UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

WONER MION

Descelularização de traqueia suína utilizando equipamento multifuncional

São Carlos 2020

WONER MION

Descelularização de traqueia suína utilizando equipamento multifuncional

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

Área de concentração: Física Aplicada Opção: Física Biomolecular Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

Versão Corrigida (versão original disponível na Unidade que aloja o Programa) AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

> Mion, Woner Descelularização de traqueia suína utilizando equipamento multifuncional / Woner Mion; orientador Francisco Eduardo Gontijo Guimarães - versão corrigida --São Carlos, 2020. 97 p.

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Meus sinceros agradecimentos:

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

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

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

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

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

A persistência é o caminho do êxito. Charlie Chaplin.

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

Tracheal problems originated from congenital or acquired stenosis, traumatic processes, cancers, or infections are still a major issue for medical care. The production of decellularized organs by biotechnical engineering and regenerative medicine has been growing as an attempt to solve this problem. The goal of this study was to develop multifunctional equipment for the performance of all the decellularization processes while assuring acceptable and reproducible quality standards, regarding the mechanical and physical-chemical characteristics, for future cell planting and implants. Nine decellularization protocols were carried out on 15 cm swine trachea (Large White) of which 4 cm were reserved for control. The groups were divided according to exposure or non-exposure to LED light (450 nm \pm 20 nm - 90 J / cm2), with or without treatment or without photodithazine (PDZ) (5 μ g / ml or 20 μ g / ml), with 1 cycle (24 hours) or 2 cycles (48 hours) of decellularization. All groups underwent treatment with ionic detergent (4% SDS) and ultrasound (52kHz) during the cycles. Results at 48 hours were superior in comparison with 24 hours. The association with the action of the light with PDZ treatment in one cycle was not superior to the use of only photosensitization, while both tests had similar values in terms of DNA reduction in tracheal tissue, 61.3 and 60.81%. The same was evidenced for two cycles: DNA reduction of 76.79% for the association of the action of light with PDZ treatment and a reduction of 70.67% for the use of only PDZ. Treatment with PDZ at 20 µg / ml, with 1 cycle, showed more expressive results with a 75.09% decrease of DNA. Thus, it can be inferred that the photosensitizer has a determining role in cell decellularization with dose-dependent features. It could be observed no protocol difference in the concentration of glycosaminoglycan, despite the maintenance of the biomechanical properties in the groups. The multifunctional equipment proved to be effective, with reproducible tests for the decellularization of swine trachea, as a plausible model for human trachea with an association of physical and chemical processes emerging as good options for the production of decellularized tissues.

Keywords: Trachea. Decellularization. Multifunctional equipment. Photoditazine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Traqueia seccionada transversalmente21				
Figura 2 -	Composição celular do epitélio traqueal humano22				
Figura 3 -	Visão geral esquemática das matrizes extracelulares, seus principais compo- nentes e receptores da superfíciecelular				
Figura 4 -	Traqueia com estenose que pode ser fechada por ressecção traqueal. Patolo- gias complicadas com comprometimento traqueal acima de 50% do órgão, necessidade de transplante				
Figura 5 -	Processo da Bioengenharia de Tecidos27				
Figura 6 -	Diagrama de energia de Perrin-Jablonski mostrando a absorção do fotão de luz (hn) promovendo a excitação eletrônica para o estado Singleto (S1) ou Tripleto (T1) promovendo as reações do tipo I e II				
Figura 7 -	Reações envolvidas no mecanismo do tipo I	33			
Figura 8 -	Reações envolvidas no mecanismo do tipo II	33			
Figura 9 -	Estrutura da Hematoporfirina	35			
Figura 10 -	Estrutura da Photodithazine e Espectro de Absorção	36			
Figura 11 -	Esquema representativo do segmento traqueal utilizado: 4 cm destinado aos contro- les e 11 cm para a descelularização				
Figura 12 -	Biotable [®]	45			
Figura 13 -	Protocolo de tratamento PDZ	6			
Figura 14 -	Teste de tração força longitudinal em traqué suína	eia 47			
Figura 15 -	Teste de tração força tranversal em traqueia suína	47			
Figura 16 -	Registro do resultado do obtido no Teste de Tração longitudinal	18			
Figura 17 -	(A) Amostras Pré-extração. (B) Flourômetro Qubit 2.0 Invitrogen [®]	19			
Figura 18 -	(A) Subdivisão regional da traqueia. (B) Traqueia controle para análise da celularidade. (C) Traqueia descelularizada para análise da celularidade50				
Figura 19 -	Protótipo do equipamento multifuncional para descelularização. (A) Equipa- mento multifuncional. (B) Sistema óptico. (C) Central de automoção53				
Figura 20 -	Traqueias (A) Traqueia in natura. (B) Traqueia pós-tratamento (descelulari- zada)				
Figura 21 -	Fotomicrografias de Traquéia suína referentes ao grupo controle e grupos com diferentes tratamentos de descelularização. Coloração com HE (Hemato- xilina e Eosina) Bar = 100 mm e Bar = 20 mm. Aspectos morfológicos: (f) Tecido Cartilaginoso. Nota-se o aspecto normal do tecido cartilaginoso em to-				

	dos os grupos analisados. Presença de grande número de condrócios no grupo
	controle e núcleos remanescentes nos grupos descelularizados. () Con-
	drócitos. Nota-se a presença de condrócitos em todos os grupos. (\Rightarrow) La-
	cuna vazias. Observa-se aumento de lacunas vazias (sem condrócitos) nos
	grupos descelularizados. (1) Pericôndrio. Nota-se aspecto morfológico
	normal para todos os grupos e diminuição da presença de condroblastos
	nos grupos descelularizados. (ML) Músculo Liso. Aspecto morfológico
	normal no grupo controle. Nota-se que para os grupos descelularizados
	houve desconexão do pericôndrio. (TC) Tecido Conjuntivo. Aspecto ínte-
	gro no grupo controle. Nota-se que nos grupos descelularizados desorgani-
	zação do tecido. (EP) Epitélio traqueal pseudoestratificado cilíndrico cilia-
	do. Aspecto morfológico normal para o grupo controle e ausência total pa-
	ra os grupos descelularizados
Figura 22 -	Fotomicrografias de traqueia suína referentes ao grupo controle e grupos
	de Masson Bar – 100mm Nota-se o aspecto normal da distribuição das fi-
	bras de colágeno em todos os grupos
	bias de conageno em todos os grupos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Material de origem e forma de produtos comerciais baseados em ECM dispo- níveis para aplicações terapêuticas	.28
Tabela 2 -	Média e desvio padrão das variáveis do ensaio de tração longitudinal das tra- queias <i>in natura</i> e das traqueias descelularizadas (p<0,05)	54
Tabela 3 -	Média e desvio padrão das variáveis do ensaio de tração lateral das traqueias <i>in natura</i> e das traqueias descelularizadas	55
Tabela 4 -	Quantificação média de DNA (ng/MG) e redução percentual	.57
Tabela 5 -	Relação de trabalhos no processo de descelularização de traqueias de suínos	.75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	.19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	.21
2.1	Traqueia	. 21
2.2	Matriz extracelular	. 22
2.3	Transplante traqueal	. 24
2.4	Bioengenharia de tecidos	. 26
2.5	Descelularização	. 28
2.6	Efeito Fotodinâmico	. 31
2.7	Fotossensibilizadores	. 34
2.7.1	Photodithazine	. 35
3	JUSTIFICATIVA	.37
4	OJETIVOS	.39
4.1	Objetivo Geral	. 39
5	MATERIAL E MÉTODO	.41
5.1	Etapa 1	. 41
5.2	Etapa 2	. 41
5.2.1	Obtenção de Traqueias	. 41
5.2.2	Protocolos de Descelularização	. 42
5.2.3	Tratamento com Photodithazine	. 44
5.2.4	Ensaios biomecânicos das traqueias	. 46
5.2.5	Quantificação DNA	. 48
5.2.6	Microscopia de Luz	. 49
5.2.7	Estatística	. 51
6	RESULTADOS	.53
6.1	Elaboração e construção do equipamento multifuncional.	. 53
6.2	Ensaios biomecânicos das traqueias	. 53
6.3	Quantificação de DNA	. 56
6.4	Análise Histológica	. 59
6.5	Quantificação de Colágeno	. 63
6.6	Quantificação Glicosaminoglicanos	. 65
7	DISCUSSÃO	.69
8	CONCLUSÃO	.79
	REFERÊNCIAS	.81

1 INTRODUÇÃO

A busca por alternativas na reparação ou transplantes traqueais são assuntos debatidos pelo meio clínico e científico, mas sem solução definitiva. A engenharia de tecidos surgiu como alternativa na tentativa de solucionar a necessidade de substitutos para transplantes. As buscas por soluções motivam inúmeras pesquisas como exemplificada no gráfico 1 - embasado em levantamento bibliográfico em base de dados eletrônicas PUBMED/MEDLINE consultadas, retrospectivamente, de 1947 até 2019. Para efetuar esta fase de revisão bibliográfica foram utilizados os termos: reconstrução traqueal, transplante de traqueia, engenharia de tecidos, descelularização e automação para equipamentos de descelularização, sem restrição de línguas.

Foi possível estabelecer um panorama sobre o interesse na terapia traqueal. Durante os primeiros 40 anos praticamente não houve mudança significativa no número de pesquisas abordando o assunto. Os trabalhos publicados envolviam as primeiras tentativas de transplante e reconstrução traqueal. Somente a partir de 1985 identifica-se um expressivo aumento de pesquisas sobre estes temas. Em meados de 1996 iniciaram as pesquisas envolvendo bioengenharia de tecidos e descelularização. Mas, é a partir de 2010 que ocorre uma extraordinária alteração do quadro onde a técnica de descelularização tecidual se torna o tema com maior destaque nas pesquisas, com produção de mais de 350 artigos científicos somente nos últimos 7 anos, mais que o dobro das pesquisas envolvendo os demais assuntos. Novamente, a descelularização mostra-se uma possibilidade real e alcançável na busca pela reconstrução ou substituição de órgãos. Neste âmbito, as dificuldades encontradas para estabelecer um protocolo de descelularização eficaz esbarram em custo elevado, longos períodos de manipulação para produção dos Scaffolds (arcabouços) e dificuldade na reprodutibilidade dos protocolos. Isto pode ser sanado com a automação da descelularização. A descelularização, à exemplo do que aconteceu com os laboratórios de hematologia, praticamente automatizados em 100%, se beneficiam da diminuição do tempo de manipulação, com o aumento da confiabilidade e rastreabilidade dos exames e de forma mais expressiva ainda, com a diminuição do erro humano.¹

Publicações Anuais



- Descelularização de Traqueias
- Automação para equipamentos de Descelularização

Gráfico 1 - Publicações inerentes ao trabalho Fonte: Elaborado pelo autor

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Traqueia

A traquéia é uma das estruturas constituintes do sistema respiratorio permitindo a passagem de ar entre as vias aéreas superior e inferior além de participar da regulagem do aquecimento, umidificação e limpeza do ar inspirado.^{3,7}

A traqueia humana possui entre 11-12 cm de comprimento e entre 2-2,5 cm de diâmetro em adultos, constituída por anéis de cartilagem hialina incompletos em forma de C que proporcionam rigidez suficiente para o impedimento do colapso do órgão durante a respiração. Esses anéis são ligados entre si por um tecido conjuntivo fibroelástico, que promove flexibilidade à traqueia e permite seu alongamento durante a inspiração.³ As extremidades desses anéis são unidas por músculo liso capaz de diminuir o diâmetro da luz traqueal por meio de contrações, auxiliando o deslocamento de partículas estranhas e muco durante a tosse.²⁻³

Esse conjunto de cartilagem, tecido de revestimento, tecido conjuntivo e músculo permite responder aos mecanismos de estresse que envolvem a respiração, a deglutição, a gravidade e impactos.⁴



Figura 1 – Traqueia seccionada horizontalmente Fonte: Adaptada de https://br.depositphotos.com/60816665/stock-illustration-anatomy-of-the-trachea.html

A traqueia apresenta um epitélio respiratório composto por diferentes células: pseudoestratificadas cilíndricas ciliadas, calciformes, basais, serosas e neuroendócrinas que são responsáveis pela lubrificação, retenção e limpeza de impurezas, monitoramento de oxigênio e dióxido de carbono e reposição celular.⁵⁻⁶

A lamina própria é formada por um tecido conjuntivo frouxo subepitelial e feixes de fibras elásticas (tecido fibroelástico) que contém ductos que conduzem o muco à luz traqueal, além de conter nódulos linfáticos, vasos sanguíneos, glândulas mucosas e seromucosas.^{3,10}



Figura 2- Composição celular do epitélio traqueal humano Fonte: Adaptada de HAYKAL S.⁷

2.2 Matriz extracelular

Os órgãos e tecidos possuem uma composição heterogênea entre células, as unidades funcionais dos organismos, e componentes acelulares, denominada de matriz extracelular (MEC).^{3,11}

A composição estrutural da MEC, em sua maioria, é integrada por proteína, polissacarídeos e água. A MEC apresenta uma especificidade estrutural, bioquímica e biofísica adequadas para funcionalidade dos componentes celulares. Além das diversas características mecânicas e bioquímicas, a MEC também promove a manutenção para desenvolvimento celular, homeostase, orientação, crescimento e migração celular, através de receptores, morfogênese e atividade mitótica.⁸⁻¹¹

A MEC do tecido conjuntivo fibroelástico (TCF), presente na traqueia, desempenha papel fundamental ao suportar a resistência das forças de compressão e tensão.¹²⁻¹³ A resistência do TCF é decorrente de um gel amorfo constituído de glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas. As glicosaminoglicanas (GAGs) são longas cadeias polissacarídicas, negativamente carregadas, que têm a capacidade de se ligar a grandes quantidades de água tornando a matriz hidratada, o que auxilia na resistência à compressão.

As proteoglicanas são macromoléculas que permitem a MEC resistir às forças de compressão e auxiliam na migração celular. As glicoproteínas permitem às células se fixarem na MEC.^{3,10}

A MEC presente nos anéis de cartilagem hialina, apresenta colágeno do tipo II associada a glicoproteínas adesivas e proteoglandinas com propriedades bioquímicas e mecânicas que proporcionam resistência às forças de tensão e elasticidade do tecido.³⁻⁴



Figura 3 - Visão geral esquemática da matriz extracelular, seus principais componentes e receptores da superfície celular.
Fonte: THEOCHARIS.¹⁴

A ressecção e reconstrução traqueal são comumente realizadas em função de uma estenose traqueal pós-intubação, tumor traqueal, estenose laringotraqueal idiopática e fístula traqueoesofágica. No entanto, ocorrem complicações em aproximadamente 20% dos pacientes, dos quais metade são complicações anastomóticas. As complicações incluem formação de tecido de granulação, reestenose da traquéia, separação anastomótica e formação de fístula, infecção da ferida, edema da laringe e disfunção glótica.¹⁵

Apesar de existirem mecanismos de prevenção das complicações, vários fatores demonstraram influenciar a incidência destas. Estes incluem indicação tardia para cirurgia,

história de antecedentes ressecção, presença longa em respiradores além de comorbidades como a obesidade mórbida e uso crônico de corticoides, além do comprimento da traquéia danificada.

O tratamento da atresia ou estenose traqueal congênita pode ser dificultado pela falta de tecido suficiente para a reconstrução cirúrgica, pois o comprimento da lesão da traquéia pode ser extenso. Nos últimos 60 anos, várias tentativas de reconstrução traqueal foram tentadas clinicamente e experimentalmente, incluindo o uso de próteses, autoenxertos, homoenxertos e aloenxertos. Como próteses foram utilizadas a tela de pol/iuretano Dacron, politetrafluoretileno, tela de polipropileno, aço, teflon, silicone e até tubos de vidro chegaram a ser testados. Como biopróteses já foram utilizadas traquéias de cadáveres, aorta, dura máter, cartilagem entre outros materiais. Em todos os casos, as complicações como como infecção, extrusão e estenose constituem-se uma dura realidade.¹⁶ Em 1994 conseguiu-se sucesso com substituição traqueal em cão, por tubo de Dracon® sendo que no interior houve a aplicação e silicone e fibroblastos autólogos. Isto abriu o desenvolvimento dos dispositivos contendo células e de protocolos de descelularização de traquéias.¹⁷

2.3 Transplante traqueal

A área médica, nas últimas décadas, obteve avanços expressivos em tratamentos de diversos tipos de doenças. No entanto, lesões que acometem a traqueia continuam sendo um desafio para comunidade científica.¹⁸⁻¹⁹

Pacientes que apresentam alterações traqueais por: estenoses (adquirida ou congênitas), queimaduras, traumas ou injúrias pós-intubação, são submetidos a traqueoplastia, ressecções de segmentos traqueais e anastomose para reconstrução primária do órgão, na tentativa de restaurar a continuidade do tubo traqueal (figura 4). Contudo, esta técnica se limita à porções lesionadas menores que 50% para adultos e 30% para criança.^{7,20-25}

Patologias que acometem grandes extensões, como ocorre principalmente em retiradas de tumores, estenoses e deformidades congênitas da traqueia, impossibilitam o uso da traqueoplastia, pois não há tecido adjacente suficiente para a realização da anastomose e deficiência da circulação arterial.^{12-13,20,26-27}



Figura 4 - Traqueia com estenose que pode ser fechada por ressecção traqueal. Patologias complicadas com comprometimento traqueal acima de 50% do órgão, necessidade de transplante Fonte: HONDT.²⁷

Essas patologias implicam em procedimentos terapêuticos, como terapia endolumial, ^{22,28} os quais dependem de vários procedimentos cirúrgicos, infelizmente, limitados. Pacientes que recebem a colocação de válvulas e tubos apresentam infecções recorrentes.^{7, 22} Contudo, a correção traqueal, independentemente da abordagem ou técnica utilizada, apresenta altas taxas de complicação e frequente morbidade em longo prazo,²⁹⁻³¹ acarretando elevados custos para o sistema de saúde.³²

Ainda não está estabelecida uma terapia definitiva para o tratamento de danos traqueais extensos.³³⁻³⁴ Esse panorama seria diferente se houvesse possibilidade de construção de um substituto traqueal que apresentasse as propriedades anatômicas, fisiológicas e biomecânicas similares à traqueia nativa.³⁵⁻³⁶

Diante deste quadro, o transplante traqueal surge como única opção terapêutica para correção de lesões extensas em traqueias.³⁷ A traqueia é um órgão de difícil substituição em decorrência de sua pluralidade funcional.³⁸

Transplantes de órgãos podem melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevida de muitos pacientes, porém a escassez de doações deste órgão e a possibilidade de rejeição do tecido por parte do receptor ainda são fatores complicantes.^{18,24,35}

Os substitutos traqueais podem ser classificados em cinco categorias: materiais protéticos, tecidos autógenos, tecidos não viáveis, transplantes traqueais e engenharia

tecidual.^{22,25} Todavia, os quatro primeiros procedimentos utilizando substitutos apresentaram sucesso limitado, devido às infecções bacterianas, inflamação, tamanho inadequado, deficiência ou falta de revascularização, epitelização, proliferação de tecido de granulação, composição não efetiva das propriedades fisiológicas do tecido original e complicações imunológicas.³⁹⁻⁴² Outro fator limitante em relação aos alotransplantes é a falta de doadores, imunossupressão dos enxertos e revascularização.^{24,43-46}

Atualmente, na literatura científica não há confirmação de um substituto ideal para realização de transplante traqueal, que apresente as características de: rigidez, flexibilidade longitudinal e transversal, hermético, biocompatibilidade, promova integração tecidual, nãoimunogênico, não tóxico, não carcinogênico, resistente à colonização bacteriana e sem necessidade de imunossupressão ^{18,31,47} de fácil implantação e promotor da reepitelização.⁴⁸

Diante deste cenário, a engenharia tecidual surge como nova ferramenta no campo do transplante e reconstrução traqueal. A possibilidade da confecção de enxertos funcionais, adaptados e seguros ao organismo, minimizando a reação contra o enxerto, ainda é um desafio para alcançar o sucesso clínico.^{24,49}

2.4 Bioengenharia de tecidos

A Bioengenharia de Tecidos (BT) consiste na substituição de tecidos ou órgãos através do isolamento e cultivo celular *in vitro* ou *in vivo* semeadas em arcabouços, oriundos de biomateriais, naturais ou sintéticos, antes do uso em pacientes.⁵⁰⁻⁵¹

A obtenção de arcabouços sintéticos é relativamente fácil,–pois dispensa doadores, além da possibilidade de quantidade disponível para o seu uso. Porém, há dificuldade em produzir um arcabouço sintético estruturalmente igual ao nativo.⁷ Além disso, arcabouços sintéticos promovem maior resposta inflamatória^{24,44} quando comparados a arcabouços obtidos por descelularização de órgãos e tecidos.^{24,52}

O avanço da bioengenharia de tecidos, através de técnicas de descelularização combinadas com células tronco, moléculas bioativas e biomateriais surge como novas opções de tratamento para a reparação ou substituição de tecidos traqueais danificados, tornando-se opção em potencial.⁵⁰ A ET está apoiada em uma tríade de conhecimentos interdiciplinares: Biologia Celular, Biomateriais e Bioquímica (Figura 3),⁵³⁻⁵⁴ que permitem o desenvolvimento de um arcabouço com estruturas biomecânica e bioquimíca similares ao tecido *in natura* permitindo a ancoragem, orientação, regulação e desenvolvimento das células.⁵⁵



Figura 5 – Processo da Bioengenharia de Tecidos. Fonte: Adaptada de LOTT.⁵⁰

O uso de matriz extracelular (MEC) de tecido biológicos como arcabouços é cada vez mais atraente como substituto traqueal. Esta estrutura não só pode fornecer apoio estrutural, mas também pode regular o comportamento da adesão e crescimento celular.⁵⁶ O uso da matriz extraceluar descelularizada a partir de tecido doador já é empregado (Tabela 1) e vem sendo importante ferramenta na medicina reparadora e de transplanstes.⁵⁷

Produto	Companhia	Material	Forma
AlloDorm	LifeCall	Dala Humana	Notural
	LiteCell		Natural
Axis dermis	Mentor	Derme Humana	Natural
Bard Dermal Allograft	C R Bard	Derme de Cadáver Humano	Natural
CuffPatch	Biomet Sports Medicine	Submucosa de Intestinal Suína (SIS)	Reticulado
DuraADAPT	Pegasus Biologicals	Pericárdio Equino	Reticulado
Dura-Guard	Synovis Surgical	Pericárdio Bovino	Reticulado
Durasis	Cook Medical	Submucosa Intestinal Suína (SIS)	Natural
Durepair	TEI Biosciences/Medtronic	Pele de feto Bovino	Natural
FasLata	C R Bard	Fáscia lata de Cadáver	Natural
Graft Jacket	Wright Medical Tech	Derme Humana	Natural
Oasis	Cook Biotech/Healthpoint	Submucosa Intestinal Suína (SIS)	Natural
OrthADAPT	Pegasus Biologicals	Pericárdio Equino	Reticulado
Pelvicol	C R Bard	Derme Suina	Reticulado
Peri-Guard	Synovis Surgical Innovations	Pericárdio Bovino	Reticulado
Permacol	Covidien	Pele Suína	Reticulado
PriMatrix	TEI Biosciences	Pele de feto Bovino	Natural
Restore	DePuy	Submucosa Intestinal Suína (SIS)	Natural
SurgiMend	TEI Biosciences	Pele de feto Bovino	Natural
Surgisis	Cook Medical	Submucosa Intestinal Suína (SIS)	Natural
Suspend	Mentor	Human fascia lata	Natural
TissueMend	TEI Biosciences	Pele de feto Bovino	Natural
Veritas	Synovis Surgical Innovations	Pericárdio Bovino	Reticulado
Xenform	TEI Biosciences/Boston Scientific	Pele de feto Bovino	Natural

Tabela 1- Material de origem e forma de produtos comerciais baseados em ECM disponíveis para aplicações terapêuticas

Fonte: Adptada de KEANE.⁵⁸

2.5 Descelularização

A descelularização é o processo de remoção das células do tecido, resultando em um *scaffold* (arcabouço) de MEC inerte do ponto de vista imunológico, estável estruturalmente e apto para implantação de células *"in vitro"* ou *"in vivo"* do próprio receptor.⁵⁵

O uso de arcabouços naturais proporciona benefícios biológicos, pois permitem melhor e maior interação com tecidos adjacentes, no entanto, a preparação deste biomaterial deve ser feita com critérios bem delineados a fim de garantir um arcabouço que promova a menor antigenicidade ao hospedeiro.^{57,59-61} O processo de descelularização deve retirar materiais celulares, nucleares e proteínas imunologicamente ativas que podem promover reações imunes adversas, preservando as propriedades biomecânicas da MEC e os proteoglicanos, responsáveis pela ancoragem das células na rescelularização, e facilitando atividades biológicas, como angiogenese.^{24,39,58,62-65}

Ultimamente os protocolos de descelularização utilizam conjuntamente processos físicos, químicos e enzimáticos na tentativa de minimizar danos na composição da MEC.⁶⁶⁻⁶⁸

A eficácia dos agentes descelularizantes e protocolos de descelularização dependem dos fatores e aspectos do tecido, incluindo celularidade, rigidez, densidade e espessura da MEC do tecido.⁶⁶

Na abordagem dos produtos químicos identifica-se o uso de detergentes iônicos e nãoiônicos ou enzimas que permitem a solubilização das membranas celulares e dissociam as moléculas de DNA. Porém, esses materiais também podem lesar as proteínas da MEC. É importante ressaltar que a remoção residual destes produtos após o tratamento é fundamental, visto que podem promover citoxicidade e afetar o processo de recelularização da MEC posteriormente.⁶⁹

Os detergentes iônicos e não-iônicos são utilizados amplamente nos protocolos de descelularização de traqueias, válvulas cardíacas, vasos sanguíneos, etc, devido aos seus efeitos relativamente suaves nas estruturas da MEC.^{62,70} Esses detergentes rompem as interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, mas não alteram a conformação funcional porque mantêm as interações proteína-proteína dos tecidos intactas.⁶⁷ Atualmente os detergentes mais utilizados são o Deoxicolato de Sódio (DS), Triton X-200 e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), pois possuem alta eficiência na lise celular, fácil remoção e manipulação.^{58,70-72} Defrontando os detergentes utilizados, o SDS proporciona maior lise em membranas celulares e de proteínas citoplasmáticas.^{60,73}

As técnicas enzimáticas de descelularização incluem o uso da digestão de proteases e nucleases. A tripsina é a enzima mais utilizada nos protocolos de descelularização, já que é altamente específica. As endonucleases catalisam a hidrólise das ligações interiores das cadeias de ribonucleotídeo e desoxiribunucleotídeo, enquanto as exonucleases catalisam a hidrólise das ligações terminais dessas cadeias levando à degradação do RNA e do DNA. Os métodos enzimáticos de descelularização provocam um efeito adverso nos componentes da MEC.^{58,74} O tratamento prolongado com tripsina/EDTA reduz o conteúdo de laminina e fibronectina, mas não afeta a quantidade de colágeno.^{67,69}

Os métodos físicos rompem as membranas celulares, facilitando o processo subsequente de lavagem para remoção dos materiais intracelulares, porém são incapazes de descelularizar um tecido completamente. Ainda, sua combinação com outras técnicas permite melhorias na descelularização.⁷⁵ Os métodos físicos incluem desde congelamento, pressão direta, sonicação, agitação ⁷⁵ e ação da luz.⁵¹

O processo de congelamento/descongelamento promove a formação de cristais de gelo intracelulares permitindo o rompimento da membrana da célula e liberação de seu conteúdo interno. Um único processo de congelamento/descongelamento é capaz de reduzir a resposta imune sem afetar drasticamente as proteínas da MEC. Porém, após a aplicação desse método se faz necessária a remoção dos materiais celulares.^{67,69}

A agitação mecânica e a sonicação devem ser utilizadas simultaneamente com tratamentos químicos pois auxiliam a lise e a remoção dos *debris* celulares.^{51, 67}

A ação do ultrassom pode promover lise da membrana celular através do processo de cavitação⁷⁶ ou pode induzir efeitos celulares sublíticos oriundos de pequenas rupturas transitórias promovidas pelas ondas de choque alterando a permeabilidade, adesão e morfologia da membrana celular.⁷⁶⁻⁸² Estes efeitos sublíticos podem tardiamente resultar em lise celular.^{80,83} Hung *et al.*, 2013, confirmaram a importância da sonicação por ultrassom na descelularização de laringes, todavia eles também notificaram que exposição prolongada pode afetar a MEC. Keane *et al.*, 2012, observaram que a agitação mecânica é um fator importante para dissociação do DNA e da retirada de células lisadas. Os tipos de procedimentos mecânicos e volume de reagentes devem ser empregados dependendo da composição, volume e densidade do tecido.⁸⁴ Tecidos mais densos e espessos como traqueias necessitam de protocolos mais extensos de descelularização que podem variar de dias até meses.⁶⁹

Pesquisas inferem que biomateriais não são somente estruturas fixas que recebem células, mas são materiais que interagem dinamicamente com o microambiente tecidual. Esta interação dependerá muito da quantidade de resíduos que os diferentes polímeros possam apresentar assim como os biomateriais biológicos, que usam produtos químicos nos diferentes protocolos de decelularização.⁸⁵

Dentro deste panorama surge a fotônica como alternativa de uso, inclusive na fabricação de órgãos sólidos para uso em laboratório. O potencial fotobiomulador do LED (*Light Emitting Diode*) e do LASER (sigla <u>inglesa</u> para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) de baixa intensidade estão relacionados com o tipo e metabolismo das células irradiadas e a parâmetros físicos como: fluência (dose), potência (quantidade de energia transmitida), densidade de energia (irradiância), tempo de exposição e comprimento de onda.⁸⁶⁻⁸⁸

Moore *et al.*, 2005, observaram que células endoteliais e fibroblásticas com uma mesma irradiância e dose, mas com diferentes comprimentos de onda apresentaram resultados distintos em relação a proliferação celular. Com comprimento de onda de 630 nm eles obtiveram um efeito bioestimulador enquanto com 450 nm o efeito foi bioinibidor para o

crescimento celular. O efeito bionibidor da luz com 450 nm de comprimento de onda aumenta o interesse na terapia antineoplásica e na redução do desenvolvimento de tumores de pele em modelo experimental.⁸⁹⁻⁹¹ Estudos evidenciam sua capacidade de interromper a mitose, promover a ativação de fatores de apoptose, dano mitocondrial direto e promover danos ao DNA em tumores.⁹⁰⁻⁹⁴ Seus efeitos biológicos são promovidos por fotoredução de porfirinas endógenas, citocromos mitocondriais e flavoproteínas que traduzem os efeitos da luz e geram espécies reativas de oxigênio ROS (do inglês, *reactive oxygen species*) que, dependendo dos níveis, pode mediar a morte celular ou desfigurar as estruturas da membrana celular.⁹⁰⁻⁹⁷

Evaristo *et al.*, 2014, observaram que traqueias expostas a dose de 90J/cm² e comprimento de onda de 475nm conjuntamente com um protocolo de descelularização apresentaram resultados promissores. Com isto, os autores propuseram a inclusão dos efeitos bioinibidores da luz em protocolos já estabelecidos para potencializar a descelularização do tecido e reduzir o tempo para obtenção de aracabouços prontos para receber células provenientes de culturas *in vitro*.

2.6 Efeito Fotodinâmico

Moléculas de agentes químicos fotossensíveis, denominadas fotossensibilizadores (FS), podem inter-relacionar-se com a luz gerando espécies de oxigênios reativos e radicais livres. Atualmente o efeito fotodinâmico é empregado no processo de descontaminação de ambientes, superfícies,⁹⁸⁻¹⁰⁰ produtos alimentícios, água,¹⁰¹⁻¹⁰² agentes patogênicos em hemocomponentes ¹⁰³⁻¹⁰⁶ e principalmente na terapia fotodinâmica (do termo em inglês, *Photodynamic Therapy – PDT*) para o combate do câncer, infecções bacterianas e fúngica.¹⁰⁷⁻¹¹⁵

O efeito fotodinâmico é explicado por dois mecanismos de reações distintas nomeadas de tipo I e tipo II. Esquematizado pelo Diagrama de energia de Perrin-Jablonski na figura 6. ¹¹⁶⁻¹¹⁸



Figura 6 – Diagrama de energia de Perrin-Jablonski mostrando a absorção do fotão de luz (hn) promovendo a excitação eletrônica para o estado Singleto (S1) ou Tripleto (T1) promovendo as reações do tipo I e tipo II.
 Fonte: Adaptada de CELLI;¹¹⁹ DAI.¹²⁰

Os FS em seu estado fundamental possuem pares de elétrons com spins opostos que os mantém estáveis. A absorção de quantidades adequadas de fótons de luz com comprimento de onda especifico conduz a transição destes elétrons do seu estado fundamental (estado com menor energia) para um estado instável e com maior nível de energia (estado singleto (S_I)). O decaimento do estado singleto para o estado fundamental é feito com liberação da energia através de dois tipos de processos: radioativo, com emissão de luz (fluorescência) ou não radioativo, por relaxamento vibracional.¹²¹

No processo radioativo a transição energética do estado singleto para o estado fundamental ocorre de forma direta liberando a energia absorvida através de fluorescência. Neste processo não ocorre a reação fotodinâmica, contudo, esta propriedade do FS torna-o iminentemente atraente para diagnósticos por imagens.^{119, 122-125}.

No processo não radioativo ocorre um relaxamento vibracional permitindo transições intermediárias de energia do estado singleto para tripleto excitado e posteriormente para o estado tripleto mais estável, através da inversão dos spins entre cruzamento intersistema de energia. Neste processo de decaimento energético pode ocorrer perda de calor, emissão de fosforescência ou transmissão de energia promovendo reações do tipo I e II presentes no efeito fotodinâmico.¹²⁶⁻¹²⁷

A reação do tipo I envolve a interação dos FS no estado tripleto excitado como substrato/solvente celulares promovendo a formação de radicais pela transferência de elétrons para o oxigênio permitindo a formação de radicais superóxidos ($^{*}O_{2}^{-}$), radicais hidroxilas ($^{*}OH$) e peróxido de hidrogênio H₂O₂.¹²⁷ Vale advertir que o peróxido de hidrogênio é viável por longos períodos podendo atravessar a membrana celular e causar danos nos compartimentos que o alojam.¹²⁸⁻¹³³

$$O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^-$$

$$O_2^- + O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^-$$

$$O_2^- + O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^- + O_2^-$$

$$O_2^- + O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^- + O_2^-$$

Figura 7 - Reações envolvidas no mecanismo do tipo I. Fonte: CAVALCANTE.¹³⁴

A reação do tipo II envolve a transferência de energia direta do fotossensibilizador no estado tripleto excitado para o oxigênio molecular (estado fundamental tripleto) transformando-o em um oxigênio singleto.^{129,131-133,135} O oxigênio singleto é altamente reativo, considerado principal promotor de dano intracelular.¹³⁶⁻¹³⁷ Ao contrário do peróxido de hidrogênio, o oxigênio singleto possui tempo de vida e raio de ação muito pequeno. Esta característica é fundamental para o efeito fotodinâmico, pois sua atuação fica restrita a área de sua formação.^{133,135,138}

 ${}^{1}S_{0} \rightarrow {}^{1}S_{1}^{\bullet} \rightarrow {}^{3}S_{1}^{\bullet}$ ${}^{3}S_{1}^{\bullet} + O_{2} \rightarrow {}^{1}S_{0} + {}^{1}O_{2}$

Figura 8 - Reações envolvidas no mecanismo do tipo II. Fonte: CAVALCANTE.¹³⁴

Os dois tipos de reação acontecem simultaneamente, apesar disso a predominância de cada reação vai depender muito das propriedades do fotossensibilizador, quantidade de oxigênio e dos substratos intracelulares.^{129,132-133,137} Aparentemente, a reação do tipo II apresenta-se mais hábil, pois a transferência de energia e a formação do oxigênio singleto ocorrem em um tempo menor do que a velocidade de reação para formação de outros oxidantes na reação tipo I.¹³⁹⁻¹⁴¹ Durante o processo de irradiação, os FS regeneram-se e

podem funcionar de maneira cíclica, ou seja, eles conseguem formar vários oxigênios singletos através de uma molécula de fotossensibilizador¹⁴²

A seleção dos FS deve ser criteriosa, pois suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e farmacocinéticas específicas serão vitais para o efeito fotodinâmico.¹³³ Esta importância é tão relevante que vários investigadores elencaram quais devem ser suas principais características para interação e ação do efeito fotodinâmico intracelular.^{131,143-146} Consequentemente, testes de farmacocinéticas devem ser realizados com os tipos celulares de interesse do estudo para avaliar a biocompatibilidade dos FS.¹⁴⁷⁻¹⁴⁸

A molécula do fotossensibilizador deve possuir elevado coeficiente de absorção na região espectral entre 600nm e 1000nm e rendimento quântico nos estados tripletos. Ainda, deve apresentar transferência de energia para oxigênios moleculares sob picos de absorção de luz e ser inerte na ausência de luz.¹⁴⁴ Do ponto farmacocinético, a molécula deve ser anfifílica, o que permite seu adequado transporte intracelular, ter alta solubilidade e permanecer estável em soluções aquosas e sob irradiação, além de não ter toxicidade ou capacidade de indução de efeitos mutagênicos.^{116, 144,149-151}

2.7 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores são moléculas heterocíclicas (anel porfirínico) que dispõem de grupos cromóforos capazes de interagir com a luz visível podendo gerar reações fotoquímicas, fotofísicas e fotobiológicas que criam espécies reativas de oxigênio ROS, causando um efeito fotodinâmico.^{136, 139, 152-153}

Os FS costumam ser segregados por gerações: primeira, segunda e terceira. Estas separações estão correlacionadas com as questões históricas e com a abordagem da concepção o seu desenvolvimento.¹⁵⁴

Os FS da primeira geração são derivados purificados de hematoporfirina (HpD), oriundos de processos de misturas de monômeros, dímeros e oligómeros com HpD.¹⁵⁵ Os FS desta geração permanecem como os mais evidenciados em estudos e em aplicações clinicas. ¹⁵⁶ Em 1993 o Photofrin[®] foi o primeiro FS aprovado para uso clinico, após estudos de Dougherty.¹⁵⁷


Figura 9- Estrutura da Hematoporfirina. Fonte: LUZGINA.¹⁵⁸

Os FS de segunda geração possuem em sua formulação o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA, do inglês 5-aminolevulinic acid). Está classe de FS foi desenvolvida para eliminar o problema de fotossensibilidade prolongada da pele promovida pelos FS da primeira geração. Por isso, estes FS de segunda geração são quimicamente mais puros, possuem características espectrais mais otimizadas e maior rendimento quântico para formação de oxigênio singleto quando comparados aos compostos da primeira geração. Alguns dos FS de segunda geração, como Foscan[®] e Levulan[®] já são empregados em tratamento clínicos. Outros FS, como a Photodithazine (PDZ), são estudados para utilização em diversos tratamentos para diferentes doenças.¹⁵⁹⁻¹⁶²

Os FS de terceira geração são compostos que possuem conjugados biológicos como anticorpos ou lipossomas. Estes conjugados conferem aos FS de terceira geração uma melhora na polaridade, solubilidade, farmacocinética e disponibilidade intracelular dentro do tecido alvo.¹⁶³ Atualmente os FS de terceira geração representam uma grande área de atividade investigativa.^{145,156,164-165}

2.7.1 Photodithazine

A Photodithazine (PDZ) é um fotossensibilizador de segunda geração oriundo de uma modificação estrutural na clorina e pela adição de complexos de N-metil-D-glicosamina 0,5%, o que permitiu sua solubilidade e estabilidade para armazenamento. Contudo, sua síntese química é complexa e onerosa. 166

Castano *et al.*, 2005 descreveram que as propriedades fototóxicas da PDZ podem estar correlacionadas com a facilidade de interagir e penetrar a membrana celular, promovendo diversas vias de ativação de morte celular.

A ação fotodinâmica da PDZ tem sido aplicada em diversos estudos em diagnósticos de imagens, tratamentos antimicrobiana, antifúngica e principalmente em diversos casos de cânceres como de pele, cavidade oral, laringe, brônquios, esôfago e vulva. ^{159-160,162, 168-177} Mas, não há estudos que se utilizam de fotossensibilizadores no processo de descelularização.



Figura 10 - Estrutura da Photodithazine e Espectro de Absorção. Fonte: LUZGINA.¹⁵⁸

3 JUSTIFICATIVA

Problemas traqueais oriundos de estenoses adquiridas, congênitas, processos traumáticos, câncer e infecções continuam sendo um grande problema para medicina.²⁹ As recentes abordagens tecnológicas de bioengenharia de tecidos devem favorecer pacientes que sofram de problemas traqueais. A substituição de órgãos lesionados por órgãos descelularizados e recelularizados por estas técnicas visam preservar e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Porém, a obtenção de um órgão descelularizado que permita a recelularização, revascularização rápida e, ainda, possuir caráter imunogênico é um ponto crítico.¹⁷⁸ Apesar do grande avanço nas técnicas de obtenção de órgão descelularizados, inexiste na literatura critérios bem estabelecidos de controle da qualidade da traqueia descelularizada para validá-la para uso em transplantes como substituto traqueal, o que impacta em altos custos socioeconômicos na vida dos indivíduos acometidos por problemas traqueais.

O maior desafio deste projeto foi construir um equipamento multifuncional capaz de agregar técnicas de bioengenharia para obtenção de traqueias descelularizadas com padronização, automação, reprodutibilidade, garantia de rastreabilidade, aprovações nos parâmetros de qualidade e minimização do tempo.

4 OJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Propor e validar equipamento protótipo multifuncional para a descelularização de traqueias.

Objetivos Específicos

- Desenvolver equipamento que conjugue na mesma plataforma processos controlados da ação de solução detergente (SDS 4%), ultrassom, aplicação de luz LED, sob agitação constante e lavagens com soluções de PBS.
- 2. Analise morfológica da traqueia descelularizada por histologia.
- Proceder a análises de ensaios de resistência, resposta à pressão longitudinal e tranversal.
- 4. Teste de biocompatibilidades: quantificação de DNA residual em traqueias que sofreram 24 e 48 horas de tratamento.
- 5. Análise concentração de glicosaminoglicanas e colágeno por histologia.
- 6. Analisar a ação do fotossensibilizador Photodithazine como agente descelularizador.

5 MATERIAL E MÉTODO

A metodologia foi organizada em duas Etapas:

Etapa 1 - Elaboração e construção do equipamento multifuncional.

Etapa 2 - Obtenção e descelularização das traqueias pelo equipamento proposto, análises histomorfológicas, ensaios mecânicos, quantificação de DNA, colágeno e glicosaminoglicanos.

5.1 Etapa 1

Nesta etapa, sob sigilo de Propriedade Intelectual, foi elaborado e desenvolvido o projeto do equipamento multifuncional valendo-se da interação de propriedades físicoquímicas e fotônicas. A idéia foi cunhada pela dupla necessidade de encurtar o tempo de descelularização, tendo em vista que os diferentes protocolos existentes são longos e fastidiosos, além de propiciar a universalização da técnica com custo razoável, tendo em vista que o uso de enzimas do tipo RNAse e DNase são extremamente oneroso. Após a conclusão de Evaristo et. al., 2014, identificou-se que a fotônica poderia trazer uma grande contribuição em um equipamento multifuncional. Resumidamente, o equipamento permite um processo automatizado de banhos químicos e soluções de PBS, sob agitação com vazão constante de 5 L/hora, temperatura variando entre 32°C e 37°C, ação da luz com comprimento de onda 450nm ± 10nm e ultrassom de 52 kHz.

5.2 Etapa 2

5.2.1 Obtenção de Traqueias

O presente estudo utilizou 30 traqueias de 15 cm oriundas de suínos da raça *Large White* com média de 25 semanas de idade e pesando entre 60kg e 70kg, proveniente do Frigorífico Dom Pig Ltda. Os abates dos animais seguiram as normativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A obtenção, manipulação, utilização e manutenção das traqueias foram aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), como consta no Protocolo nº 1117/2016(Anexo 1).

As traqueias foram lavadas no próprio frigorífico com solução salina estéril a 0,9% (Eurofarma[®]), para retirar o excesso de sangue, e transportadas com solução HEPES 25 Mm (LGC Biotecnologia[®]) contendo antibiótico (Gentamicina 0,1 ml para cada 100 ml de meio (SIGMA G 1264[®]) dentro de caixa térmica até o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina – *Campus* de Botucatu, onde foram submetidas à limpeza cirúrgica, medição, e manutenção em freezer -80 °C, sem crioprotetor, por 24 horas até o início do protocolo de descelularização. A captação das traqueias ocorreu sempre um dia antes do início do protocolo de descelularização.

5.2.2 Protocolos de Descelularização

Foram realizados 9 protocolos diferentes de descelularização para verificar a qualidade e a reprodutibilidade do equipamento multifuncional para obter arcabouços não imunogênicos, com composição estrutural da matriz extracelular e propriedades biomecânicas preservadas.

O último grupo coletado foi destinado exclusivamente para controle do teste de tração longitudinal.

Para os protocolos propostos foram padronizados seguimentos traqueias de 15 cm em média, sendo que 4 cm foram removidos antes de iniciar os protocolos de descelularização. Estes foram empregados como autocontroles nos testes de quantificação de DNA, Colágeno, Glicosaminoglicanos e tração transversal e posteriormente comparados com o seguimento tratado, figura 11.



Figura 11 - Esquema representativo do segmento traqueai utilizado: 4cm destinado aos controles e 11 cm para a descelularização.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os grupos foram divididos segundo exposição ou não a luz LED ($450nm \pm 20nm - 90$ J/cm²) ou com tratamento ou não de PDZ:

- Grupo controle: 5 traqueias sem quais queres tratamentos;
- Grupo A (n=3): Sem ação de LED e sem tratamento com PDZ, submetidas a 1 ciclo de descelularização;
- Grupo B (n=3): Sem ação de LED e sem tratamento com PDZ, submetidas a 2 ciclos de descelularização;
- Grupo C (n=3): Irradiação com LED, sem tratamento com PDZ, submetidas a 1 ciclos de descelularização;
- Grupo D (n=3); Irradiação com LED, sem tratamento com PDZ, submetidas a 2 ciclo de descelularização;
- Grupo E (n=3): Sem ação de LED, com tratamento de PDZ (5µg/ml), submetidas a 1 ciclo de descelularização;
- Grupo F (n=3): Sem ação de LED, com tratamento de PDZ (5µg/ml), submetidas a 2 ciclos de descelularização;
- Grupo G (n=3): Irradiação com ação LED e tratamento de PDZ (5µg/ml), submetidas a 1 ciclo de descelularização;
- Grupo H (n=3): Irradiação com ação de LED e tratamento de PDZ (5µg/ml), submetidas a 2 ciclos de descelularização;

 Grupo I (n=3): Sem ação de LED e tratamento de PDZ (20µg/ml), submetidas a 1 ciclo de descelularização

Todos os grupos, exceto o controle, foram submetidos ao protocolo de descelularização descrito na patente BR 10 2015 016960-4, intitulado "PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DE ÓRGÃOS E USO DO MESMO" depositada junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, pelo Laboratório de Biologia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina da UNESP - *Campus* Botucatu. O processo envolveu;

- 1. Descongelamento das amostras a temperatura ambiente (25°C);
- Congelamento em nitrogênio líquido por 30 segundos e posterior descongelamento a temperatura ambiente (25°C).
- Adição de solução Salina tamponada com Fosfato (PBS), pH 7,2 (LGC Biotecnologia[®]) a 37°C e aplicação do processo ultrassônico na frequência de 52 kHz (CTA do Brasil[®]) em agitação (bomba peristáltica - Gilson®) a vazão constante de 5L/hora durante 35 minutos;
- 4. Remoção da solução de PBS;
- Imersão em solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 4% (LGC Biotecnologia[®]), sob agitação a 37°C com aplicação do processo ultrassônico em três momentos de 35 minutos e luz LED na dose de 90 J/cm²;
- Remoção do detergente SDS e lavagem por 35 minutos com solução de PBS a 37°C sob agitação;

Cada ciclo de descelularização compreendeu as etapas descritas do item 4 até 7.

Ainda com relação ao tempo de tratamento, os protocolos de descelularização propostos envolveram 1 ciclo (24 horas) ou 2 ciclos (48 horas) de descelularização.

O item 6 foi alterado para os protocolos que não utilizaram luz LED no processo de descelularização, grupos (A, B, E, F e I).

5.2.3 Tratamento com Photodithazine

O PDZ utilizado neste projeto foi fornecido pelo Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Medical Sciences de Moscou e cedido pelo Prof. Vanderlei S. Bagnato (IFSC-USP de São Carlos). A partir de uma solução com concentração de 5 mg/ml e solução salina tamponada com fosfato pH=7,4 (PBS), mantida a 4°C, foram preparadas as soluções nas concentrações de 5µg/ml e 20 µg/ml.

As traqueias *in natura* foram imersas em solução de PDZ a 5µg/ml (grupos E, F, G e H) ou 20µg/ml (grupo I) por 30 minutos em cuba escura para não ocorrer degradação do fotossensibilizador. Em seguida foram acondicionadas em placa de cultura e irradiadas com auxílio de uma Biotable®, desenvolvidas pelo Laboratório de Apoio Técnico, Instituto de Física de São Carlos, com luz LED com emissão predominantemente em 630 nm \pm 20 nm com irradiância de 45 mW/cm² (figura 12).



Figura 12 – Biotable®. Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram realizados 3 ciclos de trinta segundos de irradiação (dose de 1J/cm²), para promoção da bioestimulação das células e melhorar a inserção do FS, intercalados com banhos de 2 minutos na mesma solução de PDZ e finalizando com irradiação de 30 minutos (dose de 90 J/cm²). Após este tratamento as traqueias foram submetidas ao processo de descelularização. Nos protocolos de dois ciclos de descelularização foi repetido este protocolo antes do início do segundo ciclo, ainda com a mesma solução de PDZ estocada a 4°C (figura 13).



Figura 13 – Protocolo de tratamento PDZ. Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.4 Ensaios biomecânicos das traqueias

Para análise das propriedades biomecânicas das traqueias valeu-se de testes de tração longitudinal e transversal com auxílio da Máquina Universal de Ensaios Mecânicos EMIC[©], modelo DL 10.000, com precisão de \pm (0,018 + F/3700) kN, configurada pelas especificações das normas ABNT NBR NM ISSO 7500-1:2004 e ABNT NBR 6674:1999, conjuntamente com o software Mtest[®] (DDL, Minnesota – USA) pela Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina da UNESP – Campus de Botucatu com objetivo de comparar, força de tração e deformação entre traqueias *in natura* e descelularizadas.

Com o objetivo de avaliar o comportamento mecânico do tecido sob tensão as traqueias foram fixadas a máquina ($\text{EMIC}^{\mathbb{C}}$) e submetidas a esforço crescente até a ruptura do tecido. Este ensaio possibilitou comparar o tecido *in natura* e pós tratamento avaliando a resistência ou aumento da fragilidade estrutural, além de reproduzir o ambiente mecânico e fisiológico ao qual é exposto o tecido traqueal.

As traqueias foram fixadas aos suportes do equipamento com auxílio de cilindros de aço de 2,0 cm de diâmetro, conectados a luz da traqueia para servirem de ancoragem e fixação ao equipamento permitindo a mensuração da força longitudinal (figura 14). O grupo controle (5 traqueias de 10-11cm) foi empregado exclusivamente para este ensaio por se tratar de um teste destrutivo impossibilitando seu emprego nos protocolos de descelularização.



Figura 14 – Teste de tração força longitudinal em traqueia suína. Fonte: Elaborada pelo autor.

A tração transversal foi avaliada em um anel cedido de cada traqueia antes de iniciar o protocolo de descelularização. Portanto, cada traqueia teve seu controle de tração transversal pré tratamento de descelularização. Sendo que a força transversal foi obtida com ganchos metálicos ao redor do anel traqueal (figura 15).



Figura 15 – Teste de tração força transversal em traqueia suína. Fonte: Elaborada pelo autor.

Tanto as traqueias do grupo controle quanto os anéis de cada grupo antes de descelularizados foram mantidas em solução PBS durante 24 ou 48 horas seguindo o protocolo de descelularização proposto. Ao fim dos ciclos as amostras *in natura* e pós tratamentos foram congeladas a - 80°C por 24 horas e submetidas conjuntamente aos testes de trações.

Para calibração do equipamento (EMIC[©]) foram realizados testes antes do experimento proposto, com traqueias não computadas na pesquisa, a fim de assegurar que a carga longitudinal e transversal sobre o tecido fosse constante. Todos os grupos foram submetidas a ensaios de tração uniaxial com taxa constante de aumento de tensão de 100 N/min aumentando até ruptura, confirmado pela perda de carga ou aparecimento de tecido esgarçado. Os parâmetros de força máxima (N) e deformação da traqueia (mm) foram registrados com auxílio do software Mtest[®].

Para garantir a confiabilidade do experimento todo teste de tração foi realizado com caráter duplo cego e por competência do técnico da UNIPEX.



Figura 16 – Registro do resultado obtido no Teste de Tração longitudinal. Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.5 Quantificação DNA

De cada grupo experimental foram retirados um anel traqueal (*in natura* e pós descelularização) para análises de quantificação do DNA residual. O tecido foi fracionado em pequenos fragmentos com auxílio de lâminas de bisturi até obtenção de material aliquotado entre 45 a 50mg em eppendorf® livre de DNA para posterior extração e quantificação de DNA.

Foram acrescidos de 500µL tampão de digestão (30 mM Tris-HCl a 1 M; 30 mM de EDTA a 0,5 M; tween 20 a 5% (v/v); triton X-100 a 0,5% (v/v); tiocianato de guanidina puro; água pura) e 10µL de proteinase K a 20 mg/mL, seguido de homogeneização vigorosa e incubação a 55 °C, *overnight* (para dissolução do tecido). Após este período os tubos foram

centrifugados 14000rpm/1minuto, o sobrenadante foi transferido para tubo novo e o *pellet* juntamente com o tubo foram pesados para confirmar a quantidade de material não digerido com intuito de determinar o peso exato do material digerido.

Aos sobrenadantes foram acrescidos 700 μ L de clorofórmio seguido de homogeneização por 1 minuto para obtenção de emulsão e incubados a 55 °C por 30 minutos. Na sequência nova centrifugação 14000rpm/1minuto e transferência de 350 μ L do sobrenadante para novo tubo eppedorf acrescido de 500 μ L de 2-propanol (isopropanol) e 100 μ L de NA-acetato, homogeneizados vigorosamente por 30 segundos e centrifugados 10000rpm/4 minutos.

Após o sobrenadante foi descartado e acrescido 1 ml de etanol (70%) ao *pellet*, homogeinizado e centrifugado a 14000rpm/5 minutos, novamente descartado o sobrenadante e acrescido 300 µL de água ultrapura ao material residual.

O DNA extraído foi quantificado por fluorimetria com o reagente Qubit DSDNA HS ASSAY (Invitrogen Q32854) conforme recomendações do fabricante e mensuração do DNA por flourômetro Qubit 2.0 Invitrogen®.

Os resultados passaram por normalização antes de serem analisados estatisticamente.

Valor de DNA
$$\left(\frac{ng}{mg}\right) = \frac{Valor indicado Flurômetro}{Peso de material degradado$$



5.2.6 Microscopia de Luz

As análises histológicas foram realizadas no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências – *Campus* de Botucatu – UNESP. Para cada grupo



experimental foram avaliados 3 anéis *in natura* e 3 anéis pós tratamento de traquéia de suínos *Large White*, acondicionados individualmente em cassetes histológicos (Labor Import[®]), identificados e submetidos a fixação. Este procedimento foi realizado em formol tamponado 10% com PBS 7,4 (LGC Biotecnologia[®]) por 24 horas, lavados em água corrente por 24 horas, desidratados gradualmente em Álcool Etílico (70%, 80%, 90%, 100%, 100% por 5 minutos) (Synth [®]), seguidos por diafanização com Xilol (NEON[®]) e inclusão em parafina (Oxford Labware ®).

Os blocos foram submetidos a cortes com secções de 4 μ m de espessura em micrótomo modelo (Leica RM2125RT®) e fixados em lâminas silanizadas (Objektrager[®]) e preparadas para colorações em Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômico de Masson e Azul de Toluidina (Sigma-Aldrich[®]).

A coloração por HE foi realizada pela técnica padrão definida por Munro 1971 e modificada por Cardiff, 2014¹⁷⁹⁻¹⁸⁰ para identificar e quantificar a presença de núcleos e possíveis alterações morfológicas entre as traquéias *in natura* e descelularizadas. A celularidade das traqueias foi determinada pelo software livre AVSoft BioView 5, em quatro áreas distintas de 1mm², em imagens com aumento de 40x, obtidas nas regiões da mucosa, submucosa e matriz cartilaginosa.



Figura 18 – Análise de celularidade em diferentes segmentos traqueias: A) Segmentos de traqueia in natura: mucosa, submucosa e cartilagem; B) Traqueia controle; C) Traqueia descelularizada. Fonte: Elaborada pelo autor. A coloração de Tricrômico de Masson foi realizada pela técnica modificada de Van de Griff para avaliar a organização e quantificar a presença de fibras de colágeno. A coloração Azul de Toluidina foi realizada com intuito de quantificar a concentração de glicosaminoglicanos e identificar presença de núcleos entre as traquéias *in natura* e descelularizadas. As lâminas foram lavadas em Água Destilada por 1 minuto, colocadas em solução de Azul de Toluidina na concentração de 0,025% com pH 4,5 por 2 minutos e lavadas em água corrente por 1 minuto.

As lâminas foram desidratadas gradualmente em Álcool Etílico (50%, 70%, 80% e 100% por 5 minutos, colocadas em Xilol (2 vezes por 5 minutos) e montadas com Entellan (Merck[®]) e lamínula (Objektrager[®]). O material foi analisado e fotodocumentado em microscópio de luz Olympus DP71, com uso do programa Olympus DP Controlle. Para as colorações com Tricrômico de Masson e Azul de Toluidina foram retiradas imagens com aumento de 40x de áreas distintas da matriz cartilaginosa, as quais foram submetidas a análise de imagens, através do software livre AVSoft BioView 5, para análise da quantificação de fibras de colágeno e glicosaminoglicanos. As imagens foram retiradas e avaliadas por um patologista responsável que não teve conhecimento sobre qual grupo pertencia cada amostra.

5.2.7 Estatística

Para análise estatística utilizou-se o software livre BioEstat (versão 5.3;. Instituto Mamirauá), com significância estatística para o nível de 0,05. Todos os dados foram examinados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilks os quais não demostraram desvio da normalidade. Utilizou-se análise de variância ANOVA seguido de teste de Tukey-Kramer para examinar diferenças estatísticas entre as médias dos parâmetros dos grupos descelularizados e controle. Todos os dados foram analisados e processados em situação de teste cego.

6 **RESULTADOS**

6.1 Elaboração e construção do equipamento multifuncional.

O equipamento foi projetado e executado pela equipe especializada de engenheiros do Laboratório de Assistência Técnica (LAT) do CEPOF-IFSC. O protótipo empregado neste experimento está sendo submetido a pedido de patente.

Por se tratar de obra em processo de patente os detalhes do produto (equipamento) e softwares desenvolvidos para automação do mesmo não poderão ser detalhados neste momento devido ao princípio de proteção em caso de obra patenteável. No entanto, imagens do equipamento em funcionamento foram disponibilizadas sendo: vista frontal do equipamento com apresentação da cuba ultrassônica e seus dutos de alimentação com identificação das soluções empregadas nas diferentes etapas propostas; sistema óptico e central de automação (figura19).



Figura 19 – Protótipo do equipamento multifuncional para descelularização: A) Equipamento multifuncional; B) Sistema óptico.
Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2 Ensaios biomecânicos das traqueias

Um dos aspectos importantes para a bioengenharia é fornecer um suporte estrutural após a descelularização. Foram avaliados os efeitos nas propriedades mecânicas da descelularização com a utilização do equipamento multifuncional. Pode-se afirmar que a descelularização não comprometeu as propriedades mecânicas. Os resultados encontrados para o teste longitudinal mostraram uma diminuição não significativa da força tênsil, em média de (15 N \pm 3 N) nas traqueias descelularizadas em comparação com o controle (tabela 2, gráficos 2 e 3).

O teste para deformação máxima mostrou que a rigidez das traqueias descelularizadas foi similar entre os grupos A, B e I que não diferiram do grupo controle. No entanto, os demais grupos (C, D, E, F, G e H) apresentaram um aumento em média de 9 mm \pm 5 mm na deformação máxima, cerca de 20 %, quando comparado ao grupo controle (tabela 2, gráficos 2 e 3).

Tabela 2 - Média e desvio padrão das variáveis do ensaio de tração longitudinal das traqueias *in natura* e das traqueias descelularizadas (p<0,05).

Grupos	Força Tênsil. (N)	Deformação Máx. (mm)
Controle	99.21 ± 17.71	11.2 ± 3.10
Grupo A	86.32 ± 11.58	16.25 ± 3.43
Grupo B	$72.83 \hspace{0.1cm} \pm \hspace{0.1cm} 3.18 \hspace{0.1cm}$	17.05 ± 2.68
Grupo C	63.71 ± 10.71	18.83 ± 1.82
Grupo D	77.33 ± 13.05	25.31 ± 9.46
Grupo E	95.13 ± 5.30	18.66 ± 2.04
Grupo F	93.69 ± 26.62	23.17 ± 3.72
Grupo G	80.62 ± 8.93	18.13 ± 2.03
Grupo H	79.29 ± 16.15	20.13 ± 3.01
Grupo I	107.47 ± 18.48	17.1 ± 4.53

Fonte: Elaborada pelo autor



Gráficos 2 e 3 – Teste Longitudinal de Força Tênsil e Deformação Máxima. Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste da força tênsil transversal não apresentou diferença estatística (p<0,05) quando comparado com o controle, exceto o grupo C que apresentou fragilidade do anel traqueal perdendo sua integridade em 50%.

O teste de deformação máxima não apresentou diferença estatística (p<0,05) entre os grupos descelularizados e seus respectivos controles, exceto o grupo C que apresentou queda de aproximadamente 20% da rigidez. Os grupos G e H, apesar de não diferirem de seus respectivos controles, apresentaram valores de deformação inferiores quando comparados aos demais grupos descelularizados (tabela 3, gráficos 4 e 5).

Grupos	Força Tênsil. (N)	Deformação Máx. (mm)	
A controle	26.76 ± 8.24	19.36 ± 1.10	
A Descelularizado	21.4 ± 2.5	17.98 ± 2.12	
B controle	24.085 ± 0.71	23.37 ± 4.26	
B Descelularizado	20.665 ± 5.28	21.95 ± 1.34	
C controle	32.535 ± 7.67	29.56 ± 2.82	
C Descelularizado	17.165 ± 0.78	21.05 ± 3.01	
D controle	20.76 ± 3.75	21.36 ± 3.55	
D Descelularizado	20.84 ± 2.65	18.24 ± 3.87	
E controle	29.87 ± 7.52	24.89 ± 5.5	
E Descelularizado	25.44 ± 2.87	20.30 ± 3.34	
F controle	29.16 ± 3.75	29.01 ± 1.57	
F Descelularizado	30.04 ± 1.76	25.85 ± 7.01	
G controle	22.54 ± 2.49	8.72 ± 0.81	
G Descelularizado	20.06 ± 4.52	7.49 ± 1.83	
H controle	27.39 ± 2.95	8.48 ± 1.69	
H Descelularizado	23.44 ± 2.95	10.32 ± 1.46	
I controle	33.1 ± 5.76	18.52 ± 1.17	
I Descelularizado	29.47 ± 7.14	14.39 ± 3.62	

 Tabela 3 - Média e desvio padrão das variáveis do ensaio de tração lateral das traqueias in natura e das traqueias descelularizadas.

Fonte: Elaborada pelo autor



Gráficos 4 e 5 Teste Transversal de Força Tênsil e deformação Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3 Quantificação de DNA

Os protocolos de descelularização promoveram redução substancial da concentração de DNA. De acordo com o tratamento empregado a redução variou entre 50% a 75% (tabela 4).

Os grupos tratados com fotossensibilizador (PDZ) apresentaram redução de DNA, que variou entre 60% e 76%, inclusive nas traqueias submetidas a um único ciclo, quando comparadas ao demais grupos sem tratamento com PDZ, mais com mesmo número de ciclos. Destaca-se que no grupo I houve queda de 404,89 \pm 47,08 ng/mg para 100,85 \pm 12,83 ng/mg, redução de 75% de DNA, em um único ciclo (24 horas) e no grupo H apresentou queda de 376,64 \pm 59,28 ng/mg para 87,43 \pm 6,11 ng/mg, redução de 76%, em dois ciclos (48 horas).

As traqueias submetidas a dois ciclos obtiveram uma diminuição de $20 \pm 5,8$ ng/mg, cerca de 10% na quantidade de DNA, quando comparados com os grupos de um único ciclo e com mesmo protocolo de descelularização, exceto o grupo I o qual foi protocolo único de um ciclo (Tabela 4 e gráfico 6).

Os tecidos tratados com LED tiveram resultados divergentes em relação aos grupos não tratados com mesmo número de ciclos. O grupo A, não irradiado, não obteve diferença significativa (p<0,05) quando comparado aos grupos C, G e E, todos com 1 ciclo (24 horas) de descelularização, mas apresentou diferença para o grupo I. Não obstante, o grupo B, dois ciclos (48 horas) diferiu estatisticamente (p<0,05) dos grupos D, F e H.

Grupos	Média Geral (ng/mg)	Desvio Padrão	Redução de DNA (%)
A controle	469.27	36.48	
A Descelularizado	222.11	26.382	52,67
B controle	542.54	102.689	
B Descelularizado	200.91	28.46	62,97
C controle	410.19	47.27	
C Descelularizado	183.02	22.05	55,38
D controle	413.08	130.79	
D Descelularizado	140.80	15.85	65,92
E controle	407.49	44.03	
E Descelularizado	159.71	17.17	60,81
F controle	512.97	183.39	
F Descelularizado	150.45	36.19	70,67
G controle	564.03	20.36	
G Descelularizado	216.03	32.03	61,3
H controle	376.64	59.28	
H Descelularizado	87.43	6.11	76,69
I controle	404.89	47.08	
I Descelularizado	100.85	12.83	75,09

Tabela 4 – Quantificação média de DNA (ng/mg) e redução percentual.

Fonte: Elaborada pelo autor.



Gráfico 6 – Concentração média de DNA (ng/mg). Fonte: Elaborado pelo autor.

6.4 Análise Histológica

Os protocolos de descelularização macroscopicamente promoveram mudança na coloração das traqueias tornando-as mais esbranquiçadas, menos rígidas a ação de compressão, figura 20, no entanto a traqueia descelularizada manteve a estrutura anatômica como a in natura mesmo após tratamento de dois ciclos com LED e PDZ.



Figura 20 – Traqueias: A) Traqueia *in natura*; B) Traqueia pós-tratamento (descelularizada). Fonte: Elaborada pelo autor.

Todos os grupos foram analisados histologicamente com as colorações de HE, Tricrômico de Masson e Azul de toluidina.

A coloração com HE mostrou que houve alteração em parte dos componentes histológicos entre o grupo controle e os grupos descelularizados. O grupo controle evidencia a estrutura típica do tecido traqueal. A camada mucosa formada por epitélio ciliado pseudo-estratificado definido e presença de tecido conjuntivo celularizado. A camada submucosa apresentou fibras de músculo liso intacto, com miócitos marcados, entremeados por tecido conjuntivo e glândulas serosas e mucosas com núcleos definidos. A matriz cartilaginosa mostrou aspecto homogêneo evidenciando pericôndrio externamente e presença de fibras de colágeno; os condrócitos apareceram dispostos em lacunas isoladas ou em grupos isógenos (grupos com dois ou mais condrócitos juntos) com poucas lacunas vazias e condroblastos, figura 21.



Grupo D

Grupo E

continua

continuação



 Grupo H
 Grupo I

 Figura 21 - Fotomicrografias de Traquéia suína referentes ao grupo controle e grupos com diferentes tratamentos de descelularização. Coloração com HE (Hematoxilina e Eosina) Bar = 100 mm e Bar = 20 mm (Detalhe). Aspectos morfológicos: (f) Tecido Cartilaginoso. Nota-se o aspecto normal do tecido cartilaginoso em todos os grupos analisados. Presença de grande número de condrócitos no grupo controle e núcleos remanescentes nos grupos descelularizados. (➤) Contpócitos. Nota-se a presença de condrócitos em todos os grupos (⇒) Lacuna vazias. Observa-se aumento de lacunas vazias (sem condrócitos) nos grupos descelularizados. (↑) Pericôndrio. Nota-se aspecto morfológico normal para todos os grupos e diminuição da presença de condroblastos nos grupos descelularizados. (ML) Musculo Liso. Aspecto morfológico normal no grupo controle. Nota-se que para os grupos descelularizados houve desconexão do pericôndrio. (TC) Tecido Conjuntivo. Aspecto integro no grupo controle. Nota-se que nos grupos descelularizados desorganização do tecido. (EP) Epitélio traqueal pseudoestratificado cilíndrico ciliado. Aspecto morfológico normal

para o grupo controle e ausência total para os grupos descelularizados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em todos os protocolos de descelularização traqueal houve a perda do revestimento epitelial pseudo-estratificado ciliado e os mesmos promoveram alteração da morfologia do tecido conjuntivo que foi mais acentuado nos grupos H e I (Figura 21). Entretanto, houve a conservação parcial de material celular na matriz cartilaginosa, principalmente na região

central. Na periferia da matriz cartilaginosa observou-se aumento no número de lacunas vazias, diminuição da presença de condroblastos no pericôndrio e esgarçamento do musculo liso na região de adjacente ao pericôndrio. Na região da mucosa efetuou-se a eliminação total das células glandulares (tanto nas glândulas serosas quanto mucosas), exceto no grupo A, protocolo com 1 ciclo de descelularização com ação exclusiva de SDS e ultrassom, onde foi possível observar somente remoção parcial das células. O gráfico 7 demostra a efetividade da descelularização destas regiões.

Observou-se que os grupos B, C, D, E, F, G, H e I tiveram uma leve marcação na região capsular das glândulas seromucosas (cor magenta). Não obstante, não foi possível verificar a presença de células nestas regiões, imagens em destaque com aumento de 40x marcação HE. As regiões marcadas na coloração HE coincidem com as marcações feitas para os glicosaminoglicanas (sulfatadas), observadas nas imagens com aumento de 40x, figura 21.



Gráfico 7 – Celularidade nas subdivisões das traqueias controle e descelularizadas. Fonte: Elaborada pelo autor.

Houve remoção completa das células das camadas: mucosa, submucosa e adventícia de todas traqueias submetidas a descelularização para todos os grupos do estudo.

6.5 Quantificação de Colágeno

A análise da coloração de Tricrômico de Masson revelou que não houve diferença estatística na concentração de colágeno entre grupo controle e os grupos descelularizados. Os grupos com dois ciclos de descelularização obtiveram menor concentração de colágeno quando comparados aos grupos descelularizados com um ciclo, em média de 5%, gráfico 8. Não houve alteração significativa da distribuição do colágeno na matriz extracelular, figura 22.



Gráfico 8 – Quantificação de Colágeno. Fonte: Elaborada pelo autor.

Tricrômico de Masson



Grupo D

Grupo E

continua

continuação

Tricrômico de Masson



Figura 22 - Fotomicrografias de Traquéia suína referentes ao grupo controle e grupos com diferentes tratamentos de descelularização. Coloração com HE Tricrômico de Masson Bar = 100 mm. Nota-se o aspecto normal da distribuição das fibras de colágeno em todos os grupos. Fonte: Elaborada pelo autor.

6.6 Quantificação Glicosaminoglicanos

A avaliação do GAG é um indicador essencial para manutenção da homeostase da matriz cartilaginosa e suporte de junção para novas células. A coloração de Azul de toluidina revelou que os grupos descelularizados apresentaram menor concentração de GAG quando comparando ao grupo controle. Porém, esta queda não foi significativa, gráfico 9. Não houve alteração da distribuição do Glicosaminoglicanos pela matriz extracelular, figura 20.



Gráfico 9 – Quantificação de Glicosaminoglicanos. Fonte: Elaborada pelo autor.





continua

continuação



Grupo H

Grupo I

Figura 23 - Fotomicrografias da caracterização de GAGS em Traqueias suínas referentes ao grupo controle e grupos com diferentes tratamentos de descelularização. Com Bar = 100 mm e Bar = 20 mm (Detalhe). Nota-se aspectos normais na distribuição dos GAGs pela matriz extra celular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tanto o colágeno como os GAGs não foram alterados durante o processo de descelularização, mesmo quando submetidos a dois ciclos de descelularização, com a manutenção de seus arranjos estruturais nas traqueias após tratamentos.

68

7 DISCUSSÃO

A traquéia continua sendo um dos órgãos mais difíceis de abordar de forma reconstrutiva. Ao longo dos anos inúmeros materiais foram sendo aplicados nos processos de reconstrução traqueal: aço inoxidável. fios de aço, vidro. polietileno, polimetilmetacrilato, silicone, politetrafluoretileno (teflon®), polivinil acetal hidroxinado (Ivalon®), poliuretano, silicone, silicone rígido e flexível associado ao poliéster (Dracon®). Apesar desta diversidade, estes materiais não se integraram aos tecidos circunjacentes tendo vários problemas de migração, deslocamento, erosão, infecção e obstrução, entre outros. A obstrução ocorria principalmente pela incapacidade dos materiais sintéticos interagirem com o muco e secreções. Diante desta situação estática dos materiais usados, iniciou-se a era dos materiais porosos, cerâmicos e malhas, que após implantados apesar de promoverem a vascularização, também mostraram obstrução da luz traqueal, tornando-se inadequados como material para reconstrução traqueal. Iniciou-se então o uso de traqueias de cadáveres como opção para transplantes traqueais. As técnicas de Engenharia Celular e com constructs mistos, totalmente biológicos, como as descelularizadas emergiram dentro deste contexto.¹⁸¹

O presente estudo desenvolveu um equipamento multifuncional capaz de agregar processos físicos e químicos para obtenção de tecidos descelularizados. O equipamento é uma ferramenta relevante para a área de bioengenharia tecidual e medicina regenerativa. Independentemente do modelo proposto neste experimento serem traqueias o equipamento foi elaborado com vistas a descelularização de qualquer tecido minimizando alterações na matriz extracelular pelo tempo de exposição drasticamente menor do órgão a produtos químicos, preservando as propriedades biomecânicas além de ser reprodutível, confiável e rápido. Destaca-se que entre as vantagens do uso do equipamento proposto temos o menor tempomovimento envolvendo o operador de bancada, disponibilizando-o para outras etapas do processo de produção de biomateriais, enquanto o sistema multifuncional executa suas atividades programadas, consequentemente o uso do equipamento torna menos oneroso o processo quando se leva em consideração a homem-hora-trabalho.

A possibilidade de diferentes programações através do controle de tempo, temperatura, agitação ou banhos ultrassônicos possibilita uma infinidade de protocolos com qualidade e reprodutibilidade por se tratar de programas automatizados com mínima interferência humana, minimizando erros ou alterações de condutas. Este equipamento visa a obtenção de arcabouço ideais para medicina regenerativa sem processo de recelularização, os quais já são empregados com sucessos^{45,56,75,182-183} ou para recelularização com células tronco e futuros transplantes.

Com vistas ao transplante traqueal em humano, que ainda é um grande entrave e sem solução definida no campo da medicina, foi delineado como modelo experimental traqueias suínas, pela anatomia similar em tamanho e resistências ao humano, além da possibilidade de adequar o tamanho do arcabouço desejado ao porte do animal doador. Com isto a dificuldade na obtenção de órgãos ou tecidos para crianças e adultos seria minimizado. Neste trabalho utilizamos traqueias oriundas de um frigorífico, pois queríamos minimizar o sacrifício de animais para experimentos científicos seguido o princípio dos 3Rs¹⁸⁴ e promover uma alternativa sustentável em quantidade e número caso o processo seja instituído em larga escala.

O processo de descelularização deve retirar materiais celulares, nucleares e proteínas imunologicamente ativas, minimizando a perda das propriedades biomecânicas, colageno e proteoglicanos da MEC.^{24,39,58,62-66,73}

Neste experimento obtivemos remoção completa das células das camadas: mucosa, submucosa e adventícia de todas traqueias submetidas a descelularização no equipamento proposto com melhores resultados nos grupos H e I. Já o grupo A apesar de apresentar expressiva redução das células não houve remoção total das mesmas. A traquéia pode ser considerada um órgão compartimentalizado contendo áreas que possuem células (tecidos) altamente imunogênicas e que expressam HLA Classe I e II (mucosa e submucosa) que são morfologicamente muito distintas de área com menor potencial imunogênico e de estimulação do sistema imune (cartilagem)². Além disso, na traquéia, a mucosa e a submucosa expressam antígenos de histocompatibilidade de forma expressiva (MHC classe I e II), mas a cartilagem é considerada um tecido imunoprivilegiado por não expressar MHC Classe II, a exemplo do que ocorre com as células tronco mesenquimais.¹⁸⁵⁻¹⁸⁶

Como dito acima, a eliminação das células epiteliais, musculares e das glândulas mistas podem sugerir uma diminuição da antigenicidade traqueal em transplantes heterólogos, alotranplantes ou xenoenxertos. Daar et al., 1984 indicaram que a mucosa era a estrutura responsável pela antigenicidade da traqueia em transplantes. Posteriormente outros autores determinaram que a presença dos antígenos MCH-I e MCH-II, que são difundidas em todas células do epitélio e nas glândulas mistas, de fato são os maiores responsáveis pela rejeição em transplante.^{2,42,63-64,187-191}

Os protocolos utilizados neste experimento se basearam no estudo de Evaristo et al., desenvolvido no mesmo laboratório. Embora exista grande diferença entre traqueias de coelhos empregadas por Evaristo e as de suínos utilizadas nesta pesquisa os resultados foram superiores quanto ao tempo e eficiência na remoção celular sem destruição da MEC. Apesar
da espessura do tecido traqueal de suíno ser fartamente superior ao de coelhos, resultados similares em quantidade de DNA e número de células foram obtidos em apenas 2 ciclos ao em vez 10. Outro ponto é a redução de exposição do tecido a detergentes, minimizando possíveis alterações na MEC.^{42,64}

Verificou-se que após os protocolos de descelularização houve células remanescentes de condrócitos na região da cartilagem, dados que foram confirmados pela quantificação de DNA. Esse resultado corrobora diversos artigos da literatura que salientam a presença de condrócitos em MEC traqueal, mesmo depois de vários ciclos de descelularização, devido à dificuldade de penetração de soluções descelularizantes para remoção destes condrócitos em decorrência da densidade da MEC traqueal.^{5,26,33,39,64-65,192-197}

Segundo Osiecka-Iwan *et. al.*, 2018, em condições fisiológicas os condrócitos são protegidos do contato direto com células imunocompetentes pela exuberante matriz extracelular, tornando este tecido imuinoprivilegiado. Isto justifica porquê fragmentos de cartilagem alogênicos quando transplantados não são rejeitados. Portanto, a permanência de resquícios de cartilagem íntegra após 2 ciclos de descelularização não representam riscos de rejeição imunomediada e testes de transplantes heterotópicois de segmentos descelularizados por 2 ciclos utilizando o equipamento multifuncional e PDZ podem ser a apresentação final do arcabouço para futuros transplantes de traquéia.¹⁹⁸

Apesar de não desejáveis células remanescentes na MEC, sua presença não promove reações adversas ao receptor, sendo toleradas em transplantes.^{41,199} Outro fator importante é que durante a remodelação da MEC, seja *in vitro* ou *in natura* as células remanescentes podem ser comutadas por células do receptor, facilitado a reecelularização.^{39,64-65} No entanto, para alguns autores, como a matriz de cartilagem hialina contém 90% de colágeno do tipo II que em associação a um grande número de pequenas moléculas, como os proteoglicanos, podem induzir uma resposta imune sendo listados como antigênicos na literatura especializada.^{198,200-201}

Aoki et al., observaram a presença de condrócitos necróticos no lúmen da traqueia em decorrência da ação do SDS no processo de descelularização. Partington et al., identificaram apoptose em condrócitos em traqueias descelularizadas somente com PBS após 25 ciclos (500 horas). Nós observamos alteração morfológica dos núcleos dos condrócitos, principalmente os descelularizados com PDZ, assim como redução de grupos isógenos na cartilagem. Contudo, não realizamos avaliação de necrose ou apoptose. Outros trabalhos sugerem que a diminuição de grupos isógenos em processos de descelularização curtos, no máximo 5 ciclos (72 horas), combinando agentes químicos e físicos deve-se a maior eficácia na distribuição e inserção das

soluções descelularizantes em tecidos mais densos.^{1,64,69, 202-205} Esta mescla de ação química e física vem se tornando uma alternativa adequada para obtenção de arcabouços descelularizados utilização do SDS.^{66,75,206}

O presente trabalho utilizou a quantificação de DNA como indicativo para o sucesso do processo de descelularização obtido pelo equipamento multifuncional. A presença de DNA foi confirmada em todos protocolos utilizados, o que era esperado pois notoriamente a histologia já tinha mostrado células remanescentes. Os grupos A e C apresentaram os piores índices de remoção de DNA entre 52% e 55%, respectivamente, sendo o grupo A não irradiado e grupo C irradiado. Em compensação os grupos com protocolos envolvendo PDZ apresentaram queda expressivas entre 60 % e 76%. Apesar de todos os grupos apresentarem concentração residual maior que o critério aceitável para descelularização (50ng/mg)^{66,207} houve um redução superior 76% quando comparado com a traqueia *in natura* em apenas 48 horas, vislumbramos resultados superiores em futuros protocolos com 72 horas de descelularização com possibilidade de atingir o critério desejável. Embora a quantidade de DNA residual seja um critério de aceitação, Keane e colaboradores levantaram uma crítica ao valor referencial, pois eles mostraram que tecidos com quantidade de DNA acima do aceitável apresentaram semelhanças na remodelação e adaptação do tecido transplantado quando comparados aos tecidos com índices aceitáveis de DNA.⁵⁸

Partington et al. detectaram, através de coloração DAPI, fragmentos menores que 300 pb de DNA ligados as fibras da MEC e glândulas da mucosa, mesmo depois de 25 ciclos (500 horas) de descelularização. Esta remoção incompleta se deve a ionização dos fragmentos de DNA que se ligam através de interações eletrostáticas com as fibras da MEC⁵⁸. Estes fragmentos, por serem muito pequenos, não conseguem induzir efeitos inflamatórios e de remodelação tecidual.²⁰⁸ Não obstante, eles podem influenciar o resultado na quantificação de DNA.⁶⁴

No entanto, muitos suportes biológicos comerciais para medicina regenerativa apresentam quantidade variáveis de fragmentos menores que 300 pb de DNA remanescentes após a descelularização^{58,63,208}

Embora a remoção do material imunogênico seja essencial no processo de descelularização, é imprescindível um equilíbrio para garantir a manutenção de componentes importantes da MEC como: colágeno, fibronectina, laminina e glicosaminoglicanos. Esses componentes conferem a traqueia suporte funcional para as células, flexibilidade e resistência a tração, permitindo que as vias aéreas não colabem quando submetidas as variações de pressões intratorácicas.^{63-64,193} A supressão de qualquer um destes componentes pode

prejudicar o equilíbrio bioquímico levando a um arcabouço não viável para a engenharia de biomateriais.²⁰⁹⁻²¹⁰

Observamos que não houve perdas significativas nas concentrações das fibras de colágeno e GAGs, em todos os grupos tratados, o que mostra que o equipamento promoveu uma dispersão mais homogênea e uma eficácia a penetração da solução descelularizante nas células. Outros autores mostraram que a utilização de detergentes-enzimas pode causar alterações variadas nas concentrações das fibras de colágeno e GAGs, pois o rompimento das interações lipídio-proteínas pode alterar as conformações estruturais destes componentes.^{56,67, 74-75,182,211}

O emprego de detergentes iônicos, como SDS, vem sendo amplamente empregados em protocolos de descelularização de traqueias devido aos seus efeitos relativamente suaves nas estruturas da MEC.^{62,182} Entretanto, tratamentos muito longos, acima 5 dias de descelularização, podem levar a uma redução significativa dos componentes da matriz.^{39,51,56, 63-64,67,212-213} Haag e colaboradores, demonstraram que tratamentos com até 9 ciclos (45 horas) de descelularização não afetam propriedades biomecânicas da traqueia murina.³⁹ Apesar dos achados de Haag serem expressivos e possam ser interpretados como valores de referências para determinação da concentração das soluções descelularizantes e número de ciclos, vale ressaltar que não podemos extrapolar um mesmo protocolo para obtermos arcabouços descelularizados entre diferentes modelos de experimentação animal, pois os limiares das propriedades biomecânicas diferem entre espécies.^{27,193}

A preservação destes dos componentes da MEC contribuem para manutenção da integridade biomecânica do arcabouço, o qual foi notada nos testes de tração. A avaliação das propriedades biomecânicas em arcabouços descelularizados é fundamental, pois um dos pilares da bioengenharia de tecidos é prover arcabouços semelhantes estruturalmente ao tecido *in* natura. Com isto, é essencial uma análise detalhada destas propriedades biomecânicas após a descelularização.^{39,64,193}

Haykal e colaboradores propuseram um modelo de teste de tração em traqueias de ratos que pudesse simular os movimentos naturais da respiração.⁵ Hondt e colaboradores desenvolveram um equipamento (MicroCT) capaz de medir expansividade e a colapsibilidade da traqueia de coelhos em tempo real.¹⁹³ Apesar destes testes serem inovadores os mesmos seriam complicados de aplicarem a traqueias inteiras de suínos. Portanto, em nosso trabalho foi utilizado o método tradicional com auxílio da Máquina Universal de Ensaios Mecânicos.

Os Ensaios de Tração longitudinal e transversal demonstraram que não houve perda significativa das propriedades mecânicas quando comparadas com traqueias *in natura*. Porém,

houve perda significativa da rigidez no teste longitudinal em média de 20% para os C, D, E, F, G e H. Os resultados encontrados em nossos ensaios de tração são similares aos encontrados na literatura que utilizam detergentes iônicos, como solução descelularizantes, ação física e tempo de descelularização entre 1 até 7 dias.^{39,42,51, 62-63-64,193} A preservação da força tênsil foi notoriamente comprovada e a perda, para alguns grupos, da rigidez foi observada. Estudos sugerem que alguns tipos de protocolos de descelularização, principalmente os que envolvem enzimas, ou múltiplos tipos de detergentes, podem comporta-se adversamente sobre as propriedades biomecânicas das traqueias.^{39,42,64}

Atualmente a maioria das pesquisas utilizam traqueias inteiras de ratos ou coelhos, desta última também se utiliza somente fragmentos. As pesquisas que usam traqueias oriundas de suínos, frequentemente optam por fragmentos de traqueias de animais maiores, entre 50 a 80 kg, ou traqueias inteiras de animais menores, entre 10 e 30 kg. A utilização de fragmentos menores de traqueias ou animais mais jovens, pode facilitar a penetração e ação das soluções descelularizantes e enzimas promovendo resultados superiores em menor tempo de descelularização (Tabela 5).

Como um dos objetivos almejados neste experimento era à obtenção de arcabouços similares às traqueias humanas, foram selecionados fragmentos 10 a 11 cm de comprimento. A espessura e comprimento do fragmento utilizado pode ter sido determinante na manutenção de condrócitos na MEC. Comparativamente tanto comprimento quanto espessura ou a área das traqueias foram consideravelmente superiores aos modelos rotineiramente empregados neste tipo de pesquisa (Tabela 5).

As perdas das propriedades biomecânicas predispõem ao colapso traqueal *in vivo* quando submetidas a pressão intratoráxica. As análises histológicas conjuntamente com os testes de tração do presente estudo, demonstraram que a perda do colágeno e do GAGs não foram significativas em qualquer grupo descelularizado.

Pesquisas inferem que o potencial fotobiomulador do LED em promover efeitos bioestimulador e bioinibidor estão relacionados com as caracteristicas específicas do tecido irradiado e dos parâmetros físicos como: fluência (dose), potência (quantidade de energia transmitida), densidade de energia (irradiância), tempo de exposição e comprimento de onda (cor).^{86-87,95,214-216}.

TT 1 1 7	D 1 ~	1 / 1 11		1	1 1 1 '	~	1 /	•	1 /
I abala 5 -	RAISCON	do trahalhou	e no nrocacec		daccaliilari	79090	do trac	1110196 /	do cuinoc
1 a n c a	KUIAUAU I	ue irabamos	5 110 01000550	uu u	uescenulari	Lacau	uc trac	iucias (ac sumos.

PESQUISA		Raça / peso	cm	Tratamento	Ciclo/hora	Nº ciclos
Guimaraes A. B. <i>et al.</i> ,	2019	Landrace (18 a 22 kg)	6	SDS 2%	48	10
Giraldo-Gomes D. M. et. al.,	2019	Landrace (25-35 kg)	10	Tripsina-EDTA 1% + guanidina 10% + SD 4% + SDS 1% + TBP 2% + etanol 70%		2 fases
Lange P. et. al.,	2017	Large - White / Landrace	7	Pressão e vácuo negativos + Triton X - 100 a 0,25% + 1 DNAse		1
Giraldo-Gomez D. M. <i>et. al.</i> ,	2016	(40 a 50 kg)	3 a 5	SDS 4%	7	15
,				SDS 4% + EDTA 10 mM	10	15
				SDS 4% + tripsina 1%	10	5
Jonhson C. et. al.,	2016	Porco doméstico	6	TRITON-X 100 a 0,1% + SDS 2% + desoxirribonuclease I	24	5
Haykal S. et. al.,	2013	Yorkshire (40– 50 kg)	2 a 4	Triton X-100 a 3% + ácido peracético a 0,1% + 4% de etanol	98	1
		Ċ,		1% Triton X-100 + benzonase	110-134	1
Partingthon L. <i>et</i> . <i>al.</i> ,	2013	suino (80 a 100kg)	> 10 cm	SDS 4% + DNase-I	20	25
Jungebluth P. <i>et. al.</i> ,	2012	42,4 ± 3,3 kg	6	SDS 4% + DNase-I	56	17

Fonte: Elaborada pelo autor.

Atualmente, sabe-se que a interação da luz com tecidos causam uma modulação das camadas eletronicas dos fotoreceptores moleculares como flavinas, citocromos c, porfirinas e proteinas nitrosadas, promovendo a formação de estados exitados singletes e especies oxidativas (ROS)^{126, 217-222}

O presente trabalho apresentou resultados divergentes dos achados de Evaristo e colaboradores para a ação da luz no processo de descelularização.⁵¹ Quando comparamos o grupo A, 1 ciclo de descelularização, sem ação da luz e sem ação de PDZ, com grupo C, 1 ciclo de descelularização, com ação da luz e sem ação do PDZ, ambos não diferiram entre si. Entretanto, quando comparamos estes grupos com os grupos que usaram o fotossensibilizador PDZ, sendo irradiados ou não, eles diferiram. Os grupos que tiveram ação do PDZ foram superiores na descelularização, isso mostra que o fator desta diferença foi o fotossensibilizador e não a ação da luz. Esta ideia é reforçada pelo grupo I que sem ação da luz e com 20µg/ml de PDZ apresentou redução celular de 75%. Os mesmos achados valem para os grupos com 2 ciclos de descelularização. Os grupos com 2 ciclos de descelularização de DNA quando comparados com os grupos com 1 ciclo de descelularização. Esse resultado corrobora com achados de pesquisas anteriores que observaram maior retiradas de DNA quanto maiores o número de ciclos de descelularização.

Os fotossensibilizadores são moléculas que ao interagir com luz geram reações fotoquímica, fotofísicas e fotobiológicas que formam espécies reativas de oxigênio e radicais livres promovendo um efeito fotodinâmico. Nos dias atuais, o emprego de fotossensibilizadores vem sendo empregados em diversas áreas, mas com grande destaque para o combate de canceres, infecções bacterianas e fúngica.^{129,131-133,137, 223-225}

Não existe até o momento relatos de da aplicação de fotossensibilizadores no processo de descelularização de tecidos ou órgãos o que torna esta abordagem pioneira. Todos os grupos tratados com fotossensibilizador PDZ tiveram desempenho superior quanto a remoção de células da mucosa e da cartilagem. Mantendo a integridade da MEC demonstrada pela quantificação de colágeno e GAGs

Observamos que para os grupos com 1 ciclo de descelularização a associação da luz no comprimento de onda de 450nm conjuntamente com tratamento PDZ não apresentou diferença estatística (p<0,05), quando comparada a descelularização obtida apenas com o tratamento de PDZ, ambos os testes tiveram valores similares quanto a queda do DNA no tecido traqueal, 61,3 e 60,81%. Os resultados foram correspondentes para os protocolos de 2 ciclos de descelularização. Houve redução de DNA de 76,79% para o grupo com a associação

da luz no comprimento de onda de 450nm e com tratamento PDZ. Para o grupo somente tratado com PDZ, a redução foi de 70,67%. Não observamos em nenhum protocolo diferença na concentração de colágeno e GAGs, além dos grupos manterem as propriedades biomecânicas.

As traqueias tratadas com concentração de 20ng/ml de PDZ e com 1 ciclo de descelularização, apresentaram resultados mais expressivos. Houve uma marcante queda de 75,09% na concentração de DNA. Contudo, não houve alterações na estrutura tecidual frente aos testes de tração longitudinal ou transversal, além da manutenção do arranjo e quantidade das fibras de colágeno ou GAGs. O tratamento com PDZ pode ser definido como dose dependente.

Com isto inferimos que o fotossensibilizador possui papel determinante na descelularização celular proposta neste experimento, associado ao detergente iônico e ultrassom. Seu papel isolado na produção de arcabouços necessita de novas investigações.

8 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido equipamento multifuncional que se mostrou eficaz, com ensaios reprodutíveis para a descelularização de traqueias suínas, como modelo para traqueias humanas, sendo que a associação de processos físicos e químicos despontam como melhores opções para a produção de tecidos descelularizados levando em conta: tempo-movimento (horas homem-trabalho), custo e eficácia final do procedimento.

Quanto à análise histológica realizada o equipamento multifuncional levou a uma redução de 76% em 48 horas de tratamento com PDZ. Não houve alterações significativas detectáveis nos ensaios de resistência, resposta à tração longitudinal e transversal.

A quantificação do DNA residual se mostrou eficaz tanto em 24 quanto em 48h. A determinação das glicosaminoglicanas e colágeno não foram alteradas pelos protocolos utilizados.

O PDZ como agente descelularizador, permitiu maior remoção de células do tecido sem comprometer a integridade da MEC, mostrando um caráter dose dependente. Entretanto, o papel da ação dos fotossensibilizadores isoladamente devem ter novas investigações, assim como observar os efeitos descelularizantes para novos tipos e concentrações de fotossensibilizadores.

REFERÊNCIAS

1 CAMPANA, G. A.; OPLUSTIL, C. P. Conceitos de automação na medicina laboratorial: revisão de literatura. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 2, p. 119–127, 2011.

2 SHAARI, C. M. *et al.* Characterizing the antigenic profile of the human trachea: implications for tracheal transplantation. **Head Neck**, v. 20, n. 6, p. 522–527, 1998.

3 GARTNER, L. P. AND HIATT, J. L. Color textbook of histology. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2006.

4 MEYERS, A. D.; BISHOP, H. E.; PETERS, S. Biomechanical characteristics of the human trachea. **Otolaryngology-**-head and neck surgery, v. 88, n. 4, p. 409–411, 1980.

5 HAYKAL, S. *et al.* Evaluation of the structural integrity and extracellular matrix components of tracheal allografts following cyclical decellularization techniques: comparison of three protocols. **Tissue Engineering Part C:** methods, v. 18, n. 8, p. 614–623, 2012.

6 ZAR, J. H. Biostatistical analysis. 5th ed. Illinois: Prentice-Hall, 2009.

7 HAYKAL, S. *et al.* Reconstructive advances in tracheal reconstruction. **Plastic and Reconstructive Surgery -** global open, v. 2, n. 7, p. e178, 2014.

8 XIAN, X.; GOPAL, S.; COUCHMAN, J. R. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n. 1, p. 31–46, 2010.

9 LEITINGER, B.; HOHENESTER, E. Mammalian collagen receptors. **Matrix Biology**, v. 26, n. 3, p. 146–155, 2007.

10 HARBURGER, D. S.; CALDERWOOD, D. A. Integrin signalling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 122, Pt 2, p. 159–163, 2009.

11 SCHULTZ, G. S.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 2, p. 153–162, 2009.

12 SEGUIN, A. *et al.* Tracheal replacement with cryopreserved, decellularized, or glutaraldehyde-treated aortic allografts. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 87, n. 3, p. 861–867, 2009.

13 MARTINOD, E. *et al.* Tracheal regeneration following tracheal replacement with an allogenic aorta. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 79, n. 3, p. 942–948;discussion 949, 2005.

14 THEOCHARIS, A. D. *et al.* Extracellular matrix structure. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 97, p. 4–27, 2016.

15 AUCHINCLOSS, H. G.; WRIGHT, C. D. Complications after tracheal resection and reconstruction: prevention and treatment. **Journal of Thoracic Disease**, v. 8, Suppl. 2, p. S160-S167, 2016.

16 ACOCELLA, F. *et al.* Prefabricated tracheal prosthesis with partial biodegradable materials: a surgical and tissue engineering evaluation in vivo. Journal of Biomaterials Science Polyme Edition, v. 18, n. 5, p. 579–594, 2007.

17 OSADA, H. *et al.* The first step of experimental study on hybrid trachea: use of cultured fibroblasts with artificial matrix. **Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 35, n. 6 Suppl. 1, p. 165–168, 1994.

18 MACCHIARINI, P. *et al.* Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. Lancet, v. 372, n. 9655, p. 2023–2030, 2008.

19 MONTOVANI, J. C.; NAKAJIMA, V. Alterações epiteliais e cartilaginosas em cirurgia traqueal: estudo experimental em cobaias. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69., n.2, p. 159–163, 2003.

20 BERG, M. *et al.* RETRACTED: replacement of a tracheal stenosis with a tissueengineered human trachea using autologous stem cells: a case report. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 1–2, p. 389–397, 2014.

21 GRILLO, H. C.; DIGNAN, E. F. M. Extensive resection and reconstruction of mediastinal trachea without prosthesis or graft: an anatomical study in man. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, v. 48, p. 741–749, 1964.

22 GRILLO, H. C. Tracheal replacement: a critical review. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 73, n. 6, p. 1995–2004, 2002.

23 BEHREND, M.; KLEMPNAUER, J. Tracheal reconstruction under tension: an experimental study in sheep. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 27, n. 6, p. 581–588, 2001.

24 BAIGUERA, S. *et al.* Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. **Biomaterials**, v. 31, n. 34, p. 8931–8938, 2010.

25 HECKER, E.; VOLMERIG, J. Extended tracheal resections. **Thoracic Surgery Clinics**, v. 24, n. 1, p. 85–95, 2014.

26 CONCONI, M. T. *et al.* Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. **Transplant International**, v. 18, n. 6, p. 727–734, 2005.

27 DEN HONDT, M.; VRANCKX, J. J. Reconstruction of defects of the trachea. Journal of Materials Science: materials in medicine, v. 28, n. 2, p. 1–11, 2017.

28 JUNGEBLUTH, P. *et al.* Structural and morphologic evaluation of a novel detergentenzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, v. 138, n. 3, p. 586–593, 2009.

29 KUTTEN, J. C. *et al.* Decellularized tracheal extracellular matrix supports epithelial migration, differentiation, and function. **Tissue Engineering Part A**, v. 21, n. 1–2, p. 75–84, 2015.

30 WURTZ, A. *et al.* Tissue-engineered airway in the clinical setting: A call for information disclosure. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 91, n. 6, p. 973, 27, 2012.

31 BIRCHALL, M.; MACCHIARINI, P. Airway transplantation: a debate worth having? **Transplantation**, v. 85, n. 8, p. 1075–80, 27, 2008.

32 YAMASHITA, M. *et al.* Tracheal regeneration after partial resection: a tissue engineering approach. **Laryngoscope**, v. 117, n. 3, p. 497–502, 2007.

33 MARTINOD, E. *et al.* Airway transplantation: a challenge for regenerative medicine. **European Journal of Medical Research**, v. 18, n. 1, p. 1–5, 2013.

34 BAIGUERA, S. *et al.* Dynamic decellularization and cross-linking of rat tracheal matrix. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6344–6350, 2014.

35 JUNGEBLUTH, P. *et al.* Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study. **Lancet**, v. 378, n. 9808, p. 1997–2004, 2011.

36 JUNGEBLUTH, P.; MACCHIARINI, P. Airway transplantation. Thoracic Surgery Clinics, v. 24, n. 1, p. 97–106, 2014.

37 WU, W. *et al.* Tissue engineering of trachea-like cartilage grafts by using chondrocyte macroaggregate: experimental study in rabbits. **Artificial Organs**, v. 31, n. 11, p. 826–34, 2007.

38 BITTENCOURT, R. A. C. *et al.* Cultura de condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 242–246, 2009.

39 HAAG, J. *et al.* Biomechanical and angiogenic properties of tissue-engineered rat trachea using genipin cross-linked decellularized tissue. **Biomaterials**, v. 33, n. 3, p. 780–789, 2012.

40 DELAERE, P.; VAN RAEMDONCK, D. Tracheal replacement. Journal of Thoracic Disease, v. 8, Suppl. 2, p. S186–S196, 2016.

41 DELAERE, P. R. *et al.* Learning curve in tracheal allotransplantation. American Journal of Transplantation, v. 12, n. 9, p. 2538–2545, 2012.

42 BUTLER, C. R. *et al.* Vacuum-assisted decellularization: an accelerated protocol to generate tissue-engineered human tracheal scaffolds. **Biomaterials**, v. 124, p. 95–105, 2017.

43 SUNG, S. W.; WON, T. Effects of basic fibroblast growth factor on early revascularization and epithelial regeneration in rabbit tracheal orthotopic transplantation. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 19, n. 1, p. 14–18, 2001.

44 WEIDENBECHER, M. *et al.* Fabrication of a neotrachea using engineered cartilage. Laryngoscope, v. 118, n. 4, p. 593–598, 2008.

45 ELLIOTT, M. J. *et al.* Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study. **Lancet**, v. 380, n. 9846, p. 994–1000, 2012.

46 KIM, H. Influence of mesenchymal stem cells on cryopreserved tracheal allografts in rabbits. **Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 46, n. 5, p. 328–339, 2013.

47 GO, T. *et al.* Both epithelial cells and mesenchymal stem cell-derived chondrocytes contribute to the survival of tissue-engineered airway transplants in pigs. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, v. 139, n. 2, p. 437–443, 2010.

48 NEAGU, M. *et al.* Human mesenchymal stem cells as basic tools for tissue engineering: isolation and culture. **Romanian Journal of Biophysics**, v. 15, p. 1–4, 2005.

49 RAGALIE, W. S.; MITCHELL, M. E. Advances in surgical treatment of congenital airway disease. Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery, v. 28, n. 1, p. 62–68, 2016.

50 LOTT, D. G. What is the future of "organ transplantation" in the head and neck? **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**, v. 22, n. 5, p. 429–435, 2014.

51 EVARISTO, T. C. *et al.* Light-emitting diode effects on combined decellularization of tracheae. A novel approach to obtain biological scaffolds. Acta Cirurgica Brasileira, v. 29, n. 8, p. 485–492, 2014

52 CROWLEY, C.; BIRCHALL, M.; SEIFALIAN, A. M. Trachea transplantation: from laboratory to patient. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 4, p. 357–367, 2015.

53 BUCHELER, M.; HAISCH, A. Tissue engineering in otorhinolaryngology. **DNA and Cell Biology**, v. 22, n. 9, p. 549–564, 2003.

54 SIDDIQI, S. Tissue engineering of the trachea: What is the hold-up? **MOJ Cell Science & Report**, v. 4, n. 1, p. 1–5, 2017.

55 GILPIN, S. E. *et al.* Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. Journal of Heart and Lung Transplantation, v. 2017, n. 3, p. 298–308, 2014.

56 BROWN, B. N. *et al.* Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, n. 3, p. 428–437, 2010.

57 CHENG, C. W.; SOLORIO, L. D.; ALSBERG, E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. **Biotechnology** Advances, v. 32, n. 2, p. 462–484, 2014.

58 KEANE, T. J. *et al.* Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1771–1781, 2012.

59 HARRIS, G. M.; RAITMAN, I.; SCHWARZBAUER, J. E. Cell-derived decellularized extracellular matrices. **Methods in Cell Biology**, v. 143, p. 97–114, 2018.

60 MANUSCRIPT, A.; ARTICULAR, E.; CONSTRUCTS, C. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. **Biomaterials**, v. 30, n. 22, p. 3749–3756, 2010.

61 YANG, Z. *et al.* Research on preparation and characters of decellularized cartilage matrix for tissue engineering. **Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery**, v. 22, n. 10, p. 1232–1237, 2008.

62 ZANG, M. *et al.* Decellularized tracheal matrix scaffold for tracheal tissue engineering. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 132, p. 549e-559e, 2013.

63 SUN, F. *et al.* Structural integrity, immunogenicity and biomechanical evaluation of rabbit decelluarized tracheal matrix. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, p. 1509–1519, 2014.

64 PARTINGTON, L. *et al.* Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds. Acta Biomaterialia, v. 9, n. 2, p. 5251–5261, 2013.

65 BADYLAK, S. F. Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host response. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 42, n. 7, p. 1517–1527, 2014.

66 CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, 2011.

67 GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675–3683, 2006.

68 BATIOGLU-KARAALTIN, A. *et al.* Decellularization of trachea with combined techniques for tissue-engineered trachea transplantation. **Clinical and Experimental Otorhinolaryngology**, v. 12, n. 1, p. 86–94, 2019.

69 HUNG, S.-H. *et al.* Larynx decellularization: combining freeze-drying and sonication as an effective method. **Journal of Voice**, v. 27, n. 3, p. 289–294, 2013.

70 BERTANHA, M. *et al.* Ultrastructural analysis and residual DNA evaluation of rabbit vein scaffold. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 706–711, 2017.

71 BRANCO, A. C. D. S. C. *et al.* Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, p. 209–214, 2011.

72 VAVKEN, P.; JOSHI, S.; MURRAY, M. M. TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 12, p. 1612–1618, 2009.

73 GILBERT, T. W. Strategies for tissue and organ decellularization. Journal of Cellular Biochemistry, v. 113, n. 7, p. 2217–2222, 2012.

74 KASIMIR, M. T. *et al.* Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. **International Journal of Artificial Organs**, v. 26, n. 5, p. 421–427, 2003.

75 GILBERT, T. W. Strategies for tissue and organ decellularization. Journal of Cellular Biochemistry, v. 113, n. 7, p. 2217–2222, 2012.

76 MILLER, M. W.; MILLER, D. L.; BRAYMAN, A. A. A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 22, n. 9, p. 1131–1154, 1996.

77 CHAPMAN, I. V; MACNALLY, N. A.; TUCKER, S. Ultrasound-induced changes in rates of influx and efflux of potassium ions in rat thymocytes in vitro. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 6, n. 1, p. 47–58, 1980.

78 SIEGEL, E. *et al.* Cellular attachment as a sensitive indicator of the effects of diagnostic ultrasound exposure on cultured human cells. **Radiology**, v. 133, n. 1, p. 175–179, 1979.

79 CIARAVINO, V.; MILLER, M. W.; KAUFMAN, G. E. The effect of 1 MHz ultrasound on the proliferation of synchronized Chinese hamster V-79 cells. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 7, n. 2, p. 175–184, 1981.

80 BAO, S.; THRALL, B. D.; MILLER, D. L. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 23, n. 6, p. 953–959, 1997.

81 KOCH, S. *et al.* Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 26, n. 5, p. 897–903, 2000.

82 TLAXCA, J. L. *et al.* Analysis of in vitro transfection by sonoporation using cationic and neutral microbubbles. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 36, n. 11, p. 1907–1918, 2010.

83 AZADNIV, M. *et al.* Temporality in ultrasound-induced cell lysis in vitro. **Echocardiography**, v. 13, n. 1, p. 45–56, 1996.

84 HUNG, S. H. et al. Preliminary experiences in trachea scaffold tissue engineering with segmental organ decellularization. **Laryngoscope**, v. 126, n. 11, p. 2520–2527, 2016.

85 JUNG, J. P.; BHUIYAN, D. B.; OGLE, B. M. Solid organ fabrication: comparison of decellularization to 3D bioprinting. **Biomaterials Research**, v. 20, n. 1, p. 27, 2016.

86 KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, v. 56, n. 5, p. 691–704, 1989.

87 RIBEIRO, M. S. *et al.* Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 22, n. 1, p. 59–66, 2004.

88 MARKOLF H. NIEMZ. Laser tissue interactions fundamentals and applications. 3rd ed. Berlin: Springer, 2007.

89 OHARA, M. *et al.* Blue light inhibits the growth of skin tumors in the v-Ha-ras transgenic mouse. **Cancer Science**, v. 94, n. 2, p. 205–209, 2003.

90 DEL OLMO-AGUADO, S.; NÚÑEZ-ÁLVAREZ, C.; OSBORNE, N. N. Blue light action on mitochondria leads to cell death by necroptosis. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 9, p. 2324–2335, 2016.

91 MOORE, P. *et al.* Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 36, n. 1, p. 8–12, 2005.

92 LOCKWOOD, D. B. *et al.* Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 5, p. 1039–1043, 2005.

93 ROTENBERG, S. *et al.* Extracellular environment as one mediator of blue light-induced mitochondrial suppression. **Dental Materials,** v. 22, n. 8, p. 759–764, 2006.

94 AL-WATBAN, F. A. H.; ANDRES, B. L. Laser biomodulation of normal and neoplastic cells. Lasers in Medical Science, v. 27, n. 5, p. 1039–1043, 2012.

95 LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; LAVIE, R. Photobiostimulation as a function of different wavelengths. Laser Therapy, v. 12, n. 1, p. 38–41, 2000.

96 ROEHLECKE, C. *et al.* Stress reaction in outer segments of photoreceptors after blue light irradiation. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. 1–12, 2013.

97 YOSHIDA, A. *et al.* Reactive oxygen species production in mitochondria of human gingival fibroblast induced by blue light irradiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B, v. 129, p. 1–5, 2013.

98 PERUSSI, J. R. Inativação Fotodinâmica de microrganismos. **Quimica Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, 2007.

99 DIEROLF, C. F. A Comparison of solar photocatalytic inactivation of waterborne E . coli using Tris. **Journal of Solar Energy Engineering**, v. 129, n.1, p. 135, 2007.

100 NAVANTOFT, C. *et al.* Field tests of the solar water detoxification SOLWATER reactor in Los Pereyra, Tucumán, Argentina. **Journal of Solar Energy Engineering**, v. 129, n.1, p. 127–134, 2007.

101 LUKSIENE, Z. *et al.* Inactivation of possible fungal food contaminants by photosensitization. **Food Technology and Biotechnology**, v.43, n.4, p.335-341, 2005.

102 LUKSIENE, Z.; PASKEVICIUTE, E. Novel approach to the microbial decontamination of strawberries: Chlorophyllin-based photosensitization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 5, p. 1274–1283, 2011.

103 WAINWRIGHT, M. The emerging chemistry of blood product disinfection. **Chemical Society Reviews**, v. 31, n. 2, p. 128–136, 2002.

104 SMITH, T. G.; KAIN, K. C. Inactivation of plasmodium falciparum by photodynamic excitation of Heme-cycle intermediates derived from d-Aminolevulinic acid. **Journal of the Infectious Diseases**, v. 190, n.1, p. 184–191, 2004.

105 BEN-HUR, E. *et al.* Photochemical decontamination of red blood cell concentrates with the silicon phthalocyanine PC 4 and red light. **Developments in Biologicals**, v. 102, p. 149–155, 2000.

106 HERVIG, T. A.; APELSETH, T.; SONDERGAARD, M. Plasma/platelet pathogen inactivation. **ISBT Science Series**, v. 1, p. 227–229, 2006.

107 LIPSON, R. L.; BALDES, E. J.; GRAY, M. J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. **Cancer**, v. 20, n. 12, p. 2255–2257, 1967.

108 DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897–3915, 2004.

109 SCHUITMAKER, J. J. *et al.* Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. Journal of Photochemistry and Photobiology B, v. 34, n.1, p. 3–12, 1996.

110 BAGNATO, V. S. *et al.* Guia prático de terapia fotodinâmica para o tratamento de tumores. São Carlos: IFSC, 2002.

111 AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA:** a cancer journal for clinicians, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.

112 BALDEA, I.; FILIP, A. G.; NAPOCA, C. Photodynamic therapy in melanoma – an update. **Journal of Physiology and Pharmacology**: an official journal of the polish physiological society, v. 63, n. 2, p. 109–118, 2012.

113 TONG, M. C.; VAN HASSELT, C. A.; WOO, J. K. Preliminary results of photodynamic therapy for recurrent nasopharyngeal carcinoma. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 253, n. 3, p. 189–192, 1996.

114 KICK, G.; MESSER, G.; PLEWIG, G. Historical development of photodynamic therapy. **Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**, v. 47, n. 8, p. 644–649, 1996.

115 BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 24, n. 1, p. 19–33, 1995.

116 TANIELIAN, C. *et al.* Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 1, p. 12–19, 2000.

117 SMITH, G. J. Photo-oxidation of tryptophan sensitized by methylene blue. Journal of the Chemical Society, v. 74, p. 1350–1354, 1978.

118 CELLI, J. P. *et al.* Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2795–2838, 2010.

119 DAI, T. *et al.* Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 120, 2012.

120 TURRO, N. J. Modern molecular photochemistry. Sausalito, California: University Science Books, 1991.

121 TRUCHUELO, M. T. *et al.* Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy for Bowen's disease treatment. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, v. 28, n. 1, p. 86–93, 2014.

122 LI, H. *et al.* Feasibility of interstitial doppler optical coherence tomography for in vivo detection of microvascular changes during photodynamic therapy. Lasers in Surgery and Medicine, v. 38, n.8, p. 754–761, 2006.

123 YAN, X. *et al.* Research progress of magnetic resonance imaging contrast agents. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 757–764, 2011.

124 LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. Berlin: Springer, 2006.

125 CROVETTO, L.; BRASLAVSKY, S. E. Photoinduced electron transfer to triplet flavins. Correlation between the volume change-normalized entropic term and the Marcus reorganization energy. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, n. 23, p. 7307–7315, 2006.

126 CHATTERJEE, S. R. *et al.* Photodynamic effects induced by meso -Tetrakis [4- (carboxymethyleneoxy) phenyl] porphyrin using rat hepatic microsomes as model Membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 339, n. 1, p. 242–249, 1997.

127 JUARRANZ, A. *et al.* Photodynamic therapy of cancer. basic principles and applications. **Clinical & Translational Oncology**, v. 10, n. 3, p. 148–154, 2008.

128 DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380–387, 2003.

129 AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA**: a cancer journal for clinicians, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.

130 PLAETZER, K. *et al.* Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259–268, 2009.

131 YOO, J.-O.; HA, K.-S. New insights into the mechanisms for photodynamic therapyinduced cancer cell death. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 295, p. 139–174, 2012.

132 SINHA, A. K. *et al.* Methotrexate used in combination with aminolaevulinic acid for photodynamic killing of prostate cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 4, p. 485–495, 2006.

133 HENDERSON, W.; DOUGHERTY, J. How does photodynamic therapy work? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145–157, 1992.

134 ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. Journal of Photochemistry and Photobiology B, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2009.

135 ANAND, S. *et al.* Low-dose methotrexate enhances aminolevulinate-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells in vitro and in vivo. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 10, p. 3333–3343, 2009.

136 FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochemistry** and **Photobiology**, v. 54, n.5, p. 659, 1991.

137 EHRENBERG, B.; ANDERSON, J. L.; FOOTE, C. S. Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic and biological media. **Photochemistry and Photobiology**, v. 68, n. 2, p. 135–140, 1998.

138 WASSERMAN, H. H.; MURRAY, R. W. Singlet oxygen in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 37, n. 10, p. 1825–1852, 1981.

139 BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet:** oncology, v. 5, n. 8, p. 497–508, 2004.

140 TRIESSCHEIJN, M. *et al.* Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, v. 11, n. 9, p. 1034–1044, 2006.

141 ALLISON, B. A.; PRITCHARD, P. H.; LEVY, J. G. Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. **British Journal of Cancer**, v. 69, n. 5, p. 833–839, 1994.

142 ANAND, S. *et al.* Biomodulatory approaches to photodynamic therapy for solid tumors. **Cancer Letters**, v. 326, n. 1, p. 8–16, 2012.

143 ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016.

144 LOW, K. *et al.* Comparison of intracellular accumulation and cytotoxicity of free mTHPC and mTHPC-loaded PLGA nanoparticles in human colon carcinoma cells. **Nanotechnology**, v. 22, n. 24, p. 245102, 2011.

145 LI, F. *et al.* Hyaluronic acid-conjugated graphene oxide/photosensitizer nanohybrids for cancer targeted photodynamic therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n.12, p.1678-1686, 2013.

146 JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic therapy and the development of metalbased photosensitisers. **Metal-Based Drugs**, v. 2008, p. 276109, 2008.

147 ROEDER, B.; NATHER, D. U. Caracterization of photobiophisical properties of sensitizers used in photodynamic therapy. **Future Trends in Biomedical Applications of Lasers**, v. 1525, 1991. DOI: 10.1117/12.48194.

148 KUDINOVA, N. V; BEREZOV, T. T. Photodynamic therapy: search for ideal photosensitizer. **Biomeditsinskaia Khimiia**, v. 55, n. 5, p. 558–569, 2009.

149 SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today**, v. 4, n. 11, p. 507–517, 1999.

150 MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.

151 SENGE, M. O. mTHPC--a drug on its way from second to third generation photosensitizer? **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 2, p. 170–179, 2012.

152 MIRONOV, A. F.; NIZHNIK, A. N.; NOCKEL, A. Y. Hematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 4, n. 3, p. 297–306, 1990.

153 ALLISON, R. R. Photodynamic therapy: oncologic horizons. **Future Oncology**, v. 10, n. 1, p. 123–124, 2014.

154 DOUGHERTY, T. J. *et al.* Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Research**, v. 38, n. 8, p. 2628–2635, 1978.

155 LUZGINA, V.; FILIPPOVICH, E.; EVSTIGNEEVA, R. Hematoporphyrin IX. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 11, p. 613–620, 1977

156 CARMELLO, J. C. *et al.* In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine ® against Candida albicans. **Photochemistry and Photobiology Science**, v.14, n.7, p. 1319–1328, 2015.

157 CORRÊA, J. C. Fotodegradação do photodithazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados. 2006. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

158 ROMANKO, Y. S. *et al.* Effect of photodynamic therapy with photodithazine on morphofunctional parameters of M-1 sarcoma. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 138, n. 6, p. 584–589, 2004.

159 GREER, A. Christopher Foote's discovery of the role of singlet oxygen [1O2 (1Delta g)] in photosensitized oxidation reactions. Accounts of Chemical Research, v. 39, n. 11, p. 797–804, 2006.

160 HUANG, B.; BATES, M.; ZHUANG, X. Super resolution fluorescence microscopy. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 993–1016, 2009.

161 SENGE, M. O.; BRANDT, J. C. Temoporfin (Foscan(R), 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)--a second-generation photosensitizer. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 6, p. 1240–1296, 2011.

162 CHIN, W. W. L. *et al.* Improved formulation of photosensitizer chlorin e6 polyvinylpyrrolidone for fluorescence diagnostic imaging and photodynamic therapy of human cancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 1083–1093, 2008.

163 PIRES, L. *et al.* Photodithazine photodynamic effect on viability of 9L/lacZ gliosarcoma cell line. **Lasers in Medical Science**, v. 9, n. 9, p. 168–171, 2017.

164 SILVA, J. C. *et al.* Apoptosis-associated genes related to photodynamic therapy in breast carcinomas. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 4, p. 1429–1436, 2014.

165 ZARUBAEV, V. V *et al.* Effect of albumin on the fluorescence quantum yield of porphyrin -based agents for fluorescent diagnostics. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, p. 137–143, 2017.

166 TERRA GARCIA, M. *et al.* Photodynamic therapy mediated by chlorin-type photosensitizers against Streptococcus mutans biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 256–261, 2018.

167 GAVRINA, A. I. *et al.* Photodynamic therapy of mouse tumor model using chlorin e6polyvinyl alcohol complex. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 178, p. 614– 622, 2018.

168 STRAKHOVSKAIA, M. G. *et al.* The photodynamic inactivation of Candida guilliermondii in the presence of photodithazine. **Mikrobiologiia**, v. 71, n. 3, p. 349–353, 2002.

169 STRAKHOVSKAIA, M. G. *et al.* Photoquenching of the bioluminescence of the genetically engineered Escherichia coli TG1 (pXen7) strain in the presence of photodithazine. **Mikrobiologiia**, v. 71, n. 3, p. 345–348, 2002.

170 QUISHIDA, C. C. C. *et al.* Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using Photodithazine((R)) and LED light after one and three successive applications. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 9, p. 2303–2312, 2015

171 ALVES, F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy mediated by Photodithazine (R) in the treatment of denture stomatitis: a case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 168–171, 2018.

172 MANG, T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiagnosis** and **Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 43–48, 2004.

173 CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1–23, 2005

174 KISELEVSKY, M. V *et al.* Optimization of a method for preparation and repopulation of the tracheal matrix for allogenic transplantation. **Bulletin of Experimental Biology & Medicine**, v. 151, n. 1, p. 107–113, 2011.

175 CARDIFF, R. D.; MILLER, C. H.; MUNN, R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2014, n. 6, p. 655–658, 2014.

176 MUNRO, B. H. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology, **Pathology**, v. 3, n. 3, p. 249, 1971.

177 FREJO, L.; GRANDE, D. A. 3D-bioprinted tracheal reconstruction: an overview. **Bioelectronic Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15, 2019.

178 ZANG, M. *et al.* Decellularized tracheal matrix scaffold for tissue engineering. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 130, n. 3, p. 532–540, 2012.

179 BROWN, B. N. *et al.* Aortic root replacement with a novel decellularized cryopreserved aortic homograft: postoperative immunoreactivity and early results. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 70, n. 11, p. 2656–2668, 2005.

180 RUSSELL, W. M.; BURCH, R. The principles of humane experimental technique. London: Johns Hopkins University, 2010.

181 BUJIA, J. *et al.* Tracheal transplantation: demonstration of hla class II subregion gene products on human trachea. Acta Oto-Laryngologica, v. 110, n. 1–2, p. 149–154, 1990.

182 FLINT, P. *et al.* Cummings otolaryngology - head and neck surgery. 6th ed. Berlin: Elsevier, 2014.

183 DAAR, A. S. *et al.* The detailed distribution of MHC class II antigens in normal human organs. **Transplantation**, v. 38, n. 3, p. 293–298, 1984.

184 SACHS, D. H.; BACH, F. H. Immunology of xenograft rejection. **Human Immunology**, v. 28, n. 2, p. 245–251, 1990.

185 LIU, Y. *et al.* Immunosuppressant-free allotransplantation of the trachea: The antigenicity of tracheal grafts can be reduced by removing the epithelium and mixed glands from the graft by detergent treatment. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 120, n. 1, p. 108–114, 2000.

186 BARKER, E. *et al.* The larynx as an immunological organ: immunological architecture in the pig as a large animal model. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 143, n. 1, p. 6–14, 2006.

187 TSIGOU, E. *et al.* Role of new biomarkers: functional and structural damage. **Critical Care Research and Practice**, v. 2013, p. 361078, 2013. DOI: 10.1155/2013/361078.

188 BOGAN, S. L.; TEOH, G. Z.; BIRCHALL, M. A. Tissue engineered airways: a prospects article. Journal of Cellular Biochemistry, v. 117, n. 7, p. 1497–1505, 2016.

189 DEN HONDT, M. *et al.* An optimized non-destructive protocol for testing mechanical properties in decellularized rabbit trachea. **Acta Biomaterialia**, v. 60, p. 291–301, 2017. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.07.035.

190 SATAKE, R. et al. Patch tracheoplasty in body tissue engineering using collagenous connective tissue membranes (biosheets). **Journal of Pediatric Surgery**, v. 51, n. 2, p. 244–248, 2016.

191 TSUKADA, H. *et al.* Two-stage end-to-end reconstruction of long-segment tracheal defects with a bioabsorbable scaffold grafting technique in a canine model. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 93, n. 4, p. 1088–1093, 2012.

192 GIRALDO-GOMEZ, D. M. *et al.* Fast cyclical-decellularized trachea as a natural 3D scaffold for organ engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 105, n. 110142, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.110142.

193 HONG, P. *et al.* Efficient decellularization of rabbit trachea to generate a tissue engineering scaffold biomatrix. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 112, p. 67–74, 2018.

194 OSIECKA-IWAN, A. *et al.* Antigenic and immunogenic properties of chondrocytes. Implications for chondrocyte therapeutic transplantation and pathogenesis of inflammatory and degenerative joint diseases. **Central-European Journal of Immunology**, v. 43, n. 2, p. 209–219, 2018.

195 DELAERE, P. R.; LIU, Z. Y.; HERMANS, R. Laryngotracheal reconstruction with tracheal patch allografts. Laryngoscope, v. 108, n. 2, p. 273–279, 1998.

196 KRCO, C. J. *et al.* Characterization of the antigenic structure of human type II collagen. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 8, p. 2761–2768, 1996.

197 MISJAK, P. *et al.* The role of citrullination of an immunodominant proteoglycan (PG) aggrecan T cell epitope in BALB/c mice with PG-induced arthritis. **Immunology Letters**, v. 152, n. 1, p. 25–31, 2013.

198 PRICE, A. P. *et al.* Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: the matrix reloaded. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 8, p. 2581–2591, 2010.

199 GIRARD, E. D. *et al.* Automated procedure for biomimetic de-cellularized lung scaffold supporting alveolar epithelial transdifferentiation. **Biomaterials**, v. 34, n. 38, p. 10043–10055, 2013.

200 IBSEN, S. *et al.* Removal of ligand-bound liposomes from cell surfaces by microbubbles exposed to ultrasound. **Journal of Biological Physics**, v.43, n.4, p. 493–510, 2017.

201 AOKI, F. G. *et al.* De-epithelialization of porcine tracheal allografts as an approach for tracheal tissue engineering. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 12034, 2019.

202 NONAKA, P. N. *et al.* Mechanical properties of mouse lungs along organ decellularization by sodium dodecyl sulfate. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 200, p. 1–5, 2014.

203 GILBERT, T. W. *et al.* Strategies based on organ decellularization and recellularization. **Transplant International**, v. 113, n. 6, p. 2217–2222, 2019.

204 GILBERT, T. W.; FREUND, J. M.; BADYLAK, S. F. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. **Journal of Surgical Research**, v. 152, n. 1, p. 135–139, 2009.

205 THAMBYAH, A. *et al.* Macro-, micro- and ultrastructural investigation of how degeneration influences the response of cartilage to loading. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, v. 5, n. 1, p. 206–215, 2012.

206 MANKARIOUS, L. A.; ADAMS, A. B.; PIRES, V. L. Patterns of cartilage structural protein loss in human tracheal stenosis. **Laryngoscope**, v. 112, n. 6, p. 1025–1030, 2002.

207 LIU, X. *et al.* Comparison of detergent-based decellularization protocols for the removal of antigenic cellular components in porcine aortic valve. **Xenotransplantation**, v. 25, n. 2, p. e12380, 2018.

208 ELDER, B. D.; ELESWARAPU, S. V; ATHANASIOU, K. A. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. **Biomaterials**, v. 30, n. 22, p. 3749–3756, 2009.

209 LANGE, P. *et al.* Pilot study of a novel vacuum-assisted method for decellularization of tracheae for clinical tissue engineering applications. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 11, n. 3, p. 800–811, 2017.

210 OLSON, J. E.; SCHIMMERLING, W.; TOBIAS, C. A. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. **Brain Research**, v. 204, n. 2, p. 436–440, 1981.

211 LABBE, R. F. *et al.* Laser photobioactivation mechanisms: in vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 201–207, 1990.

212 LUBART, R. *et al.* Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 21, n. 5, p. 493–499, 1997.

213 KUDRYASHEVA, N. S.; KOVEL, E. S. Monitoring of low-intensity exposures via luminescent bioassays of different complexity: cells, enzyme reactions, and fluorescent proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2019. DOI: 10.3390/ijms20184451.

214 MASSEY, V. The chemical and biological versatility of riboflavin. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, n. 4, p. 283–296, 2000.

215 ZOLTOWSKI, B. D.; GARDNER, K. H. Tripping the light fantastic: blue-light photoreceptors as examples of environmentally modulated protein-protein interactions. **Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 4–16, 2011.

216 BOUILLAGUET, S. *et al.* Intracellular reactive oxygen species in monocytes generated by photosensitive chromophores activated with blue light. **Dental Materials**, v. 24, n. 8, p. 1070–1076, 2008.

217 YOSHIDA, A. *et al.* Blue light irradiation-induced oxidative stress in vivo via ROS generation in rat gingival tissue. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 151, p. 48–53, 2015.

218 ANKRI, R. *et al.* Visible light induces nitric oxide (NO) formation in sperm and endothelial cells. Lasers in Surgery and Medicine, v. 42, n. 4, p. 348–352, 2010.

219 RENGIFO-HERRERA, J. A. *et al.* A comparison of solar photocatalytic inactivation of waterborne e. coli using Tris (2,2'-bipyridine)ruthenium(II), Rose Bengal, and TiO2. Journal of Solar Energy Engineering, v. 129, n. 1, p. 135–140, 2005.

220 TRIESSCHEIJN, M. *et al.* Radiation oncology photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, v. 11, n.9, p. 1034–1044, 2006.

221 DOUGHERTY, T. J.; MARCUS, S. L. Photodynamic therapy. European Journal of Cancer, v. 28A, n. 10, p. 1734–1742, 1992



ANEXO