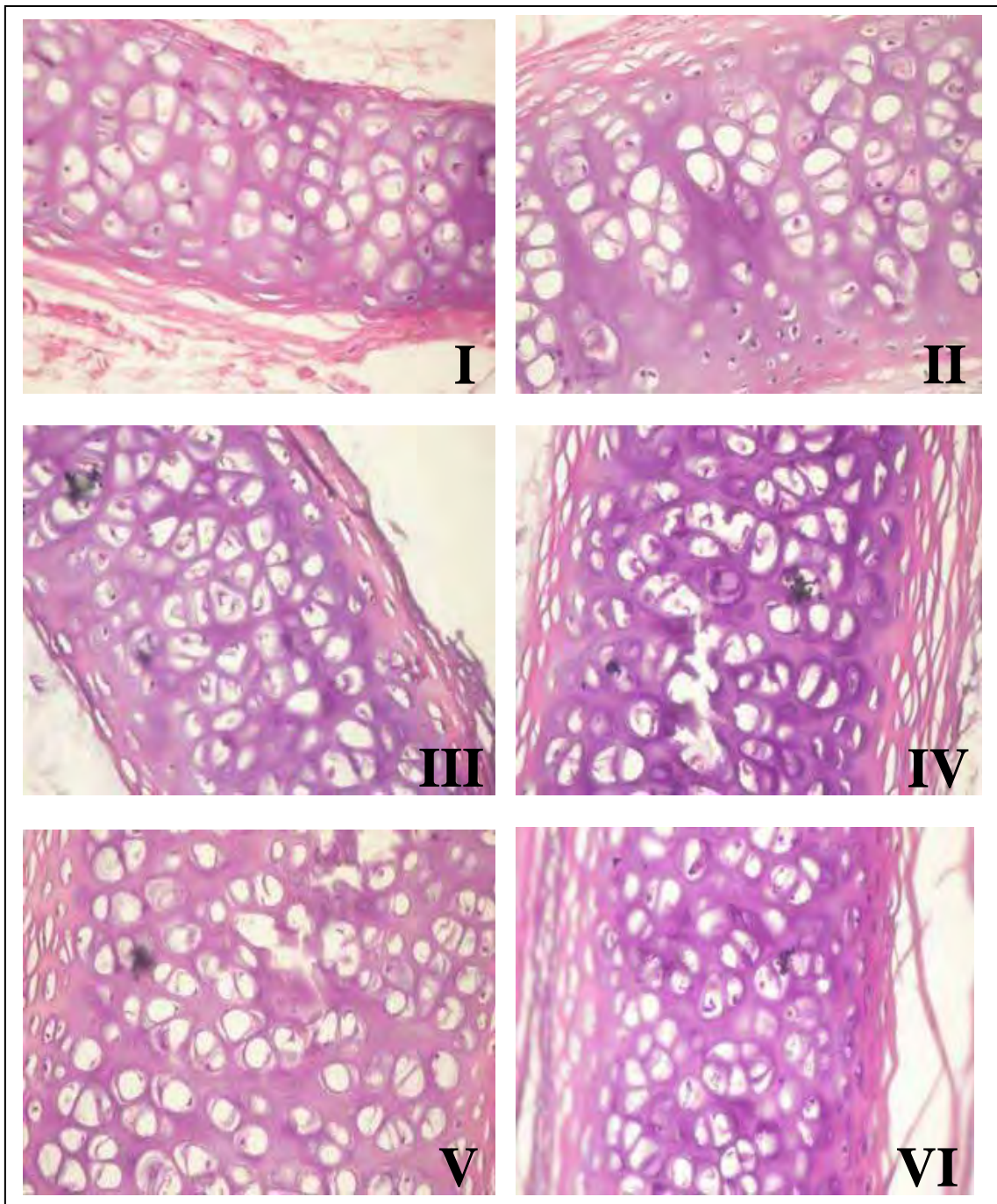


Figura 45. Histologia do terceiro protocolo. **I** – Pressão mecânica + LED 630nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + Triton X – 100 2% – 8h. **II**- Pressão mecânica + LED 630nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + Triton X – 100 2% – 24h. **III** – Pressão mecânica + LED 475nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + SDS 2% – 8h. **IV** – Pressão mecânica + LED 475nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + SDS 2% - 24h. **V** – Pressão mecânica + LED 630nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + SDS 2% – 8h. **VI** – Pressão mecânica + LED 630nm na dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$ + SDS 2% – 24h.

Quarto protocolo

Como demonstrado, a irradiação com o LED no comprimento de onda de 475nm +/- 20nm na dose de 15 J/cm² não foi suficiente para retirar os núcleos, então, foi preciso aumentar a intensidade da irradiação. As irradiações desse LED nas doses de 30J/cm², 60J/cm² e 90J/cm² foram testadas; e a irradiação mais intensa, a de 90J/cm² foi também a mais eficiente (Figura 46).

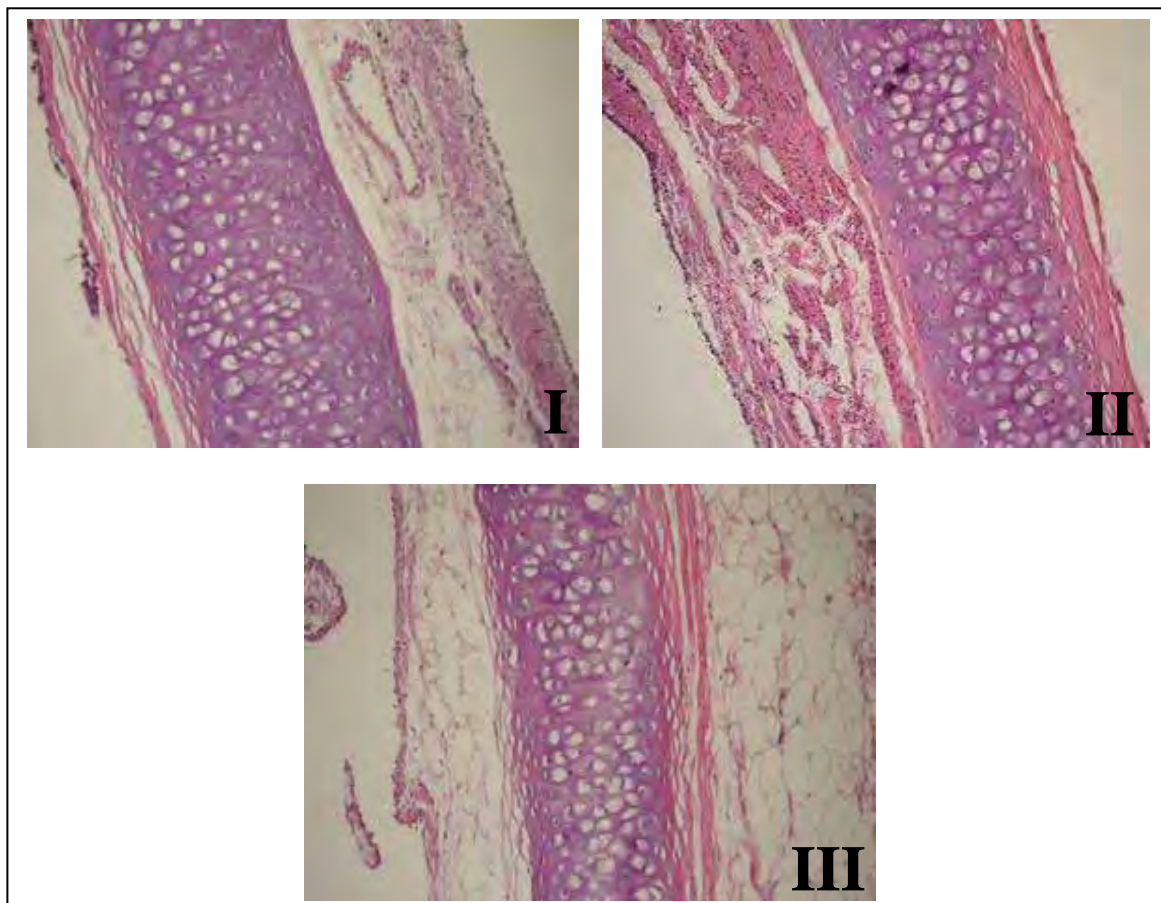


Figura 46. Primeira etapa do quarto protocolo. **I** – Traquéia irradiada com LED 475nm na dose de 30J/cm². **II**- Traquéia irradiada com LED 475nm na dose de 60J/cm². **III** – Traquéia irradiada com LED 475nm na dose de 90J/cm².

Assim, essas traquéias irradiadas com LED no comprimento de onda 475nm +/- 20nm na dose de 90J/cm² foram submetidas aos tratamentos químicos (SDS, Triton X-100 e DS) na segunda etapa deste protocolo. Estes resultados, referentes à Figura 24 dos materiais e métodos poderão ser visualizados na Figura 47. Não houve diferença significativa, em relação à quantidade de núcleos remanescentes, nos três tratamentos comparados: LED 475nm na dose de 90J/cm² associado aos detergentes (SDS 2%, Triton X – 100 2% e DS 4%) durante 48 horas. Nessas três lâminas observam-se apenas restos celulares.

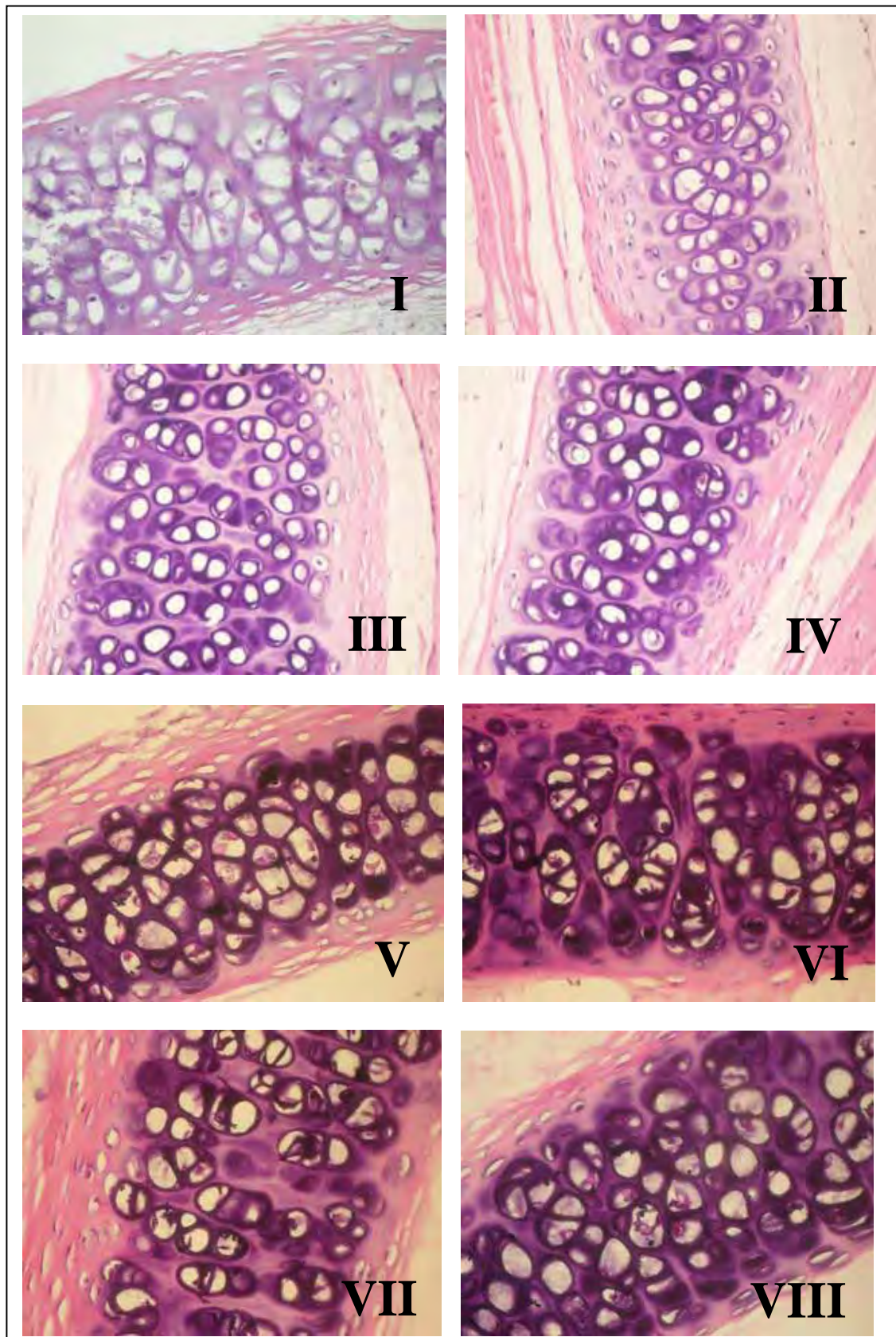


Figura 47. Segunda etapa do quarto protocolo. **I** – Controle - 24h. **II**- Controle – 48h. **III** – Controle LED 475nm na dose de $90\text{J}/\text{cm}^2$ – 24h. **IV** – Controle LED 475nm na dose de $90\text{J}/\text{cm}^2$ – 48h. **V** – LED 475nm na dose de $90\text{J}/\text{cm}^2$ + SDS 2% – 48h. **VI** – LED 475nm na dose de $90\text{J}/\text{cm}^2$ + Triton X – 100 2% - 48h. **VII** – LED 475nm na dose de $90\text{J}/\text{cm}^2$ + DS 4% - 24h. **VIII** – LED 475nm na dose de $90\text{J}/\text{cm}^2$ + DS 4% - 48h.

O quadro abaixo resume os resultados dos diferentes protocolos de descelularização realizados com os seus respectivos resultados, levando em consideração o tempo de ação dos detergentes, a presença de núcleos nas células, quantidade de lacunas representando ou não a proliferação celular e aspecto do pericôndrio.

Protocolo	T(h)	Núcleos	Quantidade de lacunas	Pericôndrio
SDS 0,1%	15	••••••	Normal	Frouxo
SDS 1% c/E	8	••••••	Normal	Descolando, frouxo
SDS 1% s/E	8	••••••	Normal	Descolando, frouxo
SDS 1% c/E	24	••••••	Normal	Descolando, frouxo
SDS 1% s/E	24	••••••	Normal	Descolando, frouxo
SDS 2% c/E	8	••••••	Normal	Descolando, frouxo
SDS 2% s/E	8	••••••	Normal	Descolando, frouxo
SDS 2% c/E	24	••••••	Normal	Descolando, frouxo
SDS 2% s/E	24	••••••	Normal	Descolando, frouxo
Triton X – 100 2% c/E	8	••••••	Normal	Normal
Triton X – 100 2% s/E	8	••••••	Normal	Normal
Triton X – 100 2% c/E	24	••••••	Normal	Normal
Triton X – 100 2% s/E	24	••••••	Normal	Normal
PM + SDS 2%	8	••••••	Normal	Descolando, frouxo
PM + SDS 2%	24	••••••	Normal	Descolando, frouxo
PM + Triton X - 100 2%	8	••••••	Normal	Normal
PM + Triton X - 100 2%	24	••••••	Normal	Normal
LED 475nm 15J/cm ² + SDS 2%	8	••••••	Normal	Descolando, frouxo
LED 475nm 15J/cm ² + SDS 2%	24	••••••	Normal	Descolando, frouxo
LED 630nm 15J/cm ² + SDS 2%	8	••••••	↑↑	Descolando, frouxo
LED 630nm 15J/cm ² + SDS 2%	24	••••••	↑↑	Descolando, frouxo
LED 475nm 15J/cm ² + Triton X-100 2%	8	••••••	Normal	Normal
LED 475nm 15J/cm ² + Triton X-100 2%	24	••••••	Normal	Normal
LED 630nm 15J/cm ² + Triton X-100 2%	8	••••••	↑↑	Normal
LED 630nm 15J/cm ² + Triton X-100 2%	24	••••••	↑↑	Normal
LED 475nm 90J/cm ² + SDS 2%	48	••	Normal	Descolando, frouxo
LED 475nm 90J/cm ² + Triton X - 100 2%	48	••	Normal	Normal
LED 475nm 90J/cm ² + DS 4%	24	••••••	Normal	Normal
LED 475nm 90J/cm ² + DS 4%	48	••	Normal	Normal

Figura 48. Quadro resumo dos diferentes protocolos de descelularização.

Protocolos de descelularização validados

Constatou-se que os protocolos de descelularização validados, sob o ponto de vista histológico, foram:

- 1- Congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)* + irradiação do LED com comprimento de onda de 475nm +/- 20 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 30 minutos de exposição + detergente **DS 4%** durante 48 horas.
- 2- Congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)* + irradiação do LED com comprimento de onda de 475nm +/- 10 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 30 minutos de exposição + detergente **SDS 2%** durante 48 horas.
- 3- Congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)* + irradiação do LED com comprimento de onda de 475nm +/- 10 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 30 minutos de exposição + detergente **Triton X - 100 2%** durante 48 horas.

Implante dos segmentos traqueais *in vivo*

Ao comparar os resultados dos protocolos validados, com relação à quantidade de núcleos remanescentes após os tratamentos de descelularização, não se observou diferença significativa entre os três diferentes detergentes utilizados; porém, quanto à ação desses detergentes no pericôndrio, constatou-se que o SDS é o mais eficiente, já que os pericôndrios das traquéias tratadas com DS e Triton X – 100 permaneceram normais e os pericôndrios das traquéias tratadas com SDS se encontram descolando e frouxos, como apresentado no quadro resumo 48.

Entretanto, apenas com esses achados, não se pode elencar um dos três detergentes como o mais eficiente nos protocolos de descelularização de traquéias para aplicação *in vivo*. Assim fez-se necessária à realização do implante *in vivo* intra-dérmico nas orelhas de outros coelhos para analisar a supremacia de um dos detergentes. Nesta etapa verificou-se a eficácia da descelularização, a toxicidade residual ao organismo após o implante, e também se a presença dos restos celulares seria capaz de induzir uma resposta imune do hospedeiro, já que o nível exato de descelularização tecidual necessário para eliminar a resposta imunológica não é claro.^{1,16} Um estudo recente demonstrou que vários materiais de suportes de matriz

extracelular disponíveis comercialmente apresentam quantidades mensuráveis de DNA e são usado clinicamente com sucesso.¹⁶

Evolução do implante do segmento traqueal tratado com Deoxicolato de Sódio 4%

No implante do anel tratado com DS 4% após 6 dias, observou-se processo inflamatório peri-traqueal pouco expressivo, dificuldade de cicatrização de pele e discreta congestão venosa (seta), como demonstrado na Figura 49-II. Na Figura 49-III, observa-se cicatrização completa do implante após 30 dias. Após o sacrifício do coelho, a região peri-traqueal da orelha foi retirada, na figura 49-IV evidencia-se o fragmento traqueal íntegro.

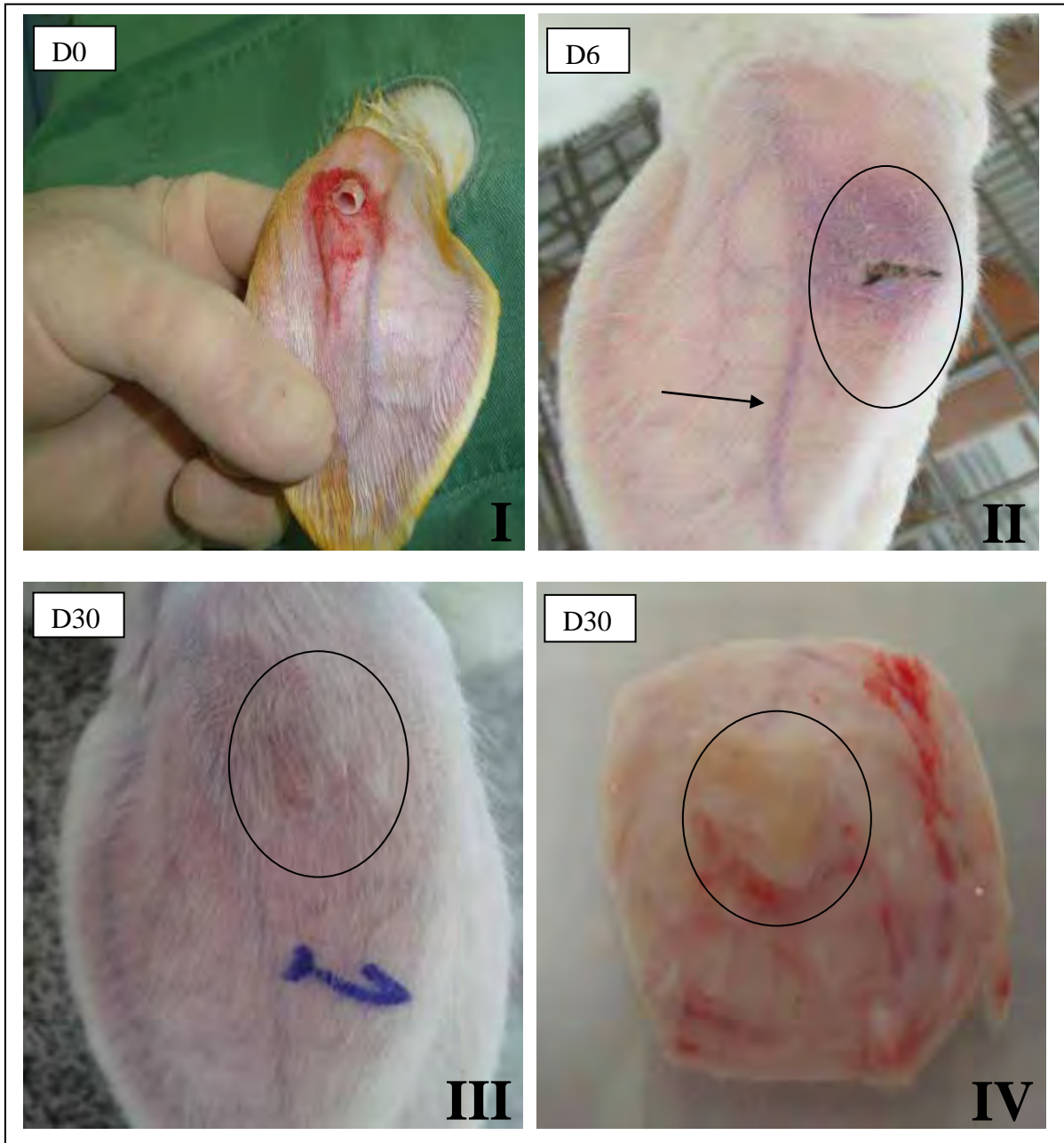


Figura 49. Implante *in vivo* do anel traqueal tratado com DS 4%. **I** – Segmento traqueal descelularizado sendo implantado na face externa da orelha do coelho. **II** – Implante após 6 dias. **III** – Implante após 30 dias. **IV** – Fragmento da orelha peri-implante.

Nas Figuras 50 e 51, observam-se aspectos histológicos no aumento de 10X e 20X respectivamente. Notam-se detalhes das duas cartilagens: a cartilagem da orelha do coelho receptor (acima), e a cartilagem da traquéia descelularizada implantada (abaixo). Nestas fotos também é possível notar que não há agrupamento linfocitário, aumento da vascularização e resposta inflamatória.⁵⁰ Portanto, pode-se afirmar que neste protocolo que houve compatibilidade do anel traqueal implantado com os tecidos subjacentes. A dificuldade inicial de cicatrização pode ser justificada por pequena toxicidade relacionada ao detergente que sofreu depuração *in vivo* ou ainda, pela escolha do modelo animal: o coelho, que sabidamente possui uma resposta inflamatória exacerbada. Não foi administrado anti-inflamatório aos animais. .

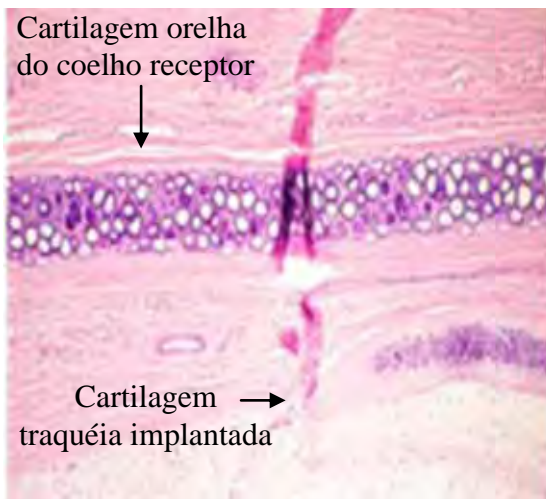


Figura 50. Histologia do implante tratado com DS 4%. Aumento de 10X.

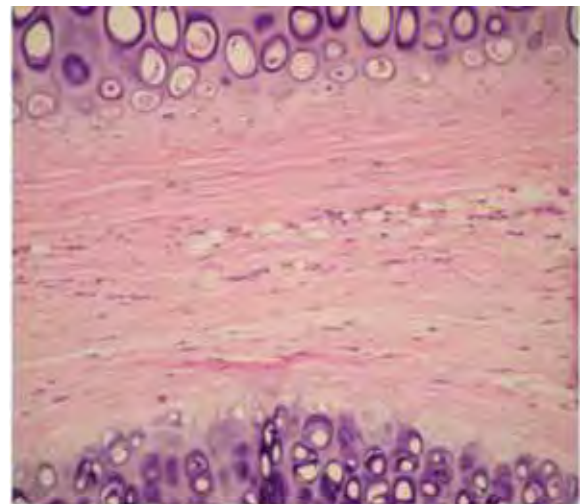


Figura 51. Histologia do implante tratado com DS 4%. Aumento de 20X.

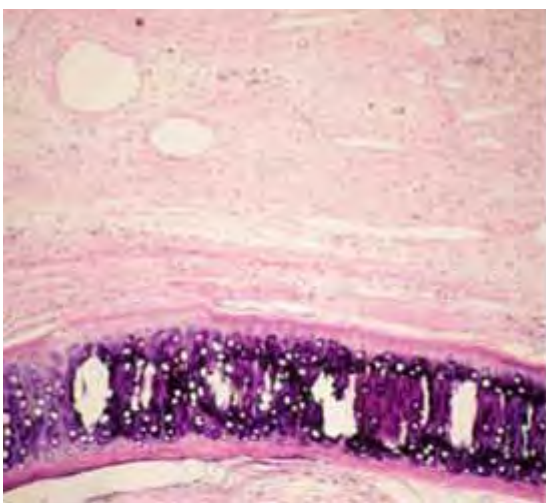


Figura 52. Histologia do implante tratado com DS 4%. Aumento de 10X.

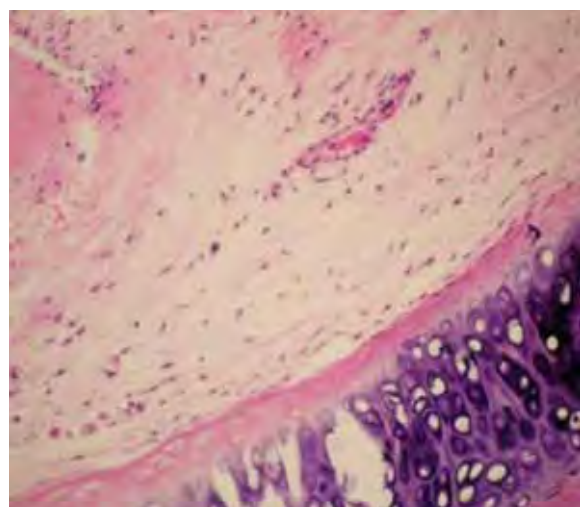


Figura 53. Histologia do implante tratado com DS 4%. Aumento de 10X.

Evolução do implante do segmento traqueal tratado com SDS 2%

No implante do anel tratado com SDS 2% após 6 dias (Figura 54-II), observa-se processo inflamatório generalizado, mais intenso que no protocolo anterior, maior dificuldade de cicatrização de pele com presença de necrose e importante congestão venosa (seta). Na Figura 54-III, após 30 dias, observou-se perda de pelo no local do implante, e presença dos pontos. Após o sacrifício do coelho, a região peri-traqueal da orelha foi retirada; porém, na figura 54-IV, nota-se ausência do segmento traqueal implantado. Isso ocorreu, provavelmente, devido à toxicidade do SDS, isto é, ocorreu liberação de citocinas inflamatórias, e o organismo digeriu e absorveu o fragmento traqueal. Através desse achado, pode-se constatar que a etapa de lavagem das traquéias durante duas horas, após os tratamentos com SDS, não é suficiente para retirar o SDS residual. Faz-se necessário neutralizar o SDS antes do implante a fim de se evitar essa reação.

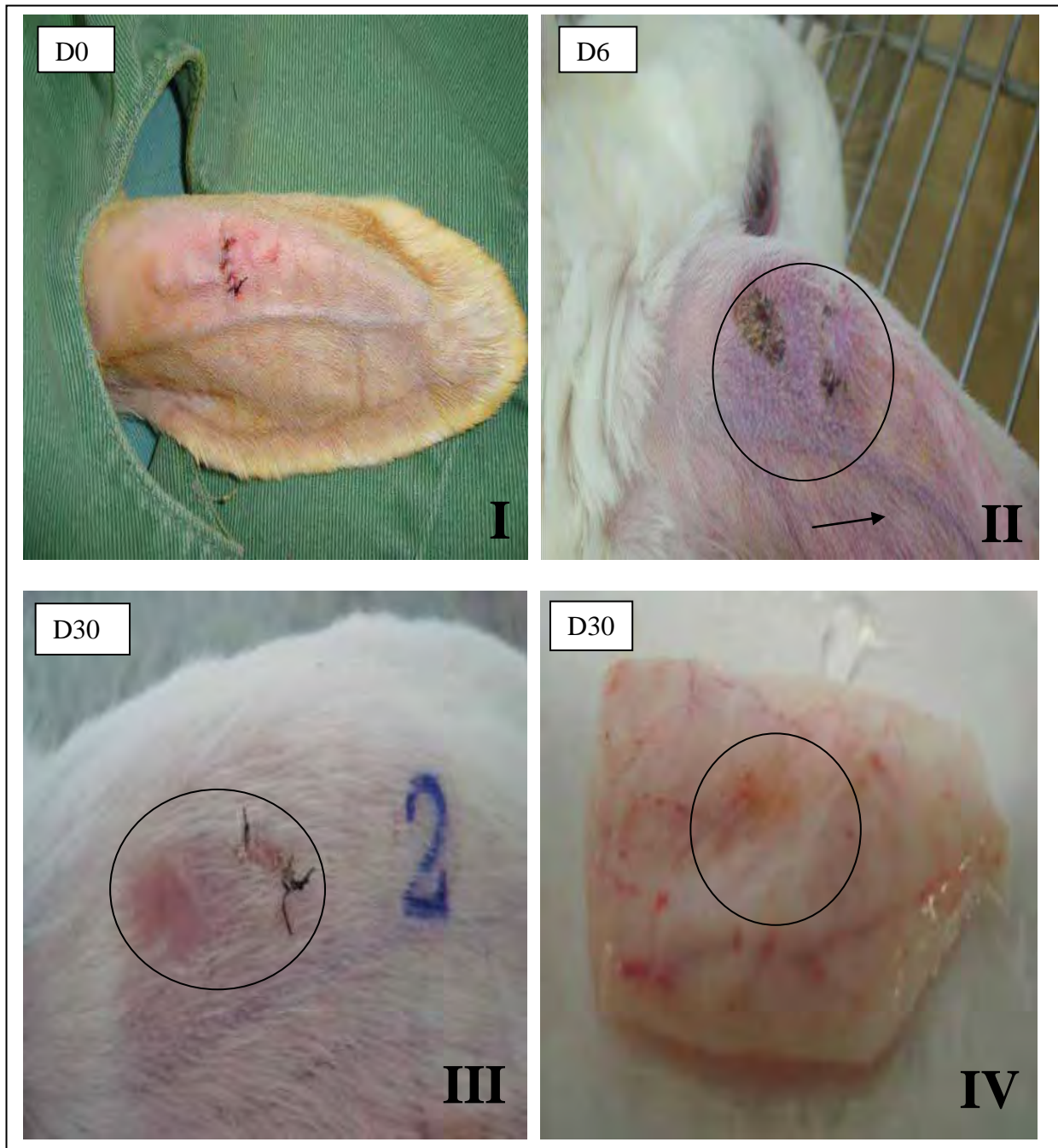


Figura 54. Implante *in vivo* do anel traqueal tratado com SDS 2%. **I** – Segmento traqueal descelularizado sendo implantado na face externa da orelha do coelho. **II** – Implante após 6 dias. **III** – Implante após 30 dias. **IV** – Fragmento da orelha peri-traqueal.

Nas Figuras 55 e 56, pode-se observar no aumento de 10X e 20X respectivamente, as duas cartilagens, a cartilagem da orelha do coelho receptor (acima), e a cartilagem da traquéia descelularizada implantada (abaixo). Porém, a traquéia descelularizada implantada está sendo desintegrada, sua estrutura se desarranjou em termos estruturais e há intensa atividade fagocítica peri-implante. Este fato pode ocorrer por duas razões: toxicidade do detergente não completamente neutralizado ou efeito de rejeição tecidual aguda. Na Figura 57, pode-se notar uma invaginação com retração tecidual que pode ser oriundo de intensa atividade fagocítica.

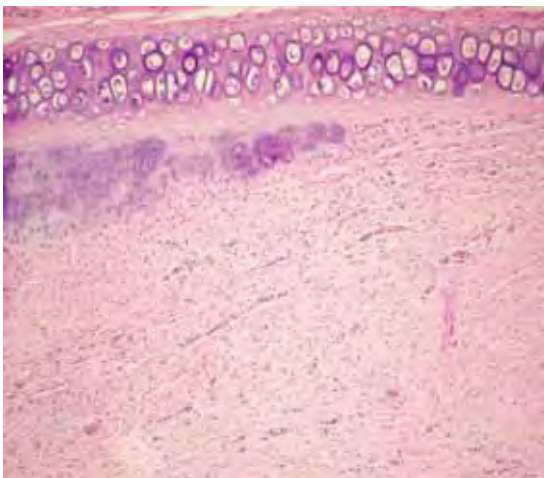


Figura 55. Histologia do implante tratado com SDS 2%. Aumento de 10X.

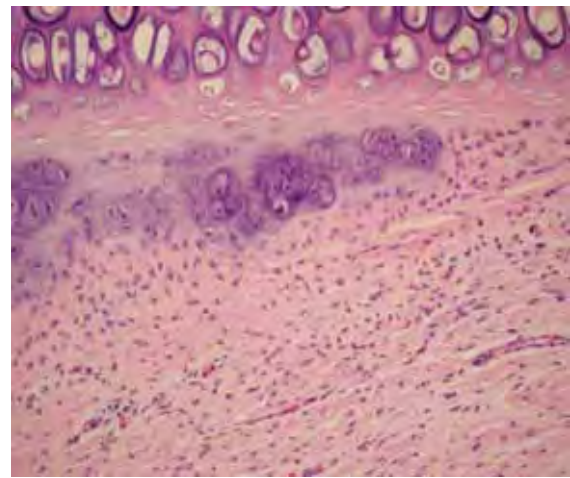


Figura 56. Histologia do implante tratado com SDS 2%. Aumento de 20X.

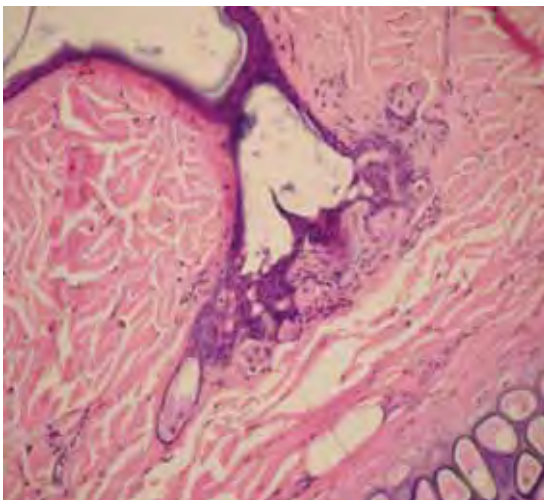


Figura 57. Histologia do implante tratado com SDS 2%. Aumento de 20X.

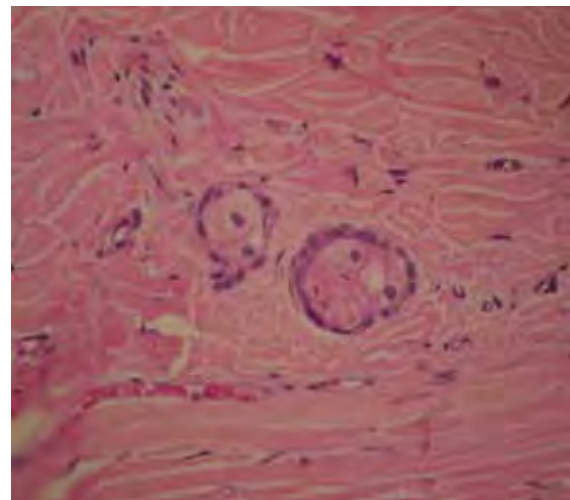


Figura 58. Histologia do implante tratado com SDS 2%. Aumento de 40X.

Evolução do implante do segmento traqueal tratado com Triton X- 100 2%

No implante do anel tratado com Triton X - 100 após 6 dias, observa-se um leve processo inflamatório peri-traqueal e ausência de congestão venosa, como demonstrado na Figura 59-II. Na Figura 59-III, nota-se cicatrização completa do implante após 30 dias. Após o sacrifício do coelho, a região peri-traqueal da orelha foi retirada, na Figura 59-IV pode-se observar o fragmento traqueal íntegro.

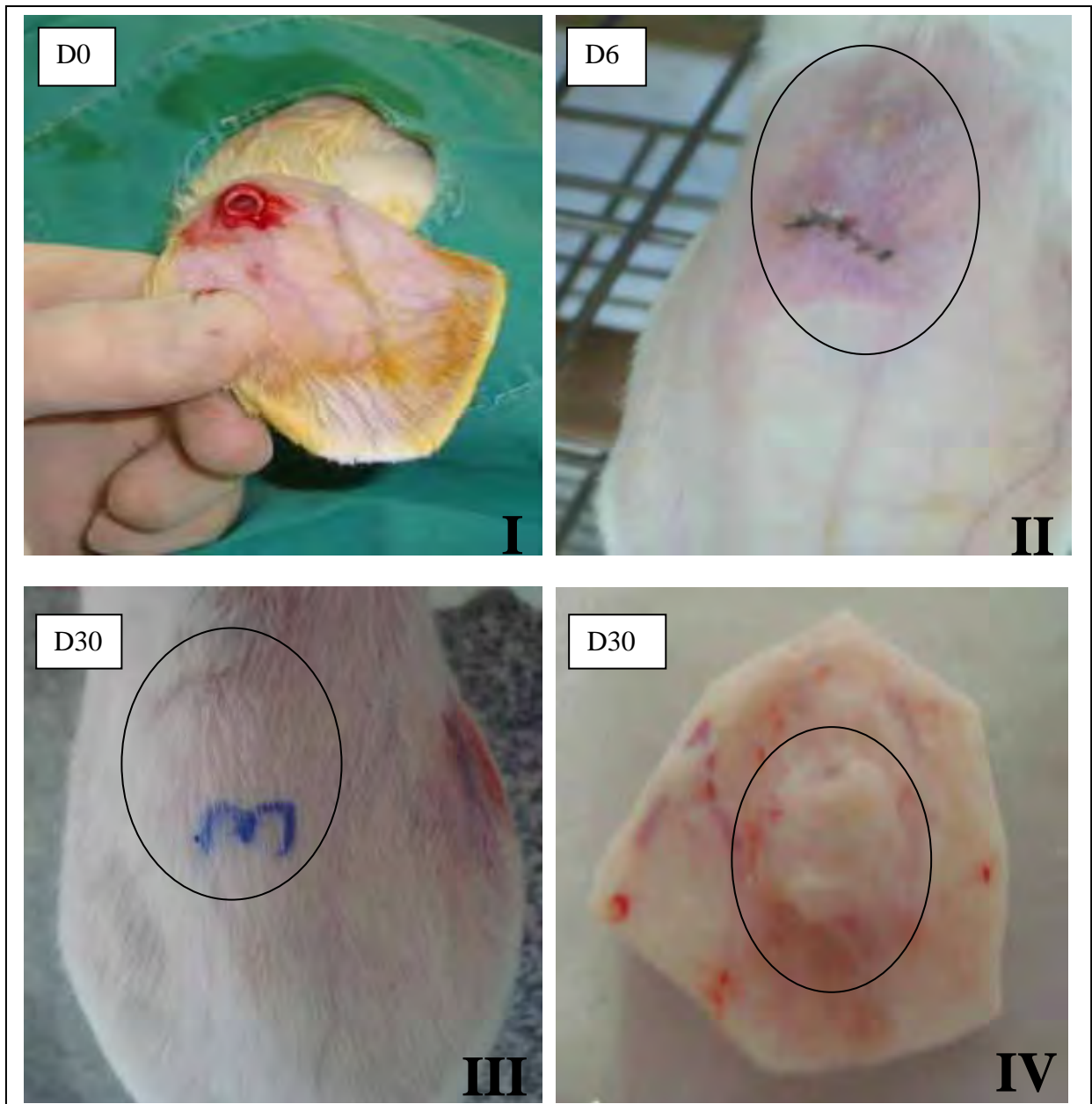


Figura 59. Implante *in vivo* do anel traqueal tratado com Triton X – 100 2%. **I**– Segmento traqueal descelularizado sendo implantado na face externa da orelha do coelho. **II** – Implante após 6 dias. **III** – Implante após 30 dias. **IV** – Fragmento da orelha peri-traqueal.

Na Figura 60, há formação de reação de corpo estranho (granuloma) que lembra a formação ganglionar devido à intensa invasão linfocitária, sinal de rejeição com fagocitose acentuada. Na Figura 61, é possível notar segmentos da traquéia implantada englobados por tecido conjuntivo frouxo circundado por células fagocíticas. Na Figura 62, há invaginação com infiltrado de linfócitos ao redor. Na Figura 63, há um aglomerado de vasos sanguíneos com infiltrado de linfócitos e macrófagos. Também se observa hipertrofia das paredes das arteríolas. Em outras áreas da lâmina, foram observados macrófagos fagocitando restos de cartilagem além de eosinofilia. Através desses resultados, constatou-se que a cartilagem não se regenerou, foi considerada como corpo estranho.

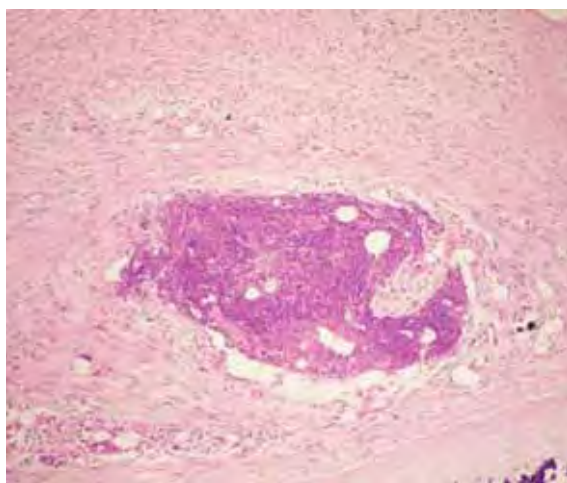


Figura 60. Histologia do implante tratado com Triton X - 100 2%. Aumento de 10X.

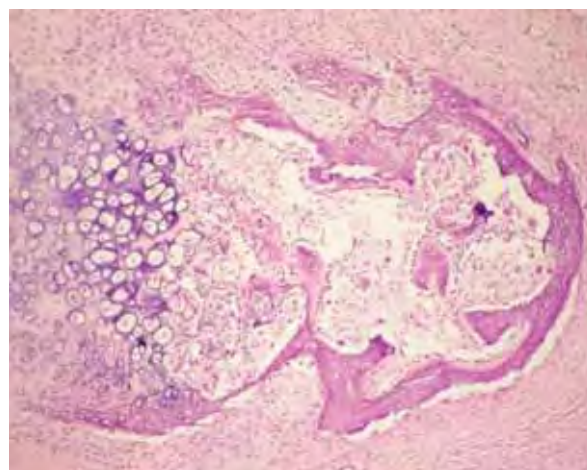


Figura 61. Histologia do implante tratado com Triton X - 100 2%. Aumento de 10X.

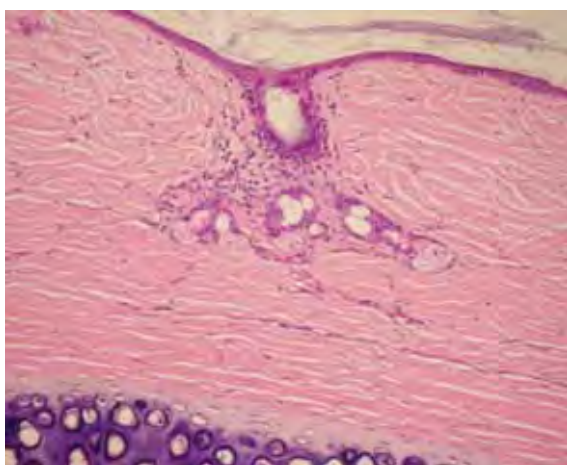


Figura 62. Histologia do implante tratado com Triton X - 100 2%. Aumento de 20X.

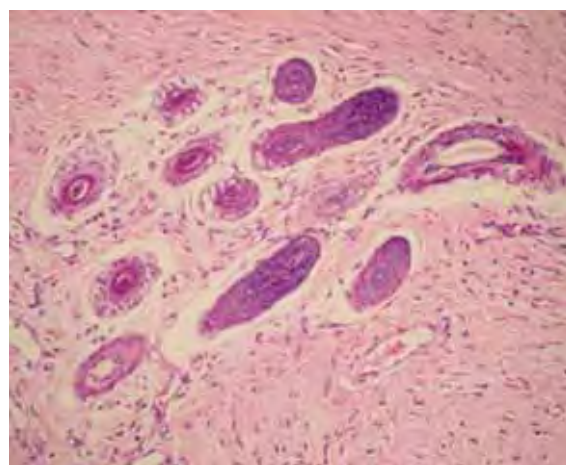


Figura 63. Histologia do implante tratado com Triton X - 100 2%. Aumento de 20X.

Etapa 2 – Obtenção das CTMs

A evolução das culturas das CTMs obtidas por dissociação mecânica não possui diferença ao se comparar com a evolução das células obtidas por digestão enzimática. Entretanto, a enzima utilizada na digestão enzimática, colagenase, apresenta elevado custo; assim, sob o ponto de vista custo-benefício, a dissociação mecânica é vista como uma técnica superior à digestão enzimática, apesar de ser mais trabalhosa.

Após dois dias de cultura, percebeu-se adesão das células iniciais em baixa densidade (Figura 64), estas formavam colônias dispersas no frasco de cultura (Figura 65), assim como descrito na literatura²³, e replicavam até que as colônias (*clusters*) se encontrassem, formando confluência 80% (Figura 66).

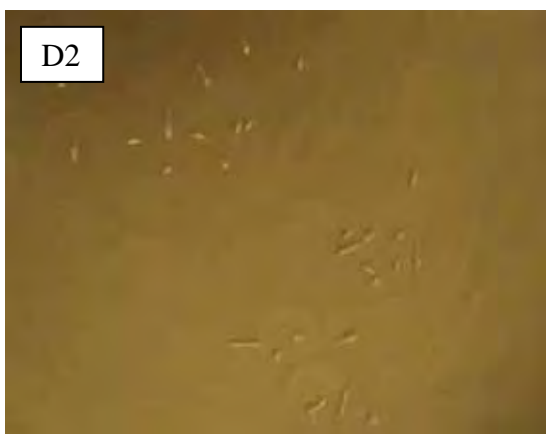


Figura 64. Células iniciais aderidas. Aumento de 5X.



Figura 65. Formação de *clusters*. Aumento de 5X.



Figura 66. Confluência de 80%. Aumento de 5X.

Após 6 dias de cultura, observa-se as características das CTMs, nos diferentes aumentos do microscópio invertido Axiovert 200[®], Zeiss[™] (Figuras 67, 68 e 69).

Morfológicamente, as células cultivadas *in vitro* mantiveram características de CTMs. A população celular obtida era heterogênea, mas a maioria dessas células apresentava-se alongada, justaposta e provida de prolongamentos, tipicamente fibroblastóides com dois nucléolos na região nuclear, corroborando achados da literatura^{20,23}.

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



Figura 67. CTMs aderidas. Aumento de 5X.

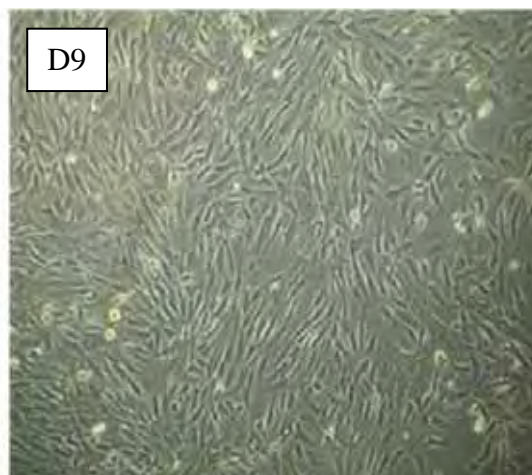


Figura 68. CTMs aderidas. Aumento de 10X.

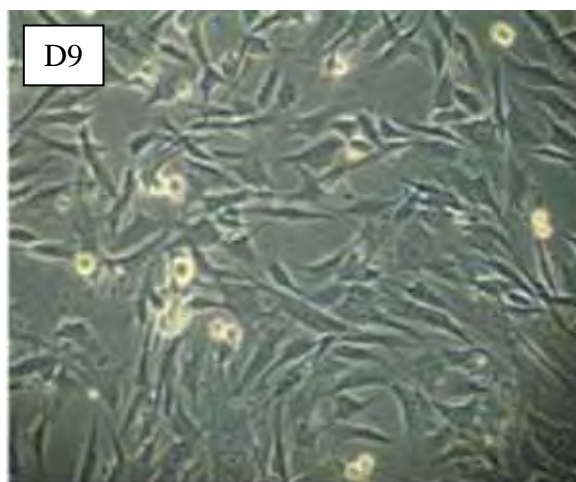


Figura 69. CTMs aderidas. Aumento de 20X.

Caracterização por citometria de fluxo

Ao comparar os resultados da citometria de fluxo dos dois anticorpos comerciais, usados como controles positivo, 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 10127. Destes, 3,16% das células expressaram CD90 em sua superfície.

Frente ao baixo desempenho deste CTL e às outras indicações de CTMs, levando-se em consideração o aspecto da cultura celular, ou seja, capacidade de aderência ao plástico, tempo de confluência, aspecto fibroblastóide e número de passagens em cultura, conclui-se que esse marcador *anti-rat* usado no início do projeto 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 7774 eventos, 88,17% das células foram positivas.

Estes resultados podem ser visualizados nos histogramas abaixo.

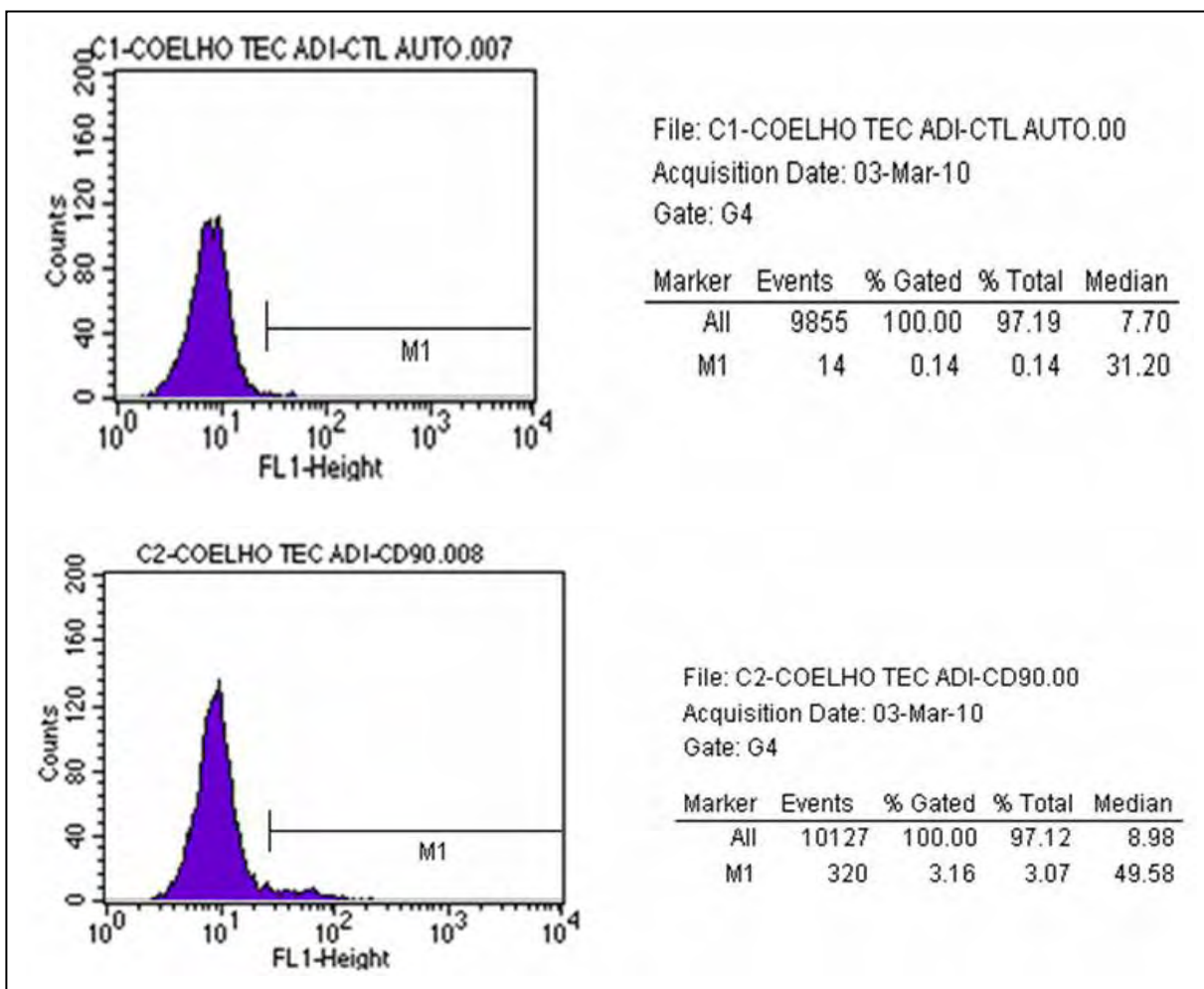


Figura 70. Resultado da citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti-CD90 (*anti-rat*) da Caltag Laboratories®.

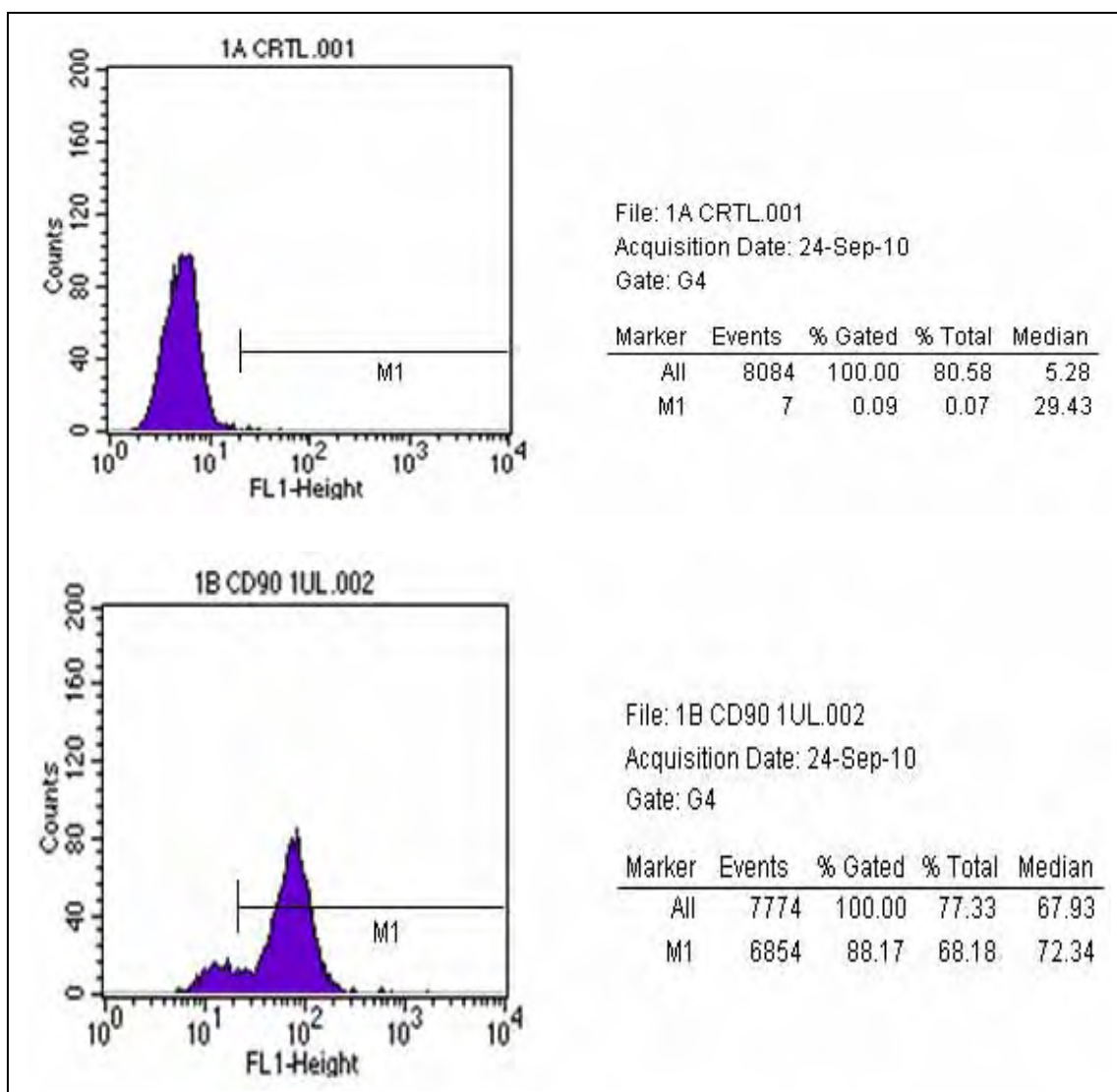


Figura 71. Resultado da citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti-CD90 (*anti-rat cross reacting with rabbit*) - Biolegend®.

Estes resultados destacam a importância de se usar um controle positivo adequado.

Com relação aos anticorpos monoclonais produzidos *home made*, o anticorpo MSC1-160A69 apresentou maior expressão nas células testadas, quando comparado com o MSC1-160A30, demonstrado na Figura 72.

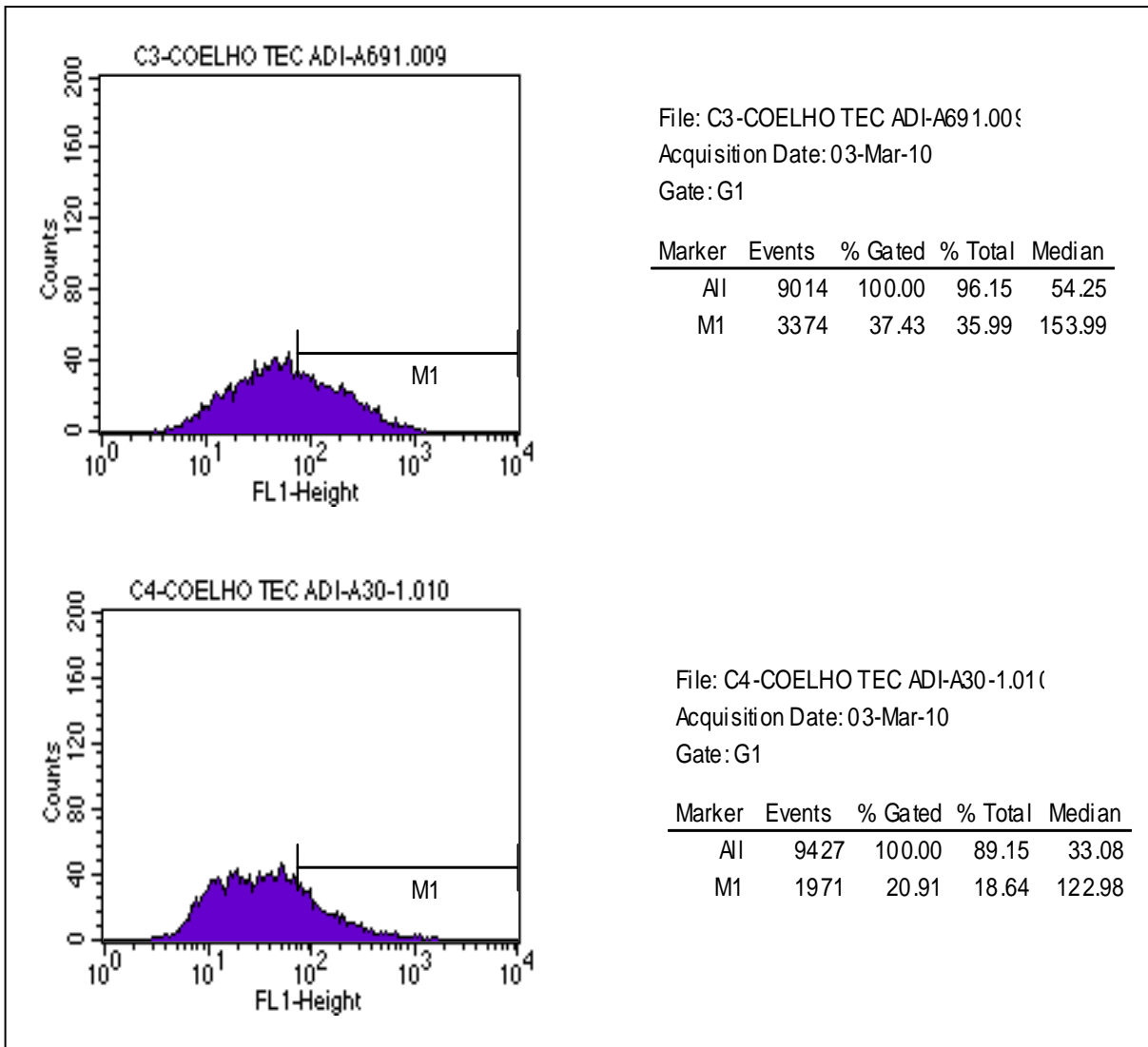


Figura 72. Resultado da citometria de fluxo utilizando os anticorpos produzidos *home made*.

Caracterização por imunohistoquímica



Figura 73. CTMs cultivadas coradas com o anticorpo anti-vimentina.

Este anticorpo foi utilizado como um complemento da caracterização das células cultivadas. Como esperado, as células marcadas em marrom confirmam o fenótipo de CTM.

Etapa 3 – Diferenciação condrogênica

Nas fotos abaixo é possível observar células arredondadas em cultura no gel de plaquetas; em destaque (seta), três células em divisão mitótica evidente, bastante semelhante à formação dos grupos isógenos da cartilagem hialina.

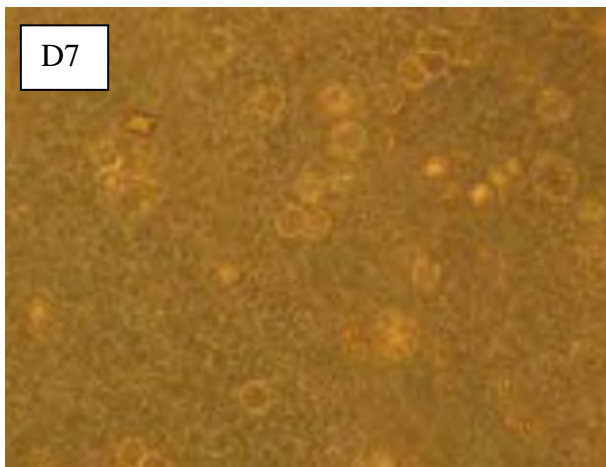


Figura 74. Células formando lacunas no gel. Aumento de 20X.

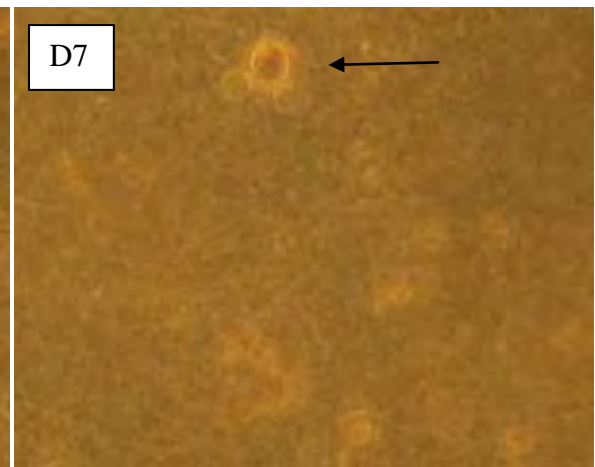


Figura 75. Três células em divisão mitótica, semelhante aos grupos isógenos. Aumento de 20X.

Na coloração com HE, essas lacunas formadas pelas células no GP também podem ser visualizadas. .

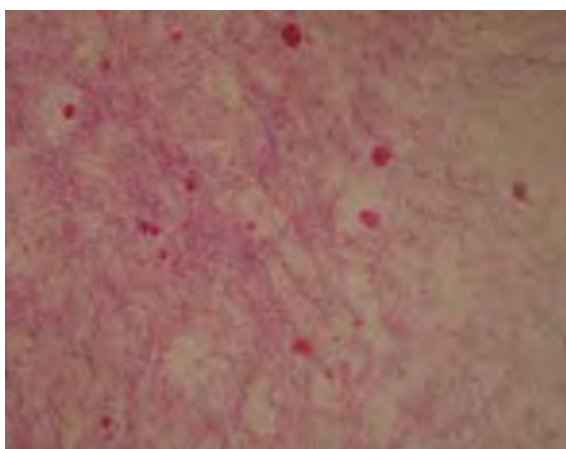


Figura 76. Gel com células corado com HE. Aumento de 20X.

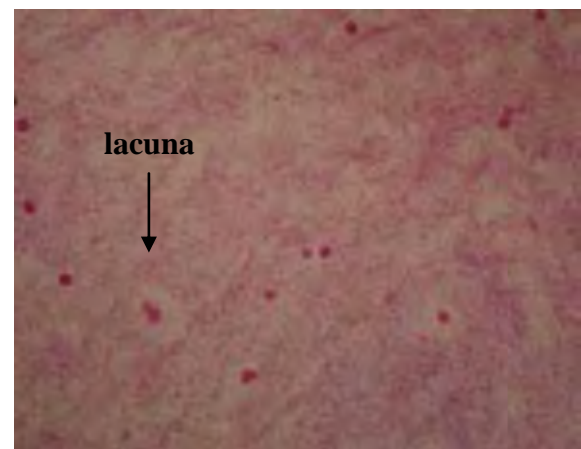


Figura 77. Lacunas formadas pelas células no gel. Aumento de 20X.

Etapa 4 – Expansão *ex vivo* do epitélio traqueal

Quanto aos resultados da expansão das CERs, foram testadas cinco técnicas diferentes; porém, apenas duas dessas técnicas apresentaram resultados satisfatórios: fragmentos traqueais e raspado traqueal.

Fragmentos traqueais

Após 10 dias de cultura, há várias células aderidas ao frasco (Figura 78). No aumento de 20X, após 10, 12 e 20 dias de cultura (Figuras 80, 81, 82 e 83), 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 auto-fluorescência intensa. Além disso, nas Figuras 82 e 83, observa-se pouca substância extracelular; e aderência firme entre as células, formando camadas celulares contínuas, evidência de células epiteliais.¹³



Figura 78. Células iniciais aderidas. Aumento de 5X.

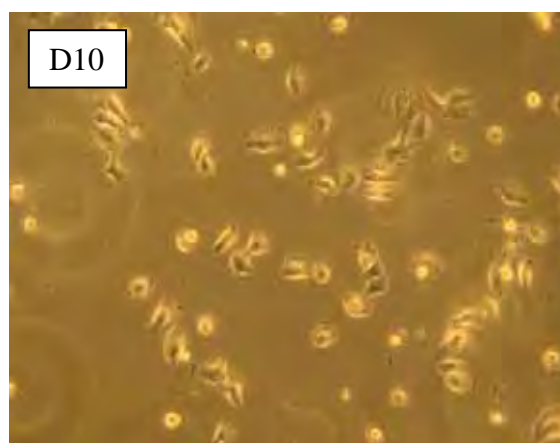


Figura 79. Células iniciais aderidas. Aumento de 10X.

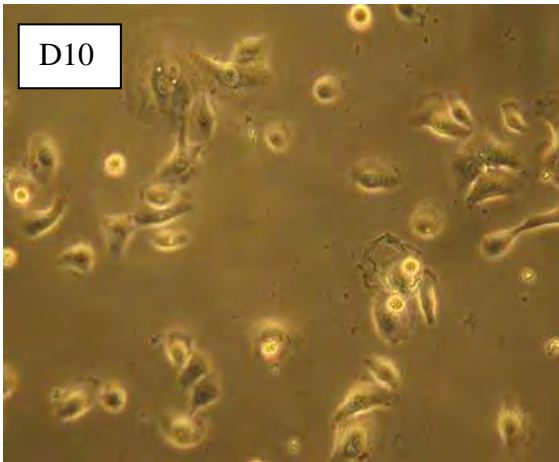


Figura 80. Células iniciais aderidas. Aumento de 20X.

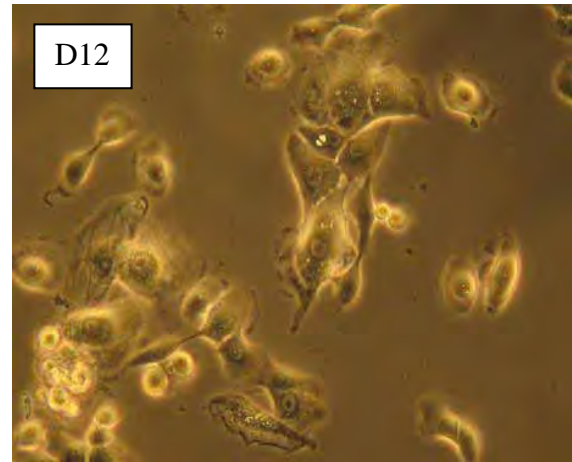


Figura 81. Células iniciais aderidas. Aumento de 20X.

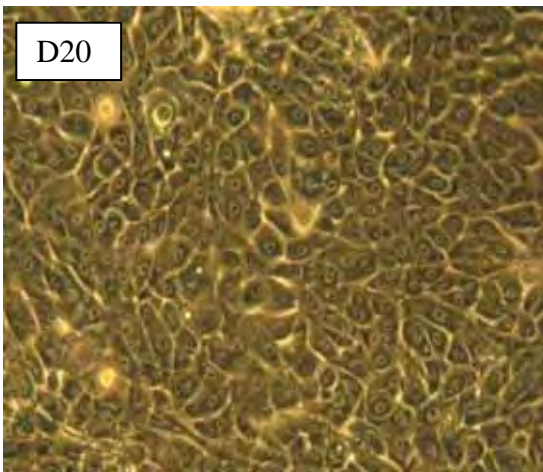


Figura 82. Epitélio formado. Aumento de 20X.

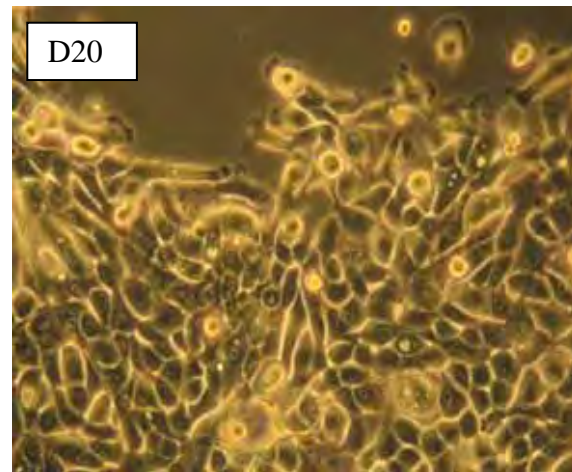


Figura 83. Epitélio formado. Aumento de 20X.

Raspado traqueal

Após 10 dias de cultura, pode-se observar formação de colônia de epitélio respiratório, nos aumentos de 5X e 10X, Figuras 84 e 85, respectivamente. No aumento de 20X, após 12 e 20 dias de cultura (Figuras 86, 87, 88 e 89), verificam-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 auto-fluorescência intensa. Além disso, observa-se pouca substância extracelular; e aderência firme entre as células, formando camadas celulares contínuas.¹³

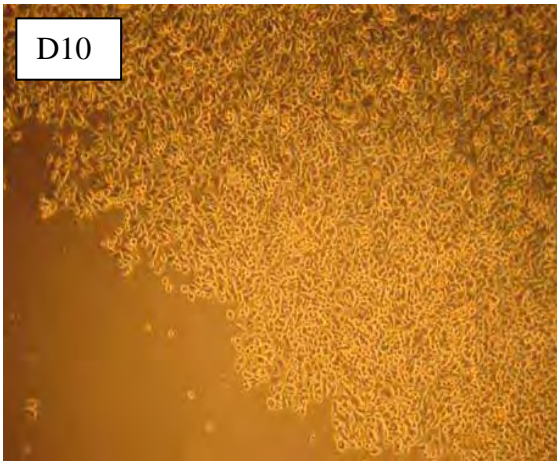


Figura 84. Epitélio formado. Aumento de 5X.

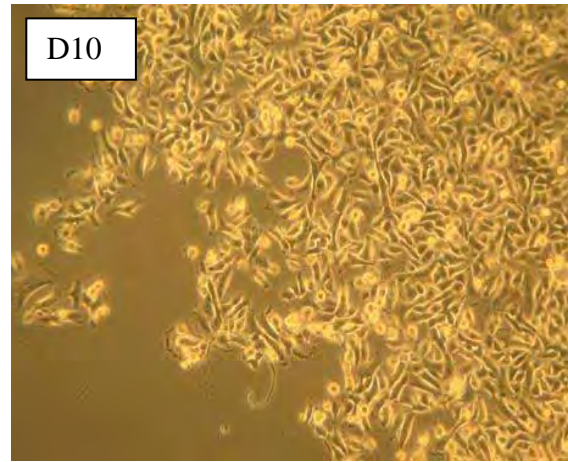


Figura 85. Epitélio formado. Aumento de 10X.

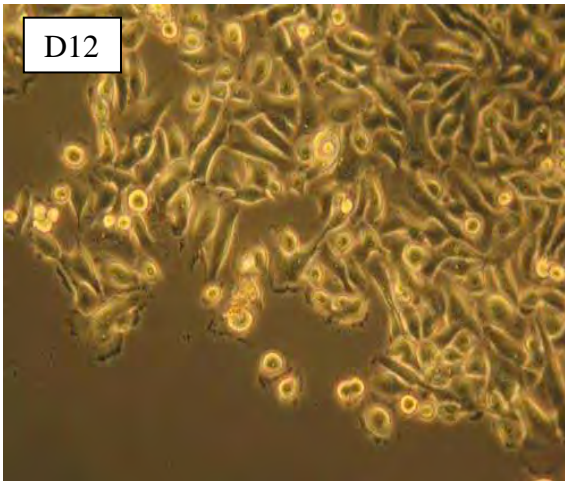


Figura 86. Epitélio formado. Aumento de 20X.

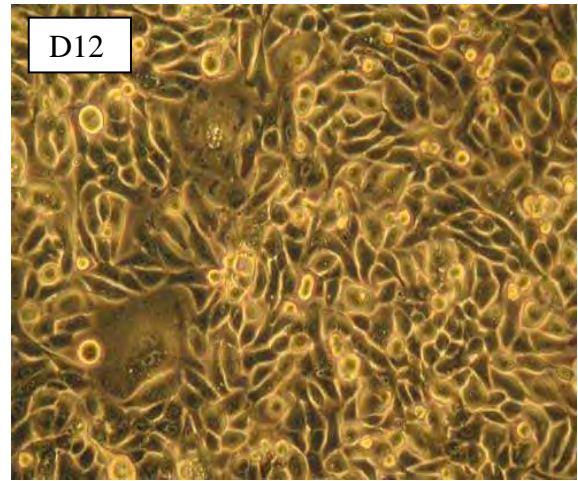


Figura 87. Epitélio formado. Aumento de 20X.

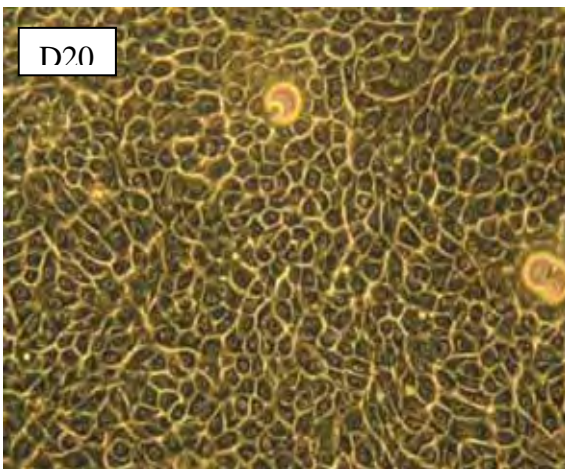


Figura 88. Epitélio formado. Aumento de 20X.

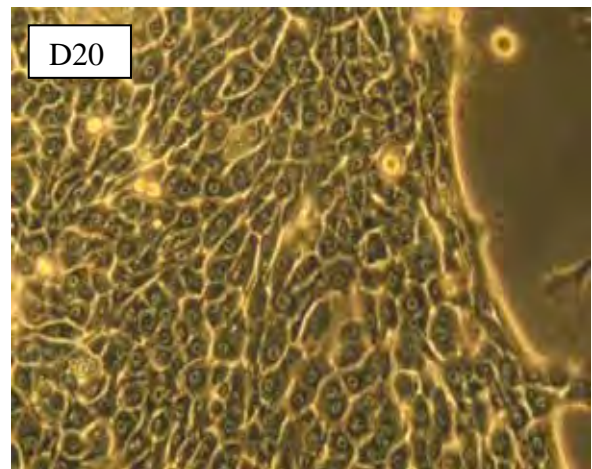


Figura 89. Epitélio formado. Aumento de 20X.

Um dos questionamentos que se faz sobre o método de coleta da célula epitelial envolve a possível contaminação, no entanto, 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. As fotos abaixo são da cultura do lavado traqueal, onde não houve visualização de células epiteliais. Este método determina o crescimento de leveduras quando em cultivo.

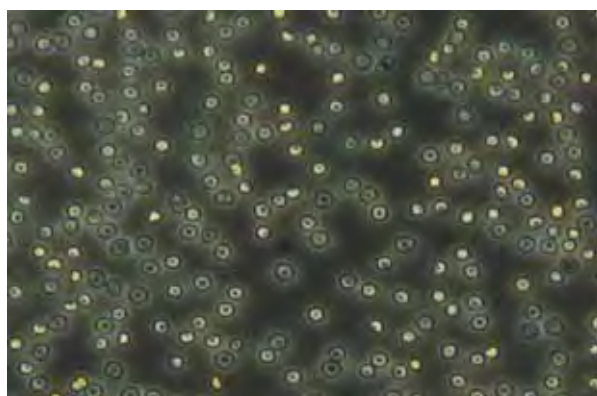


Figura 90. Contaminação. Aumento de 20X

Caracterização por imunohistoquímica

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 traquéias dos coelhos também foram marcadas.



Figura 91. Lâmina controle – negativa.

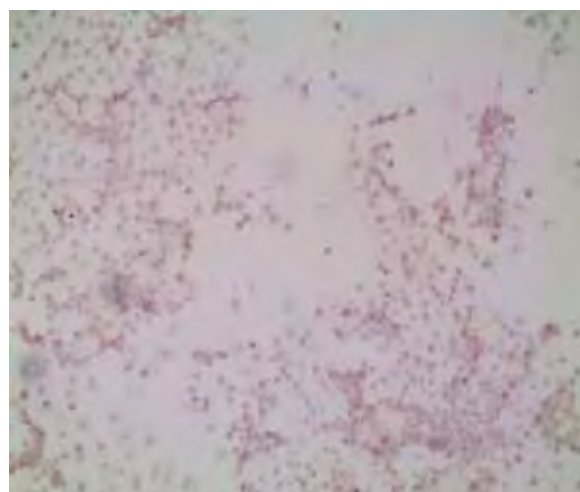


Figura 92. Lâmina positiva.

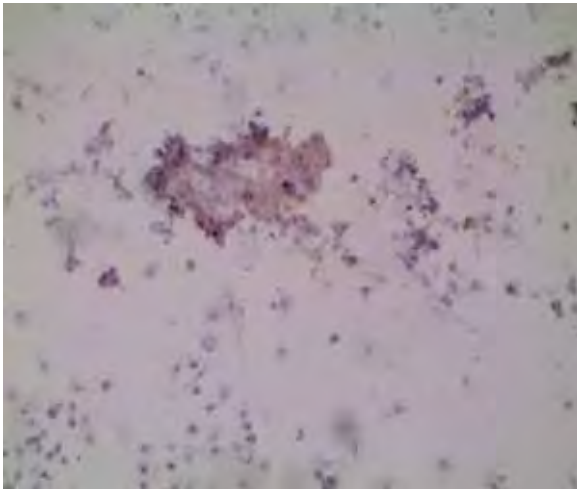


Figura 93. Cluster positivo.

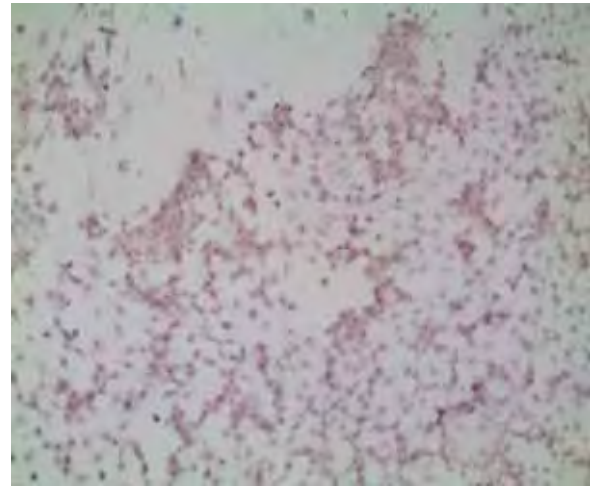


Figura 94. Lâmina positiva.

Etapa 5 – Aplicação das CERs na face interna da traquéia descelularizada

Esta etapa foi realizada com traquéias tratadas com os três protocolos de descelularização validados na etapa 1.

1 - Congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)* + irradiação do LED com comprimento de onda de 475nm +/- 20 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 30 minutos de exposição + detergente **DS 4%** durante 48 horas.

2 - Congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)* + irradiação do LED com comprimento de onda de 475nm +/- 10 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 30 minutos de exposição + detergente **SDS 2%** durante 48 horas.

3- Congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)* + irradiação do LED com comprimento de onda de 475nm +/- 10 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 30 minutos de exposição + detergente **Triton X - 100 2%** durante 48 horas.

Os protocolos descritos acima foram validados através das análises histológicas das lâminas coradas com HE, levando em consideração a remoção mais eficiente das células cartilaginosas; e nesse aspecto, eles não apresentaram diferença significativa. Porém, ao analisar a remoção do epitélio respiratório dessas traquéias tratadas, observou-se supremacia dos tratamentos com DS 4% e SDS 2%; já que não há células epiteliais restantes. Nas lâminas

das traquéias tratadas com Triton X – 100 2%, há várias células epiteliais ainda presentes.

Traquéias descelularizadas com Triton X – 100 2% + CERs

O controle da traquéia tratada com Triton X – 100 2%, isto é, após o tratamento de descelularização e antes da aplicação das CERs cultivadas, apresenta células epiteliais nativas que não foram retiradas com o tratamento (Figura 95-I); isto dificulta a observação da aderência das células aplicadas. Entretanto, é possível observar na lâmina corada com HE maior quantidade de células epiteliais após a aplicação (Figura 95-II). Porém, como ainda havia epitélio nativo, este protocolo não foi validado.

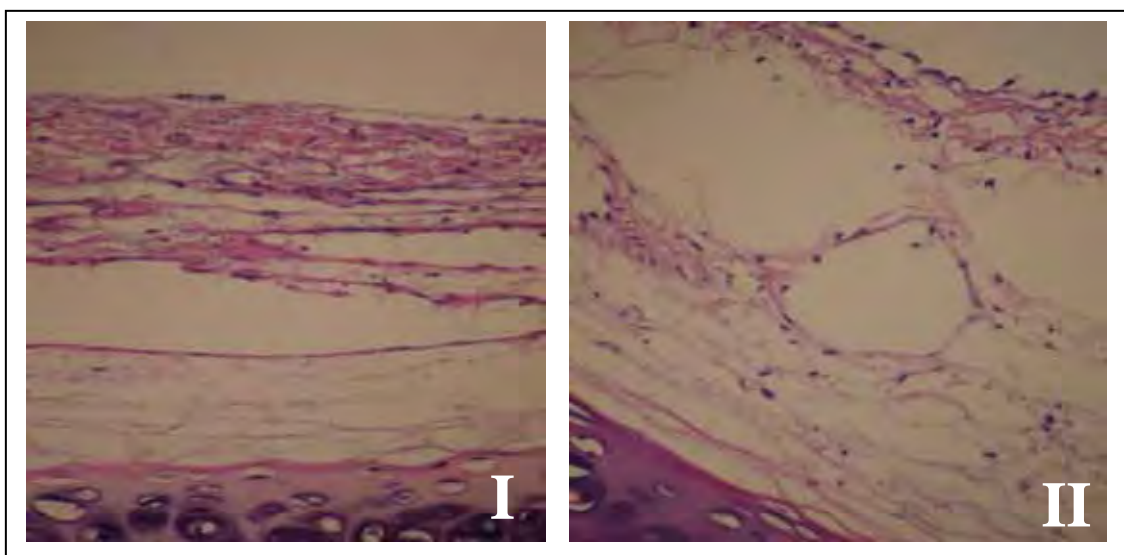


Figura 95. Aplicação das CERs na face interna da traquéia descelularizada com o Triton X – 100 2%. **I** – Histologia do epitélio respiratório descelularizado (destaque para a presença de várias células ainda presentes após o tratamento). **II** – Epitélio respiratório após a aplicação das CERs.

Traquéias descelularizadas com SDS 2% + CERs

O controle da traquéia tratada com SDS 2%, isto é, antes da aplicação das CERs não apresenta células epiteliais nativas, demonstrando eficiência do protocolo de descelularização também nesse aspecto (Figura 96-I). Porém, na lâmina da traquéia após a aplicação do epitélio respiratório cultivado, não há aderência dessas células (Figura 96-II). Provavelmente, este resultado ocorre, porque o SDS tende romper a estrutura tecidual nativa, causa uma

diminuição na concentração glicosaminoglicana, perdendo a integridade do colágeno; e isso prejudica a re-população das matrizes tratadas com esse detergente.^{35,37,39}.

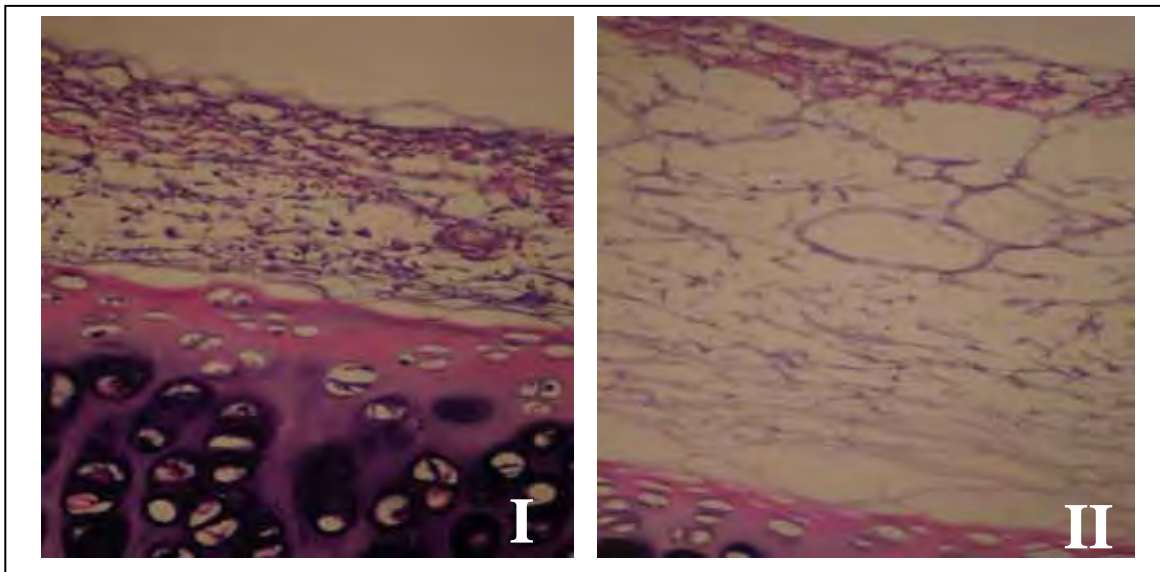


Figura 96. Aplicação das CERs na face interna da traquéia descclularizada com o SDS 2%. **I** – Histologia do epitélio respiratório descclularizado (destaque para a presença de várias células ainda presentes após o tratamento). **II** – Epitélio respiratório após a aplicação das CERs.

Traquéias descclularizadas com DS 4% + CERs

O controle da traquéia tratada com DS 4% não apresenta células epiteliais nativas (Figura 97-I), demonstrando eficiência do protocolo de descclularização também nesse aspecto. A lâmina da traquéia descclularizada após a aplicação das células epiteliais cultivadas apresenta várias células aderidas (Figura 97-II).

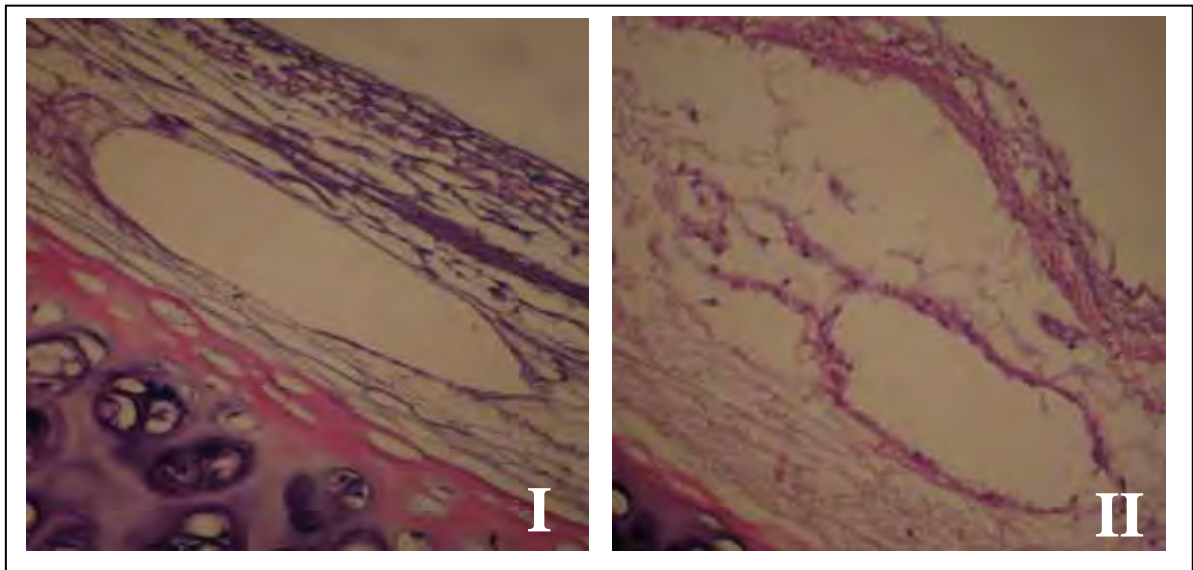


Figura 97. Aplicação das CERs na face interna da traquéia descelularizada com o DS 4%. **I** – Histologia do epitélio respiratório descelularizado (destaque para a ausência de células após o tratamento). **II** – Epitélio respiratório após a aplicação das CERs.

Através da análise desses resultados, pode-se elencar o tratamento que utiliza: congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)* + irradiação do LED com comprimento de onda de 475nm +/- 20 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 30 minutos de exposição + detergente DS 4% durante 48 horas. Este tratamento mostra-se como o mais eficiente também sob o aspecto da re-população das traquéias descelularizadas com as células epiteliais cultivadas em laboratório.

Conclusões

V – Conclusões

1. O protocolo de descelularização validado utiliza: congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)* + irradiação do LED com comprimento de onda de 475nm +/- 20 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 30 minutos de exposição + detergente DS 4% durante 48 horas.
2. As CTMs obtidas a partir de tecido adiposo foram caracterizadas através de análises de citometria de fluxo com dois anticorpos comerciais de especificidade anti-CD90 e dois anticorpos produzidos *home made*. Para imunohistoquímica foi utilizado o anticorpo anti-vimentina.
3. A cultura condrogênica em Knockout DMEM-F12, sem SFB, suplementado de dexametasona, piruvato de sódio, TGF-β2 e insulina-transferrina-ácido selênico-ácido linoleico foi caracterizada através de análise histológica.
4. Dos cinco métodos de obtenção do epitélio respiratório, foram validados dois métodos: fragmento e raspado traqueal sendo que as CERs expandidas em cultura foram caracterizadas através de análise imunohistoquímica utilizando anticorpo monoclonal anti-beta catenina.
5. O protocolo de descelularização validado, em relação à aplicação das CERs na face interna da traquéia descelularizada utiliza: congelamento/descongelamento + agitação 180 rpm no *C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific)* + irradiação do LED com comprimento de onda de 475nm +/- 20 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 30 minutos de exposição + detergente DS 4% durante 48 horas.

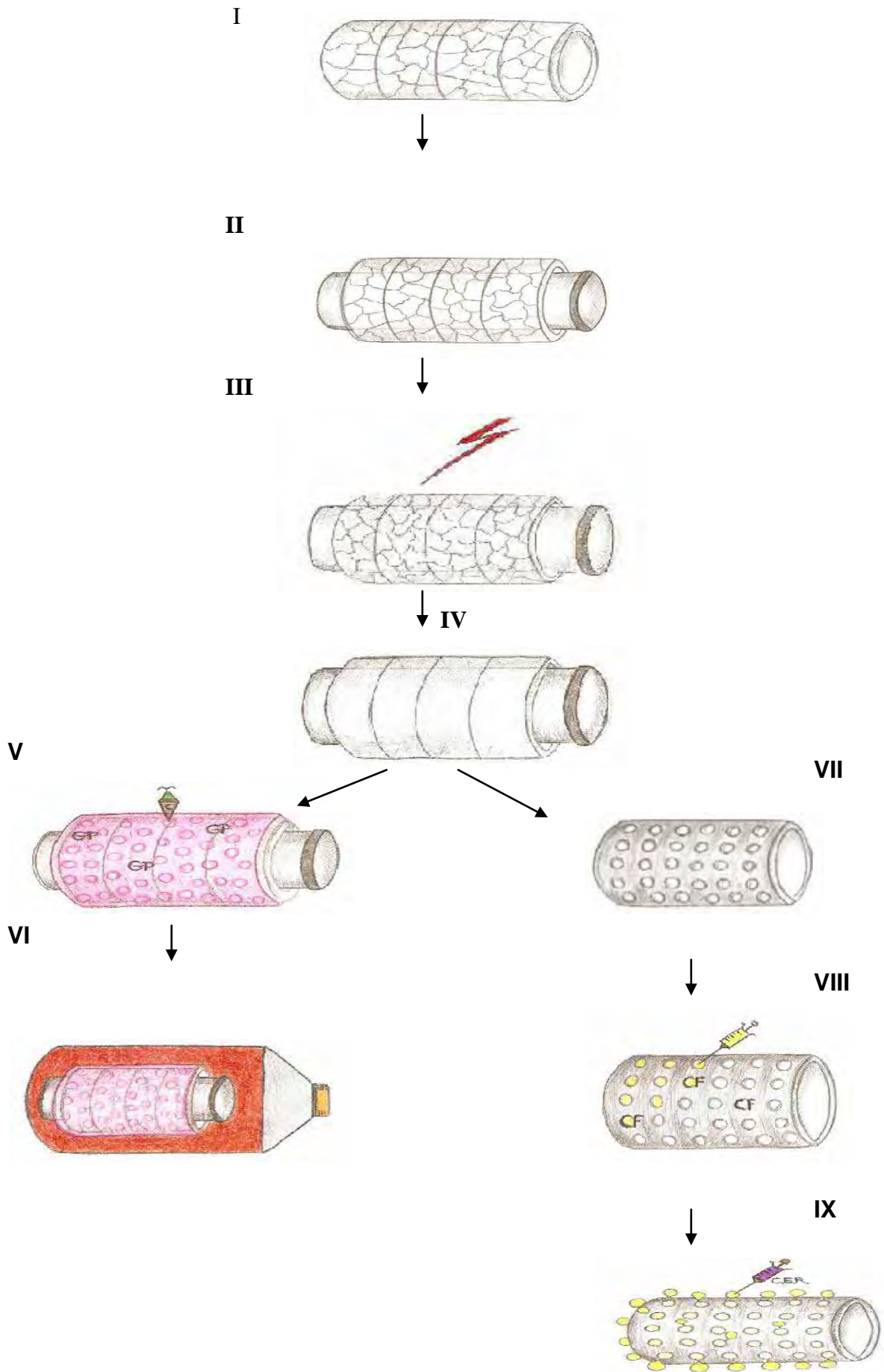
Perspectivas

VI- Perspectivas

1. Aplicar os condrócitos na face externa da traquéia descelularizada, juntamente com as células epiteliais respiratórias na face interna.
2. Implantar a neotraquéia *in vivo* no dorso dos coelhos receptores, e analisar a característica histológica após trinta dias.

Montagem do modelo no arcabouço

Para a montagem do modelo proposto, recupera-se o arcabouço de traquéia descelularizada e preservada procedendo-se às lavagens em solução salina isotônica e meio Hepes com antibiótico. Toda a manipulação será feita em capela de fluxo laminar classe II A. Na Figura 98, o número IV representa a traquéia descelularizada após lavagens com soro e antibiótico; e dentro dela está representada a estrutura cilíndrica flexível (sonda nasogástrica NR12), estéril, que será colocado no interior do arcabouço para garantir a tridimensionalidade e o não colapamento. Na superfície externa será aplicada 1×10^6 condrócitos/cm² em gel de plaquetas. Após a aplicação, o conjunto será colocado em frasco de cultura em meio próprio para condrócitos por 48 horas até que ocorra a adesão dos mesmos sobre o arcabouço. As células epiteliais expandidas *in vitro* serão transferidas para o interior da tubulação plástica previamente perfurada e preenchida com excesso de cola de fibrina. Nos pontos de perfuração, a cola de fibrina extravasará formando pequenos botões de coágulo. Uma concentração de 1×10^6 células epiteliais /cm² será aplicada em cada um dos botões e o conjunto ficará em cultura por 48 horas. O conjunto será colocado no interior da traquéia. As extremidades do segmento perfurado serão interligadas a um frasco alimentador de meio de cultura específico para crescimento de células epiteliais. O conjunto será mantido em estufa de CO₂, com umidade controlada a 37°C durante outras 48h. Após este tempo, o segmento plástico será removido.⁶ A estrutura será então aplicada no tecido celular subcutâneo da região dorsal de coelhos por meio de incisão da pele e descolamento dos planos mais profundos, o suficiente para hospedá-lo sem compressão ou isquemia; e para avaliar o desenvolvimento. Cada animal será anestesiado e terá o implante retirado após 30 dias para as avaliações histomorfológicas. Também serão retirados destes coelhos fragmentos da traquéia nativa para comparações histomorfológicas e estudos de imunogenicidade.



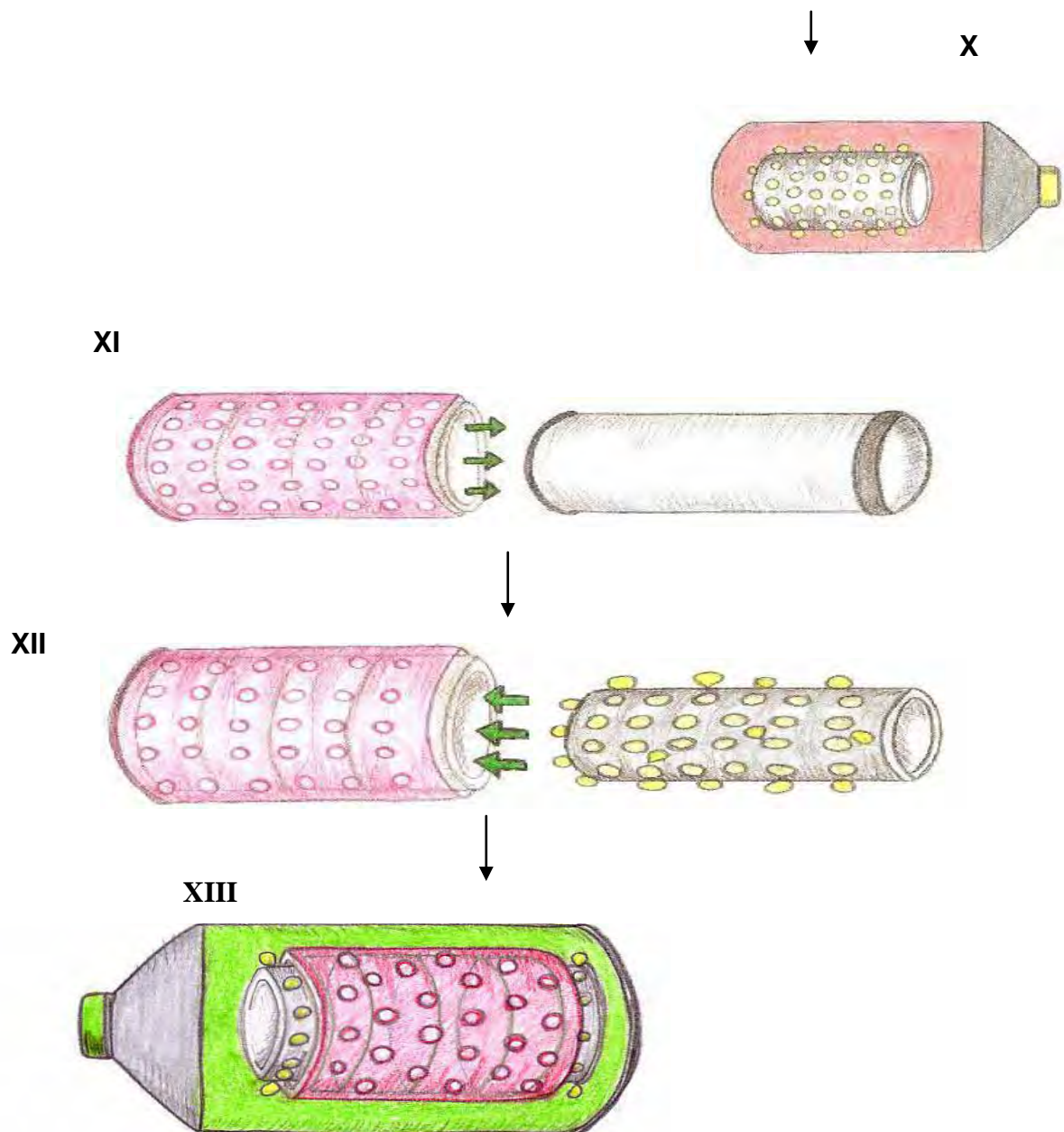


Figura 98 – Etapas de construção do modelo de neotraquéia e seu revestimento interno com epitélio e externo com condrócitos.

I- Traquéia íntegra; **II-** Traquéia com sonda nasogástrica NR12; **III-** Tratamento enzimático da traquéia; **IV-** Traquéia descelularizada; **V-** Aplicação de gel de plaquetas com condrócitos na superfície externa da traquéia descelularizada; **VI-** Cultura dos condrócitos por 48 horas; **VII-** Sonda nasogástrica NR12 perfurada com agulha 18 G; **VIII-** Aplicação da cola de fibrina na sonda nasogástrica NR 12; **IX-** Aplicação das células epiteliais respiratórias (CER) nos botões de excesso da cola de fibrina da sonda; **X-** Cultura das CER por 48 horas; **XI-** Remoção da sonda de dentro da traquéia; **XII-** Aplicação da sonda com as CER no interior da traquéia; **XIII-** Cultura do complexo bioartificial por 48 horas.

Referências Bibliográficas

VII - Referências bibliográficas

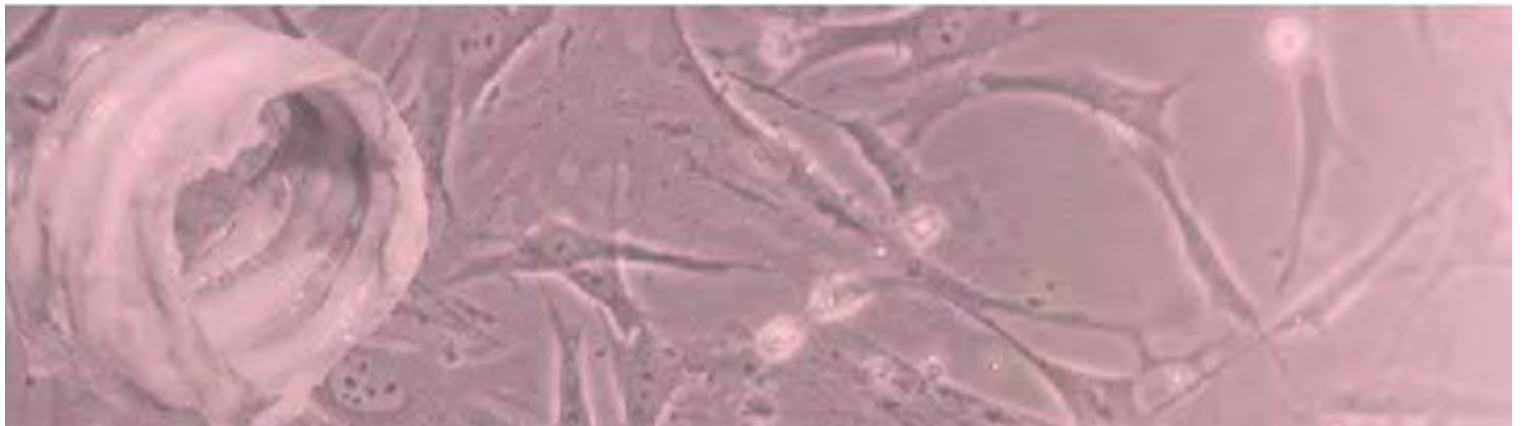
1. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnagui MA, Rees LE, Cogan TA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*. 2008; 372: 2023-30.
2. Shaari CM, Farber D, Brandwein MS, Gannon P, Urken ML. Characterizing the antigenic profile of the human trachea: implications for tracheal 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. 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.
5. Bucheler M, Haisch A. Tissue engineering in otorhinolaryngology. *DNA Cell Biol*. 2003; 22: 549-63.
6. Kojima K, Ignatz RA, Kushibiki T, Tinsley KW, Tabata Y, Vacanti CA. Tissue-engineered trachea from sheep marrow stromal cells with transforming growth factor β 2 released from biodegradable microspheres in a nude rat recipient. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 128: 147-53.
7. Bittencourt RAC. Cultura de Condrócitos para uso terapêutico: reconstituição de cartilagem [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2008.
8. 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.
9. Freshney RI. Introduction. In: *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2000. p. 1-8.
10. Birchall M, Macchiarini P. Airway transplantation: a debate worth having? *Transplantation*. 2008; 85: 1075-80.
11. Macchiarini P, Walles T, Biancosino C, Mertsching H. First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 128: 638-41.
12. Hallers EJ, Rakhorst G, Marres HAM, Jansen JA, Kooten TG, Schutte HK, et al. Animal models for tracheal research. *Biomaterials*. 2004; 25: 1533-43.

13. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido epitelial. In: Histologia básica. 11th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 66-90.
14. Moore KL, Persaud TVN. O sistema respiratório. In: Moore KL, Persaud TVN, Embriologia clínica. 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 199-211.
15. Garcia SML, Fernández CG. Sistema respiratório. In: Garcia SML, Fernández CG. Embriologia. 2th ed. São Paulo: Artmed; 2001. p. 297-300.
16. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials*. 2009; 30: 3749-56.
17. Wu W, Feng X, Mao T, Feng X, Ouyang HW, Zhao G, et al. Engineering of human tracheal tissue with collagen-enforced poly-lactic-glycolic acid non-woven mesh: A preliminary study in nude mice. *Oral Maxillofac Surg*. 2007; 45: 272-8.
18. Covas DT. Células-tronco mesenquimais. In: Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu; 2006. p. 35-48.
19. 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.
20. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potencial for homing. *Stem Cells*. 2007; 25: 2739-49.
21. Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S, Yamada T, Nakata S, Ohkuma M, et. al. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *Dermatol Sci*. 2007; 48: 43-52.
22. Zago MA. Células-tronco: origens e propriedades. In: Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu; 2006. p. 3-20.
23. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004; 32: 414-25.
24. Freshney RI. Differentiation. In: Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2000. p. 259-67.
25. Freshney RI. Biology of cultured cells. In: Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2000. p. 9-18.
26. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido cartilaginoso. In: Histologia básica. 11th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 129-34.

27. Gartner LP, Hiatt JL. Cartilagem e osso. In: Atlas colorido de histologia. 3th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 64-88.
28. Felisbino SL, Carvalho HF. Condrócito. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB. Células: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Manole; 2005. p. 11-21.
29. Moore KL, Persaud TVN. O sistema esquelético. In: Embriologia clínica. 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 343-62.
30. Garcia SML, Fernández CG. Sistema articular e sistema esquelético. In: Embriologia. 2th ed. São Paulo: Artmed; 2001. p. 381-90.
31. Weber M, Steinert A, Jork A, Dimmler A, Thurmer F, Schutze N, et al. Formation of cartilage matrix proteins by BMP-transfected murine mesenchymal stem cells encapsulated in a novel class of alginates. *Biomaterials*. 2003; 23: 2003-13.
32. Conconi MT, Coppi PD, Liddo RD, 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. *Transpl Int*. 2005; 18:727-34.
33. Zani BG, Kojima K, Vacanti CA, Edelman ER. Tissue-engineered endothelial and epithelial implants differentially and synergistically regulate airway repair. *Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 7046-51.
34. Resolução RDC nº 153 de 14 de junho de 2004. Determina o regulamento técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. [Internet]. Brasília: ANVISA; 2004. Acesso 15/07/2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>
35. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27: 3675-83.
36. Quitzan JG. Avaliação funcional e histológica do enxerto tubular de matriz acelular arterial heteróloga como substituo da uretra em coelhos [tese] Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2009.
37. 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.
38. 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.
39. Gratzer PF, Harrison RD, Woods T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. *Tissue Eng.* 2006; 12: 2975-83.
 40. Bagnato VS. Os fundamentos da luz laser. *Fis Esc.* 2001; 2: 4-9.
 41. Bagnato VS. Laser e suas aplicações em ciência e tecnologia. São Paulo: Livraria da Física; 2008. 87p.
 42. Bagnato VS, inventor. Uso de LEDs (light emitting diodes) para terapia bioestimuladora. BRPI0200200-0. 23 Jan 2002.
 43. Lizarelli R. Selective ablation of dental enamel and dentin using femtosecond laser pulses. *Laser Phys Lett.* 2008; 5: 63-9.
 44. Wu W, Cheng X, Zhao Y, Chen F, Feng X, Mao T. Tissue engineering of trachea-like cartilage grafts by using chondrocyte macroaggregate: experimental study in rabbits. *Artif Organs* 2007; 31(11):826-50.
 45. Roh JL, Kim DH, Rha KS, Sung MW, Kim KH, Park CI. Benefits and risks of mitomycin use in the traumatized tracheal mucosa. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 2007; 136:459-63.
 46. 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.
 47. 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.
 48. Karu TI. Low power-laser therapy. In: Dinh T. *Biomed Photon Handbook* Boca Raton: CRC Press; 2003.
 49. Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2005; 81: 98 – 106.
 50. Kumar V de, Abbas AK, Fausto N. Robbins & Cotran *Patologia – bases patológicas das doenças.* In: *Inflamação aguda e crônica.* 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 49-89.

Anexos





Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.

CEP: 18.618-970

Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99




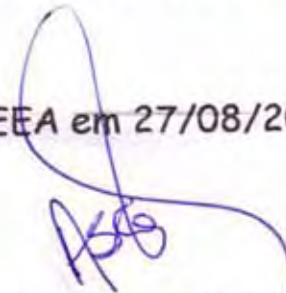
Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 751 sobre o projeto de pesquisa "Proposta de modelo experimental de neotraquéia em coelho utilizando técnicas de engenharia de tecidos", a ser conduzido por Thaiane Cristine Evaristo, orientada pela Prof^a. Dr^a Elenice Deffune, com a colaboração de Marjorie de Assis Golim e Raul Lopes Ruiz Júnior, 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 mesmo.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 27/08/2009.


Prof^a Dr^a Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA