

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

*Implante de Geleia de Wharton e da Membrana Amniótica
descelularizadas como potencial terapêutico em defeitos traqueais de
coelhos*

Doutorando: MSc. Aloysio Enck Neto
Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza
Co-orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Francisco

CURITIBA
2023

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

*Implante de Geleia de Wharton e da Membrana Amniótica
descelularizadas como potencial terapêutico em defeitos traqueais de
coelhos*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor
em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza
Co-Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Francisco

CURITIBA
2023

AGRADECIMENTOS

A todos que tornaram possível esse trabalho.

Meus pais, Irineo Enck e Marilene Rizzi Enck, que sempre incentivaram a cultura e a educação.

Ao amor da minha vida, Dra Katia Martins Foltz que sempre me incentivou na busca do saber e fez com que esse projeto fosse possível.

Aos mestres e professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da saúde da PUC/PR que instigaram a curiosidade de saber mais.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita, professor e orientador desse trabalho, em possibilitar ampliar sua pesquisa com esse trabalho e pelo seu apoio e dedicação incansável com seus alunos.

À Universidade do Contestado (UNC), alunos bolsistas da medicina e veterinária, em especial ao médico veterinário Thiago Fuchs pela ajuda, parceria e determinação na execução prática desse trabalho.

Finalmente, ao amor pela medicina e aos pacientes, fruto de todo empenho e dedicação desse trabalho.

Dedico esse trabalho à Medicina, fonte de inspiração, dedicação e amor diário. E a todos que compõem a trajetória do saber, que requer muita dedicação e amor.

A tese foi elaborada seguindo a normatização estabelecida pela ABNT. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Contestado devidamente autorizada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR em colaboração com o Prof. Dr Julio César Francisco, Prof. Thiago Fuchs e sua equipe do Laboratório do curso de medicina e veterinária da UNC. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente tese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de estenose associadas a intubação orotraqueal. Em A) Estenose derivada de tubo endotraqueal ou de traqueostomia, em B) (B) Estenose do balonete de um tubo de traqueostomia em conjunto com uma estenose ao nível do estoma traqueal e um segmento interveniente da via aérea malácica; (C) Estenose laringotraqueal induzida por um tubo de traqueostomia colocado demasiado alto na traqueia. Uma cânula de cricotireoidostomia ou uma intubação endotraqueal superficial com um balão demasiado insuflado pode criar uma lesão semelhante.	20
Figura 2. Tratamento convencional. Anastomose término-terminal	21
Figura 3. Modelo Experimental proposto para análise do implante de Geleia de Wharton e Membrana Amniótica em lesões traqueais.	36
Figura 4. Procedimento cirúrgico realizado nos grupos Controle (A), Geleia de Wharton.n (B) e Membrana Amniótica (C).	39
Figura 5. Expressão do marcador α -SMA no grupo controle, MA e GW. Em (A) visualiza-se a expressão do marcador no tecido traqueal (Ampliação 20x). Em (B), os resultados são apresentados com média e desvios padrão O teste ANOVA foi seguido pelo teste de Kruskal-Wallis.	43
Figura 6. Expressão do marcador TGF- β no grupo controle, MA e GW. Em (A) visualiza-se a expressão do marcador no tecido traqueal (Ampliação 20x). Em (B), os resultados são apresentados com média e desvios padrão. O teste ANOVA foi seguido pelo teste de Kruskal-Wallis.	44
Figura 7. A imunoexpressão de Aggrecan foi analisada em três grupos: controle, MA e GW. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. Teste ANOVA seguido do teste de Kruskal-Wallis.	45
Figura 8. Análise dos colágenos tipo I e III nos três grupos analisados (controle, MA e GW). Teste ANOVA seguido do teste de Kruskal-Wallis.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados dos anticorpos utilizados.....	41
Tabela 2. Caracterização da população de coelhos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comitê de Ética de Experimentação Animal
CIO₂	Dióxido de cloro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
IM	Intramuscular
MA	Membrana amniótica
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
GMA	Grupo Membrana Amniótica
GTC	Grupo Controle
GGW	Grupo Geleia de Wharton
GW	Geleia de Wharton
IV	Intravenosa
PBS	solução tampão salina com fosfato
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
PVPI	Iodopolividona
SC	Subcutâneo
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SD	Desoxicolato de sódio
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
UNC	Universidade do Contestado

RESUMO

Introdução: Defeitos traqueais, especialmente os de grande extensão, representam um desafio significativo na cirurgia reconstrutiva devido à alta taxa de complicações relacionadas à formação de estenoses e infecções. A falta de biomateriais com propriedades mecânicas adequadas e biocompatibilidade limita as opções terapêuticas. Neste contexto, a engenharia de tecidos tem explorado o potencial de biomateriais de origem fetal, como a Geleia de Wharton (GW) e a Membrana Amniótica (MA), para promover a regeneração tecidual e a reconstrução traqueal.

Objetivo: Analisar a capacidade de regeneração tecidual da traqueia após o implante de estruturas descelularizadas, a GW e da MA, em coelhos submetidos à traqueostomia convencional.

Metodologia: Foi realizado um estudo experimental *in vivo* utilizando 30 coelhos, divididos em três grupos (n=10; Controle, MA, GW). Cada grupo passou por uma traqueostomia, seguida da implantação do biomaterial. As análises foram realizadas após 60 dias do pós-operatório, através de medidas da área da traqueia, e por diferentes marcadores, através da técnica de imuno-histoquímica, que buscaram analisar a regeneração tecidual, como α -SMA, TGF- β 1, colágeno tipo I e III e aggrecan.

Resultados: A análise histopatológica não evidenciou resposta significativa em torno dos implantes de MA e GW, sugerindo que os biomateriais, embora bem tolerados, não promoveram aceleração do processo de reparo traqueal no período avaliado. Essa análise foi comprovada pelos marcadores de regeneração tecidual (α -SMA, TGF- β 1, colágeno tipo I e III, aggrecan) que não demonstraram diferenças significativas entre os grupos comparados.

Conclusão: As estruturas MA e GW demonstraram ser biomateriais promissores para a engenharia de tecidos traqueais, proporcionando um microambiente favorável à regeneração celular. No entanto, os resultados sugerem a necessidade de outras pesquisas avaliando a combinação desses biomateriais com outras moléculas, como fatores de crescimento específicos para células traqueais para otimizar a reparação e acelerar a regeneração tecidual.

Palavras-chave: Biomateriais, descelularização, arcabouço, regeneração, estenose traqueal

ABSTRACT

Introduction: Tracheal defects, especially those of large extent, pose a significant challenge in reconstructive surgery due to the high rate of complications related to stenosis formation and infection. The lack of biomaterials with adequate mechanical properties and biocompatibility limits therapeutic options. In this context, tissue engineering has explored the potential of fetal-derived biomaterials, such as Wharton's Jelly (WJ) and Amniotic Membrane (AM), to promote tissue regeneration and tracheal reconstruction.

Objective: To analyze the capacity of tracheal tissue regeneration after the implantation of decellularized structures, WJ and AM, in rabbits undergoing conventional tracheostomy.

Methodology: An in vivo experimental study was conducted using 30 rabbits, divided into three groups (n=10; Control, AM, WJ). Each group underwent a tracheostomy, followed by implantation of the biomaterial. Analyses were performed 60 days post-surgery through measurements of the tracheal area and by different markers, using immunohistochemistry, to analyze tissue regeneration, such as α -SMA, TGF- β 1, collagen type I and III, and aggrecan.

Results: Histopathological analysis did not reveal a significant response around AM and WJ implants, suggesting that the biomaterials, although well-tolerated, did not promote accelerated tracheal repair in the evaluated period. Tissue regeneration markers (α -SMA, TGF- β 1, collagen type I and III, aggrecan) did not show significant differences between groups.

Conclusion: AM and WJ structures have shown to be promising biomaterials for tracheal tissue engineering, providing a favorable microenvironment for cell regeneration. However, the results suggest the need for further research evaluating the combination of these biomaterials with other molecules, such as growth factors specific to tracheal cells, to optimize repair and accelerate tissue regeneration.

Keywords: Biomaterials, decellularization, scaffold, regeneration, tracheal stenosis

RESUMO POPULAR

Algumas lesões e doenças podem fazer com que a função da traqueia seja comprometida. Entre as principais delas, estão a intubação e a traqueostomia, que são procedimentos capazes de salvar a vida do paciente, mas ao mesmo tempo podem ocasionar efeitos colaterais, como danos à via respiratória. Um dos maiores efeitos colaterais visto em adultos é a estenose traqueal, que é o estreitamento da via aérea respiratória devido à formação de tecido fibroso. Na busca por proporcionar mais qualidade de vida aos pacientes que passaram por esse tipo de procedimento, é necessário encontrar uma estrutura que auxilie na regeneração desse tecido sem desencadear outros efeitos indesejados, como a rejeição. Nesse contexto, esse projeto se propõe a investigar a utilização de duas estruturas, uma derivada do cordão umbilical, a Geleia de Wharton e outra a Membrana Amniótica. Ambas têm como vantagem a fácil obtenção e o comum descarte após o parto. Durante o projeto foi analisado se essas estruturas seriam capazes de fornecer um ambiente propício à proliferação das células do tecido e consequentemente o fechamento da lesão, sem uma reação exagerada de cicatrização em coelhos submetidos à traqueostomia. Através dos resultados obtidos após 60 dias do implante foi possível visualizar que essas estruturas quando descelularizadas servem como um arcabouço para auxiliar na regeneração do tecido da traqueia de coelhos. Sendo assim, ambas as estruturas demonstraram ser boas escolhas para aplicação na regeneração de tecido traqueal, não sendo capazes de alterar o perímetro traqueal e permitindo a formação de moléculas necessárias para a cicatrização.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
Traqueia	17
Defeitos traqueais e tratamentos	18
Biomateriais	22
Descelularização	24
Aplicabilidade de biomateriais para reconstrução da traqueia	26
Membrana amniótica.....	28
Geleia de Wharton	30
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVOS	34
Objetivo geral	34
Objetivos específicos	34
5. METODOLOGIA.....	35
Desenho Experimental	35
Preparação da Membrana Amniótica e da Geleia De Wharton.....	36
Descelularização da Membrana Amniótica e da Geleia de Wharton	38
Procedimento Cirúrgico.....	38
Eutanásia	40
Histopatologia	40
Análise Imuno-Histoquímica.....	41
Análise Estatística	41
6. RESULTADOS	43
7. DISCUSSÃO	47
8. CONCLUSÃO	50
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	51

10.	REFERÊNCIAS	54
11.	ANEXOS.....	68
	Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	68
	Artigo publicado na revista Life	70
12.	APÊNDICE.....	81
	Aprovação na Comissão de Ética no Uso e Experimentação de animais (CEUA) da Universidade do Contestado	81

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enxertos traqueais para substituir os diferentes tipos de lesões tem ocupado um grande espaço na vida de clínicos e engenheiros há mais de 100 anos (GREANEY; NIKLASON, 2021). Esse desafio está diretamente relacionado as dificuldades inerentes a intervenções cirúrgicas na via aérea.

A traqueia é uma estrutura oca, e a classificação das lesões ou defeitos que ocorrem nessa estrutura pode ser realizada de acordo com a sua origem, ou seja, defeitos congênitos (traqueomalácia, atresias congênitas), ou decorrentes de afecções externas (intubações orotraqueais, neoplasias, hamartomas, amiloidose, traumatismo, infecção e estenose congênita ou adquirida) (BITAR; AL BARAZI; BARAKEH, 2017; DHASMANA; SINGH; RAWAL, 2020).

Dentre essas lesões, a intubação prolongada é a principal causa de estenose laringotraqueal, sendo seguida pelas neoplasias (KANDAKURE; MISHRA; LAHANE, 2015; PALACIOS et al., 2022). Embora a sua incidência tenha diminuído devido a melhorias nos procedimentos a taxa relacionada com a intubação prolongada pode variar entre 0,6% e 21% (ULUSAN et al., 2018). A sua causa pode ser relacionada à pressão do balonete na parede da via aérea que, ao ultrapassar a pressão de perfusão capilar, induz à isquemia, inflamação, tecido de granulação e pericondrite na fase aguda e, em casos graves, fibrose e destruição completa da cartilagem traqueal, provocando a traqueomalacia (DONATELLI et al., 2015; ULUSAN et al., 2018).

O tratamento das lesões envolve uma variedade de reparos cirúrgicos, tanto com materiais orgânicos como artificiais (GREANEY; NIKLASON, 2021). A decisão de realizar o tratamento cirúrgico para estenoses é geralmente baseada em critérios como extensão (acima de 1 cm) e ausência de inflamação aguda. De maneira que, a cirurgia vise minimizar as complicações relacionadas à cicatrização excessiva (WISNEWSKI et al., 2018). Sendo assim, o tratamento de referência é a ressecção da traqueia e a anastomose primária término-terminal com reconstrução, apesar de existirem diferentes intervenções conservadoras e paliativas, (GRILLO et al., 1995; PLOJOUX et al., 2015; YOON et al., 2016a).

Entre os reparos comumente realizados está a utilização de diferentes enxertos para recuperar a estrutura perdida devido a lesão, que pode variar desde enxertos obtidos do tecido do próprio paciente, estruturas a partir de polímeros,

silicone e após o avanço de técnicas imunossupressivas a utilização de estruturas obtidas através de alotransplantes (ADAMO et al., 2022).

A partir da evolução dos enxertos foi possível acompanhar o avanço das técnicas de fabricação de materiais, procedimentos cirúrgicos, compreensão da mecânica e fisiologia traqueais levando, de forma geral, ao aumento da sobrevivência dos pacientes. Espera-se que o material utilizado para a reconstrução da traqueia seja capaz de permitir a migração, proliferação e diferenciação celular, mantendo a integridade do órgão com o mínimo ou nenhuma reação ou alteração fisiológica (LEI et al., 2021a). Entretanto, ainda existe um longo processo para encontrar um substituto traqueal ideal que funcione de forma confiável a longo prazo (GREANEY; NIKLASON, 2021).

Na constante busca pelo substituto ideal, a utilização de estruturas que apresentem uma boa biocompatibilidade, tolerabilidade, sem efeito tóxico local ou sistêmico e com capacidade de gerar fatores de crescimento e citocinas favoráveis a regeneração de órgãos e tecidos, tem sido um importante alvo de estudo (MARINO et al., 2019). Entre as diversas opções existentes atualmente destacam-se as de origem embrionária, como a Membrana Amniótica (MA) e de origem extraembrionária a Geleia de Wharton (GW).

A MA é uma das membranas fetais, que juntamente com a placenta é descartada após o parto (FÉNELON et al., 2021a). Ela é considerada um tecido biocompatível, com propriedades mecânicas que fazem dela um potencial arcabouço, uma vez que devido a sua estabilidade, flexibilidade e permeabilidade é capaz de suportar a migração celular, adesão e desenvolvimento do tecido (LEAL-MARIN et al., 2021a).

Além das características mencionadas como diferencial esta estrutura apresenta capacidade antibacteriana, anti-inflamatória, antifibrótica, próangiogênica, anti-angiogênica e de estímulo à epitelização, diminuindo o tempo de cicatrização e a dor (DADKHAH TEHRANI et al., 2021a; LEAL-MARIN et al., 2021a). A MA já vem sendo investigada e utilizada como reparador tecidual nas lesões de traqueia com alguns resultados positivos na identificação de regeneração de cartilagem no local do trauma (JORGE et al., 2018).

A GW é uma substância gelatinosa formada por tecido conjuntivo, células mesenquimais e abundante em substâncias como o ácido hialurônico e alguns glicosaminoglicanos sulfatados imobilizados em uma rede insolúvel de fibras de

colágeno (ARUTYUNYAN; FATKHUDINOV; SUKHIKH, 2018). A sua utilização como um arcabouço é devido a suas características positivas como sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e a possibilidade de promover adesão e proliferação celular (MALLIS et al., 2020).

Nesse contexto, ambas as estruturas destacadas apresentam potencial terapêutico para serem utilizadas em defeitos traqueais. Visto que possibilitam a descoberta do uso de novos materiais, que possam servir de substrato para a regeneração tecidual de lesões traqueais, no intuito de diminuir os efeitos cicatriciais indesejáveis (WANG; YUAN; XIE, 2018).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Traqueia

A traqueia é um tubo vertical cilíndrico composto por uma camada muscular, anéis cartilagosos e revestida por um epitélio pseudo-estratificado colunar ciliado. Nessa estrutura são contabilizados aproximadamente vinte anéis incompletos de cartilagem hialina, em formato de C, revestidos de tecido fibroso e músculo liso (DHASMANA; SINGH; RAWAL, 2020). As duas extremidades livres posteriores estão ligadas por fibras musculares traqueal e fibras de tecido conjuntivo elástico contendo colágeno (ligamentos anulares) (MARIANCE; YOAN LEVIA MAGDI, 2023). A sua principal função é conduzir o ar entre a laringe e a árvore brônquica (MCCULLAGH; SHAH; HUANG, 2022).

A traqueia de um adulto tem aproximadamente 11 cm de comprimento, com uma variação de 10 a 13 cm. O diâmetro médio antero-posterior é de 13 mm, enquanto o diâmetro transversal é em média de 18 mm (MARIANCE; YOAN LEVIA MAGDI, 2023). Normalmente, estende-se desde o nível da 6ª vértebra cervical, logo abaixo da cartilagem cricoide, até ao nível da 4ª vértebra torácica, bifurcando-se nos brônquios formando um septo interno, a carina. O segmento extratorácico ou cervical da traqueia é uma porção relativamente curta da traqueia, medindo aproximadamente 2 a 4 cm (MARIANCE; YOAN LEVIA MAGDI, 2023; MCCULLAGH; SHAH; HUANG, 2022). A compreensão das dimensões da via aérea é fundamental para a realização de cirurgias respiratórias (MCCULLAGH; SHAH; HUANG, 2022).

A elasticidade da traqueia é visualizada principalmente devido a sua parte muscular, onde no interior da mucosa, existem alças interrompidas de fibras musculares lisas. Dessa forma, durante a expiração, estas fibras musculares contraem-se para ajudar a expulsar o ar da traqueia e voltam a relaxar durante a inspiração (BORDONI; SIMONELLI; MORABITO, 2019; MARIANCE; YOAN LEVIA MAGDI, 2023).

Quando analisada histologicamente observam-se quatro camadas, mucosa, submucosa, cartilagem e adventícia (BORDONI; SIMONELLI; MORABITO, 2019). No revestimento mucoso encontram-se o epitélio e a lâmina própria, com células colunares ciliadas, células caliciformes secretoras de muco e células basais. Os

cílios, em conjunto com as células caliciformes atuam diretamente na proteção da superfície interna do trato respiratório (TURCATEL et al., 2017). As células caliciformes são as responsáveis pela secreção de muco que mantém a camada epitelial úmida e retém materiais patogênicos que são inalados pelo ar (BRAND-SABERI; SCHÄFER, 2014).

A lâmina própria separa a mucosa da submucosa, uma camada de tecido conjuntivo frouxo que fica do lado de fora da camada muscular rica em vasos sanguíneos, nervos, gânglios linfáticos e glândulas secretoras de muco. A camada de cartilagem é formada por cartilagem hialina e coberta pelo pericôndrio e a camada adventícia é uma camada de tecido conjuntivo frouxo que contém vasos sanguíneos, nervos e células de gordura (MARIANCE; YOAN LEVIA MAGDI, 2023). A camada muscular atrás da traqueia e cartilagem, diferente de outras células do músculo liso, não tem células intersticiais (GAO et al., 2017) .

Defeitos traqueais e tratamentos

Os defeitos das vias aéreas traqueais podem ser congênitos ou resultar de queimaduras, traumatismos, e lesões iatrogênicas por intubação ou invasão tumoral (GENDEN; LAITMAN, 2023). Sendo assim, o método de escolha para tratamento do dano depende da extensão e comprometimento do local (JEONG et al., 2020).

Entre os tipos de tratamentos, para assegurar a viabilidade da via aérea em adultos submetidos a cirurgia ou que se encontram em estado crítico, é a intubação traqueal (HANSEL et al., 2022). Embora seja um procedimento com capacidade de salvar vidas apresenta diversos riscos inerentes, como a indução de danos e inflamação da mucosa, formação de tecido de granulação, destruição da cartilagem, traqueomalacia e estenose traqueal (FARZANEGAN et al., 2017).

Além da intubação traqueal, a traqueostomia também é considerada um dos procedimentos mais frequentemente realizados em doentes em estado crítico, que visa melhorar a vida dos doentes dependentes de ventilação ou que perderam a via aérea nativa. Contudo, como qualquer procedimento invasivo existem diversas complicações potenciais que podem ocorrer, no momento perioperatório, pós-operatório, processuais, aquelas que ocorrem ou são identificadas após a

decanulação, bem como aquelas que são temporalmente consideradas precoces ou tardias (CIPRIANO et al., 2015).

Os principais danos que podem ser vistos na traqueia são a estenose traqueal e a traqueomalacia, ou seja, estreitamento da traqueia e danos no tecido cartilaginoso das paredes (TURAKHIA; LITTLE; HENRY, 2019). Entre as crianças, a traqueomalacia é a anomalia traqueal congênita mais comum, com uma incidência registrada de 1 em 2.100 crianças (KAMRAN; JENNINGS, 2019). Já a estenose laringotraqueal é a complicação mais comum à longo prazo após uma lesão aguda das vias aéreas, e após a decanulação (HILLEL et al., 2019).

A estenose é resultante de mecanismos de cicatrização de feridas excessivamente exacerbados, levando à formação de cicatrizes hipertróficas e ao estreitamento das vias aéreas. O desenvolvimento de uma cicatriz madura e a estenose sintomática é paralelo a cicatrização de feridas (CARPENTER et al., 2022). O local mais comum de estenose é no espaço subglótico, descrito como a região mais estreita da via aérea normal do adulto (POTTER et al., 2020). Em média, a estenose é vista em 30% dos pacientes que realizaram o procedimento da traqueostomia, variando de acordo com fatores com comorbidades, tipo de indicação e/ou duração da traqueostomia (POTTER et al., 2020). Quando ocorre, após a intubação endotraqueal ou traqueostomia, a estenose é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade (HUANG et al., 2020).

A estenose pode ser progressiva, que ocorre por ulceração e isquemia da cartilagem traqueal, seguida de cicatrização por fibrose, que se manifesta com vários graus de cicatrização circunferencial (HOSNA et al., 2023). A lesão isquêmica pode correr devido a danos na mucosa traqueal, que ocorrem se a pressão da braçadeira for superior a 30 mmHg (BEYOGLU et al., 2022). A predisposição para o desenvolvimento da estenose pode ser associada a duração da canulação, idade, obesidade ou sepse causada por uma infecção local da ferida (GHIANI et al., 2022).

Durante a pandemia de COVID-19 a quantidade de pacientes que necessitaram de ventilação mecânica através de tubos endotraqueais foi em torno de 5 a 12% (PIAZZA et al., 2021). Não se tem ainda números exatos da prevalência dessa complicação pós infecção severa de COVID-19, contudo estima-se que foi maior do que outras doenças críticas (MIWA et al., 2021; PERRONI et al., 2024). O aumento do número de casos pode ser relacionado à diminuição da visualização

ao usar equipamentos de proteção individual, hiperinsuflação do balonete e intubação prolongada (ALLGOOD et al., 2024). Outros aspectos podem contribuir para o risco de estenose, como o posicionamento prona, a pressão do balonete do tubo endotraqueal/tubo de traqueostomia e tamanhos maiores do tubo endotraqueal (HILLEL et al., 2019).

A estenose pode ser clinicamente dividida em simples e complexa, sendo a primeira uma estenose circunferencial em forma de anel, com menos de 1 cm de comprimento, e não envolve a cartilagem, e a segunda, maior que 1 cm de altura e acompanhada de envolvimento da cartilagem, que pode se apresentar na forma de fibrose ou malácia (Figura 1) (SAHIN et al., 2022).

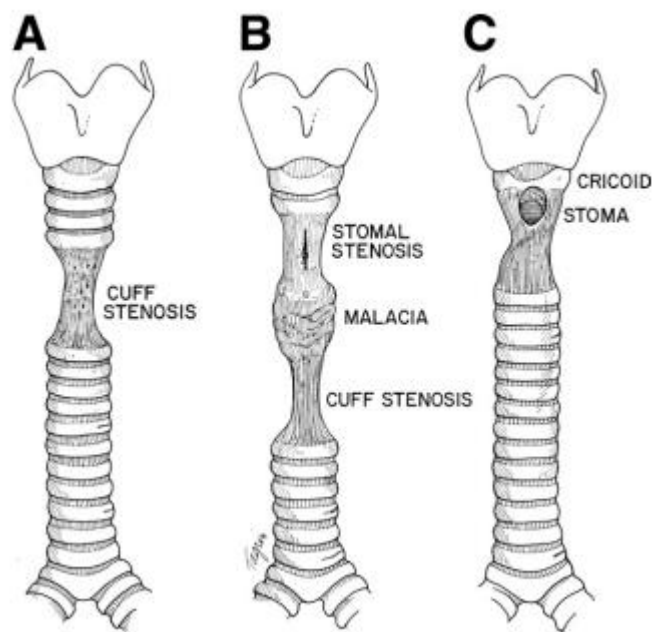


Figura 1. Tipos de estenose associadas a intubação orotraqueal. Em A) Estenose derivada de tubo endotraqueal ou de traqueostomia, em B) (B) Estenose do balonete de um tubo de traqueostomia em conjunto com uma estenose ao nível do estoma traqueal e um segmento interveniente da via aérea malácica; (C) Estenose laringotraqueal induzida por um tubo de traqueostomia colocado demasiado alto na traqueia. Uma cânula de cricotireoidostomia ou uma intubação endotraqueal superficial com um balão demasiado insuflado pode criar uma lesão semelhante.

Fonte: WAIN, 2009

Entre as opções de tratamento para a estenose estão procedimentos endoscópicos e cirurgia aberta com ressecção do segmento traqueal afetado e anastomose término-terminal (Figura 2) (GELBARD et al., 2020). A ressecção cirúrgica proporciona um tratamento definitivo na maioria dos doentes com

estenose idiopática ou pós-intubação/traqueostomia (SOUMAGNE et al., 2022). No entanto, embora a cirurgia aberta seja uma opção terapêutica eficaz, com uma taxa de recorrência inferior a 10%, está associada a uma morbidade de 10%-30%, incluindo principalmente disfagia, disfonia e deiscência da anastomose (RAVIKUMAR et al., 2023; SOUMAGNE et al., 2022).

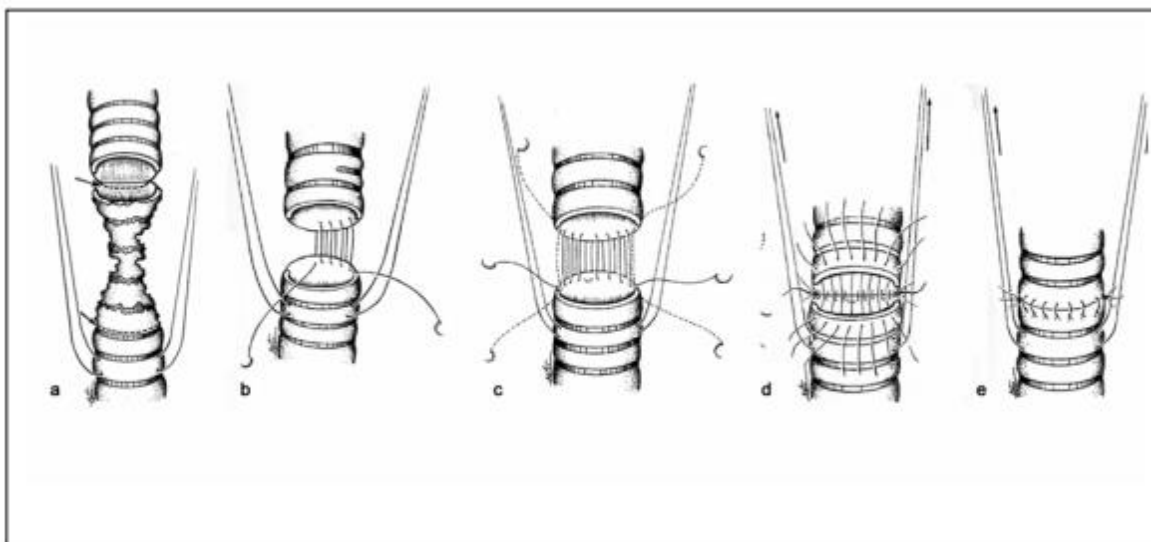


Figura 2. Tratamento convencional. Anastomose término-terminal
Fonte: FORTE, 2013

O tratamento cirúrgico só poderá ser a abordagem de escolha médica se estiver enquadrado dentro de alguns aspectos, como o comprimento vertical da estenose traqueal ou condições clínicas desfavoráveis associadas a múltiplas comorbidades (RAVIKUMAR et al., 2023). Para as estenoses, o tratamento padrão-ouro é a anastomose término-terminal primária, principalmente se a extensão for entre 1-4 cm de comprimento (YOON et al., 2016b). De forma geral, quando realizado o procedimento cirúrgico, a traqueia pode ser reduzida pela metade do tamanho em adultos e até um terço em crianças (AUCHINCLOSS; WRIGHT, 2016). Sendo assim, a ressecção cirúrgica é considerada um tratamento definitivo, já quando a extensão é igual ou superior a 6 cm tem sido um dilema reconstrutivo, estando associados a morbidade e mortalidade significativas (GENDEN; LAITMAN, 2023; RAVIKUMAR et al., 2023).

Os defeitos traqueias extensos, diferente dos outros, requerem a adição de uma técnica de reconstrução visando reorganizar, reestruturar e substituir esse tecido, de forma que seja uma estrutura rígida capaz de suportar as pressões

inspiratórias, uma estrutura que se integre biologicamente (ETIENNE et al., 2018; GENDEN; LAITMAN, 2023).

Dessa maneira, o desafio está na busca de um material que seja capaz de não gerar sérias complicações como infecção, extrusão, obstrução, estenose e rejeição crônica, mas sim gerar um ambiente que permita a regeneração desse tecido.

Biomateriais

O campo dos biomateriais é complexo e pode envolver as mais diversas áreas, como medicina, engenharia, biologia, química, entre outras. Nessa associação cada vez mais é possível observar a evolução dos biomateriais, de produtos naturais brutos a substâncias complexas transformadas artificialmente (MARIN; BOSCHETTO; PEZZOTTI, 2020).

Ao longo dos séculos, observa-se que foram desenvolvidas diferentes abordagens técnicas em diferentes áreas geográficas, dependendo dos recursos naturais e do nível de conhecimento da população, de forma que está sendo vista uma evolução substancial nos últimos anos, impulsionada pelos avanços na ciência e engenharia dos materiais (IQBAL et al., 2023; MARIN; BOSCHETTO; PEZZOTTI, 2020). Essa evolução foi vista principalmente no desempenho pretendido dos biomateriais que passaram de um papel passivo, em que um biomaterial é meramente aceito pelo corpo, para um papel ativo, em que um biomaterial dá instruções ao seu ambiente biológico (IQBAL et al., 2023).

A definição de biomateriais evoluiu junto com a própria expansão de sua utilização, de forma que uma das definições mais completas é a apresentada pelo Instituto Nacional de Saúde Americano, classificando os biomateriais como: *“Qualquer substância ou combinação de substâncias, com exceção dos medicamentos, sintéticos ou naturais de origem sintética ou natural, que pode ser utilizada durante qualquer período que aumente ou substitua parcial ou totalmente substituir parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, com o objetivo de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo”* (RAHMATI et al., 2018).

Durante o desenvolvimento dos diferentes biomateriais foram observadas diferentes gerações, a primeira conceitualizada nas décadas de 50 e 60 que investigou principalmente biomateriais que apresentavam uma natureza bioinerte, ou seja, provocavam uma resposta mínima nos tecidos hospedeiros. De forma que a intenção era obter uma combinação adequada de propriedades funcionais que correspondessem ao tecido substituídos sem provocar respostas negativas no hospedeiro. Já a segunda geração buscou biomateriais que fossem capazes de induzir efeitos terapêuticos específicos, provocando reações controladas, descrevendo os biomateriais como bioativos, ou seja, biomateriais que interagem com o hospedeiro de modo a obter resultados desejados (SPATARU et al., 2024).

Em conjunto com a definição do termo biomaterial, outros termos passaram a ser extremamente relevantes para o estudo desse campo, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e a bioatividade (IQBAL et al., 2023; RAHMATI et al., 2018). A biocompatibilidade pode ser descrita como a capacidade do material de desencadear uma resposta adequada quando em contato com o meio fisiológico, não estimulando um efeito negativo. A biodegradabilidade é a capacidade do material escolhido de ser degradado ou solubilizado ao longo do tempo desaparecendo do local de implantação. Já a bioatividade é a capacidade do material de induzir uma resposta do tecido quando implantado (MARIN; BOSCHETTO; PEZZOTTI, 2020).

A classificação de um biomaterial pode ser feita através da análise de sua origem, que pode ser de natural ou sintética; a sua capacidade de desencadear uma resposta biológica (bioinerte, bioativo, biotoleráveis, entre outros) e composição química (metálicos, cerâmicas, polímeros ou compósitos). Além disso, os biomateriais podem ser combinados visando melhorias de suas propriedades mecânicas e físico-químicas (MARIN; BOSCHETTO; PEZZOTTI, 2020).

Através do avanço e inovações dos biomateriais foi possível o desenvolvimento de tratamentos em diferentes campos, como médicos e biológicos, principalmente na engenharia de tecidos (ZHU et al., 2022).

O campo da engenharia de tecidos é capaz de fornecer um modelo de estrutura que se assemelhe a um tecido ou sistema de tecidos, permitindo que a combinação desse “*scaffold*” ou arcabouço permita a combinação de diferentes células, meios apropriados e fatores de crescimento levando a proliferação e produção da membrana extracelular (BOYS et al., 2020).

A associação dos biomateriais, a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa é visualizada pela combinação de diferentes abordagens incluindo o estudo de diferentes células, materiais de suporte funcionais, nanotecnologia e o mais recente conhecido como impressão 3D (RAMOS; MORONI, 2020).

Diferentes características precisam ser selecionadas, como a biocompatibilidade, biodegradabilidade e as propriedades mecânicas para serem consistentes com a regeneração tecidual do local de implante (JADALANNAGARI et al., 2017). Como por exemplo, a integração de técnicas de fabricação, como a impressão 3D e a nanotecnologia, pode permitir a fabricação de biomateriais com propriedades físicas, químicas e mecânicas controladas com precisão para otimizar a interação entre o biomaterial e o sistema imunitário do hospedeiro (ELALOUF, 2021; SEOK, 2021).

Entre as aplicações dos biomateriais no campo da medicina regenerativa incluem implantes, sistemas de administração de medicamentos, curativos para feridas, instrumentos de diagnóstico, dispositivos cirúrgicos e materiais bioabsorvíveis (KIM et al., 2023). Alguns produtos já são comercializados e utilizados, como o *Cartice1* (terapia baseada no uso de condrócitos autólogos para reparar defeitos na cartilagem, *Dermapure* (arcabouço descelularizado para feridas) (DEWAN et al., 2014; KIMMEL; GITTLEMAN, 2017).

No entanto, para o desenvolvimento de novos biomateriais alguns fatores devem ser extensivamente estudados para que não ocorra o comprometimento da funcionalidade e o desempenho a longo prazo. Dessa forma, alguns fatores precisam ser bem analisados como a capacidade do biomaterial de desencadear inflamação, disfunção da matriz extracelular, deficiência de angiogênese, estresse mecânico e fibrose que podem levar a rejeição (KIM et al., 2023).

Descelularização

Apesar da ampla utilização de diversos tipos de biomateriais, alguns desafios ainda estão presentes, como a imunogenicidade e a biocompatibilidade. Esses aspectos são visualizados principalmente através da inflamação mediada pelos biomateriais, que dificulta a aplicabilidade clínica, impedindo que ocorra a reparação e a regeneração do tecido de forma bem-sucedida (BATOOL et al.,

2021). Entre os métodos para solucionar esses problemas encontra-se o método de descelularização (ZHU et al., 2022).

Esse processo consiste na remoção da maioria das células vivas do biomaterial impedindo a sua imunogenicidade ao mesmo tempo que preserva suas estrutura e composições que permitem o favorecimento da biocompatibilidade através do crescimento celular e a subsequente construção do tecido funcional (RANA et al., 2017; ZHU et al., 2022). Como diferencial, esse método é capaz de preservar entidades estruturalmente organizadas, como o colágeno, a elastina, os glicosaminoglicanos e a fibronectina, para funcionar como um suporte biomimético (RANA et al., 2017).

Este procedimento geralmente utiliza métodos químicos, físicos e biológicos, preservando ainda sim as estruturas biológicas. A conservação da estrutura física é o que permite a recelularização de forma eficiente e a reconstrução de tecidos e órgãos, ou seja, um arcabouço descelularizado mantém a arquitetura a nível micro e nanoestrutural (RANA et al., 2017; ZHU et al., 2022).

Quando analisadas as diferentes técnicas que podem ser utilizadas no processo de descelularização, percebe-se que entre elas existe diferença entre combinações de reagentes e as vias utilizadas para administrar o reagente. De uma forma geral, a classificação dos métodos pode ser feita em três diferentes grupos: os que envolvem métodos químicos, como alcalinos/ácidos, detergentes e álcoois; métodos físicos, como eletroporação, pressurização, congelamento/descongelamento; métodos biológicos, como enzimas (GILPIN; YANG, 2017; ZHANG et al., 2022).

Após a descelularização, o arcabouço deve ser esterilizado e vários testes avaliam a eficácia do procedimento, entre eles avaliações macroscópicas e microscópicas, coloração para avaliação dos componentes remanescentes e análises mecânicas (NEISHABOURI et al., 2022). Algumas características podem interferir na qualidade do processo como a densidade celular, a espessura da matriz e a morfologia do tecido; visto que todos esses aspectos variam de acordo com o tecido. De maneira que é necessário analisar cada tecido em específico para determinar qual o método mais adequado (HEATH, 2019; NEISHABOURI et al., 2022).

Entre as vantagens de se optar por esta técnica é que o arcabouço é constituído por um material biocompatível, resistente mecanicamente para a

aplicação especificada além de poder conter fatores de crescimento ligados a matriz extracelular que podem influenciar o comportamento das células após o implante (BOYS et al., 2020; ZHOU et al., 2020).

Aplicabilidade de biomateriais para reconstrução da traqueia

A funcionalidade do corpo humano é dependente de tecidos e estruturas tubulares. Esses órgãos e sistemas de tecidos ocos desempenham várias funções, e comumente desempenham um desafio para a engenharia de tecidos, dada a maneira que são estruturadas de forma lamelar, com camadas sequenciais de tecido que rodeiam uma abertura interna. O dificuldade está em criar um sistema tubular que mantenha o lúmen intacto que possa suportar a formação de um epitélio e de outros componentes (BOYS et al., 2020).

Um requisito importante para a engenharia de tecidos traqueais é um suporte mecânico suficiente para resistir à pressurização, ter flexibilidade longitudinal para preservar as funções fisiológicas e ter revestimento ou possibilitar que haja um revestimento por epitélio vascularizado o que preveniria infecções e permitiria adequada cicatrização (BOYS et al., 2020; NETO et al., 2018).

Sendo assim, o biomaterial de escolha precisa ser biocompatível, não tóxicos, não imunogênicos e não cancerígenos, ao mesmo tempo, que não migre ou produza erosão. Alguns estudos testaram diferentes materiais ao longo dos anos para essa substituição, como Wurtz (2012) que realizou um estudo experimental usando aortas alogênicas associadas a silicone e concluiu que o enxerto não foi rígido o suficiente (WURTZ et al., 2012).

Em outro estudo que avaliou copolímeros de ácido polilático e poliglicólico, bem como copolímeros compostos de ácido polilático e policaprolactona, inicialmente celularizados com células estaminais mesenquimais não levou à formação completa da matriz extracelular, que é essencial para o suporte mecânico e metabólico do tecido traqueal (MÄKITIE et al., 2013).

Já Ott e colaboradores (2016) analisaram vários arcabouços de policaprolactona biodegradável e poli (ácido lático-coglicólico) eletrofiados e encontraram que esses biomateriais também não apresentaram uma recuperação

completa das propriedades mecânicas fisiológicas necessárias da traqueia (OTT et al., 2016).

Um estudo apresentado por Ghorbani e colaboradores (2017) utilizou um arcabouço *electrospun* injetado de células em torno de uma aorta descelularizada equipada com um *stent* polimérico fundido como suporte mecânico para aplicação de engenharia de tecidos traqueais e concluiu que essa estrutura era viável devido à angiogênese criada pelo músculo (GHORBANI et al., 2017).

Já um estudo pré-clínico em um modelo canino avaliou um implante, primeiramente envolvido em omento e implantado na cavidade abdominal durante 3 semanas, que foi implantado na sequência de uma ressecção traqueal de 20 mm. O exame histológico demonstrou uma epiteliação estável numa monocamada não estratificada, sem glândulas secretoras presentes e sem regeneração muscular, embora não tenha sido observada estenose, além de uma taxa de sobrevivência de 80% registrada ao longo de 18 meses de avaliação (SAKAGUCHI et al., 2018).

Em uma revisão, Damiano e colaboradores (2021) apresentam diversos estudos que foram realizados com diferentes biomateriais demonstrando a dificuldade da obtenção de um biomaterial específico para a reconstrução da traqueia (DAMIANO et al., 2021).

Até o momento percebe-se que ainda há uma necessidade de superação de limitações relacionadas com as propriedades mecânicas, a epiteliação e a vascularização para encontrar um biomaterial ideal para a substituição do tecido traqueal, que poderá revolucionar como a estenose e a lesão traqueal são tratadas clinicamente. Sendo assim, percebe-se que ainda existe a necessidade de encontrar uma estrutura que apresente as características necessárias.

Dito isso, ao longo da última década percebe-se um interesse crescente na utilização de biomateriais de origem natural para aplicação da medicina regenerativa, como a membrana amniótica e a geleia de Wharton (SEZGIN; ATIK, 2018). Principalmente devido a características inerentes a essas estruturas como a presença de células estaminais, fatores de crescimento, citocinas, ácido hialurônico, entre outros (GUPTA et al., 2020).

Membrana amniótica

A MA é uma estrutura biológica translúcida, com espessura de aproximadamente 0,02 a 0,5 mm. Essa estrutura faz parte da camada interna da membrana fetal, sem nervos, músculos ou vasos linfáticos. Em alguns sentidos é considerada similar a placenta, ao cordão umbilical e o líquido amniótico, por ser facilmente acessível e uma fonte valiosa de células estaminais e progenitoras (ABBASI-KANGEVARI et al., 2019).

A sua constituição é dada por células epiteliais amnióticas, células estaminais mesenquimais amnióticas e fibroblastos. As células estaminais são as responsáveis por garantir a MA características como anti-inflamatórias, anti-fibrose, anti-cicatrices, baixa imunogenicidade, promoção da angiogênese e inibição do estresse oxidativo (FÉNELON et al., 2021b).

Além disso, a MA podem ser divididas em três camadas, a monocamada epitelial, a membrana basal, e a matriz estromal hipocelular dividida em compacta, fibroblástica e esponjosa (FRIEL et al., 2017). A primeira camada é constituída por uma única camada homogênea de células epiteliais cúbicas; estas células podem também sintetizar e segregar matriz extracelular. A segunda camada possui grandes quantidades de proteoglicanos com sulfato de heparina; colágeno dos tipos I, III, IV, V e VII; laminina; e fibronectina (LEAL-MARIN et al., 2021b). A terceira camada tem uma rede de fibras compactas feitas de colágeno tipo I e III e pequenas quantidades de feixes paralelos de colágeno dos tipos II, IV e V (NEJAD et al., 2021).

A MA humana é considerada um resíduo cirúrgico sem questões éticas, que pode ser obtido após uma cirurgia cesariana eletiva. Sendo assim considerado um biomaterial altamente abundante, econômico e facilmente disponível (FÉNELON et al., 2021b). A sua utilização é descrita por mais de um século na medicina, principalmente no campo da oftalmologia (DAVIS, 1909).

Este tecido tem como características proeminentes para ser considerado um biomaterial, como a biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, com um efeito anti-inflamatório, antifibrótico, antimicrobiano e antimutagênico. Além de ser uma fonte de fatores de crescimento, citocinas (SILINI et al., 2020).

Outras características favoráveis são as propriedades mecânicas adequadas (permeabilidade, estabilidade, elasticidade, flexibilidade, reabsorção) e boa adesão celular devido a seus componentes estruturais naturais da membrana extracelular, como o ácido hialurônico, colágenos, laminina, fibronectina e proteoglicanos (DADKHAH TEHRANI et al., 2021b; LEAL-MARIN et al., 2021b).

Esta importante fonte de material de suporte tem sido amplamente estudada e utilizada em várias áreas de reparação de tecidos como reparação da córnea, tratamento de feridas crônicas, reconstrução genital, reparação de tendões, reconstrução microvascular, entre outros (NEJAD et al., 2021). Essa estrutura já foi estudada para reparar defeito osteocondral em coelhos, demonstrando que a MA pode atuar como uma matriz de transporte de células para a regeneração da cartilagem (CHENG et al., 2007).

Abazari e colaboradores (2019) avaliaram o uso da MA descelularizada para a diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas em células do fígado e constataram que esse arcabouço tem capacidade de melhorar a diferenciação hepática, exibindo altos níveis de marcadores e funções metabólicas estáveis (ABAZARI et al., 2020).

Simeoni e colaboradores (2021) utilizaram a MA descelularizada para a recuperação da traqueia em coelhos submetidos a traqueostomia. Eles encontraram que esse biomaterial foi biocompatível e permitiu a diferenciação de células tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical se diferenciarem em condrócitos. Além de demonstrar que a partir desta estrutura semeada com células houve a promoção do colágeno imaturo, reconhecido pelo potencial de regeneração de tecido (BAGGIO SIMEONI et al., 2021).

Luo e colaboradores (2021) investigaram o uso da MA descelularizada no reparo de cicatrização de feridas em lesões graves da córnea, e demonstraram que esse arcabouço demonstrou uma maior eficiência na cicatrização, caracterizando um tempo de cicatrização mais curto para o epitélio e uma recuperação mais rápida da opacidade e espessura do estroma, em comparação com os olhos do controle (LUO et al., 2021).

Sendo assim, observa-se que diferentes estratégias podem ser utilizadas para a regeneração da traqueia, como a inseminação de células num suporte implantado, ou implantação de um suporte sem células para apoiar a regeneração de tecidos *in situ*, com o objetivo de permitir o crescimento do novo tecido e

apresentar propriedades biológicas compatíveis ao local implantado (DAMIANO et al., 2021).

Geleia de Wharton

Na última década houve um aumento no interesse da utilização de produtos biológicos para aplicações de medicina regenerativa, entre eles a geleia de Wharton tem se destacado (LAMPLOT; RODEO; BROPHY, 2020).

O cordão umbilical forma-se entre a quarta e a sexta semanas, quando o ducto vitelino e o pedúnculo de ligação se envolvem na camada de âmnio (PECHRIGGL et al., 2022). Após esse processo forma-se duas artérias e uma veia envoltas por um tecido conectivo chamado de geleia de Wharton (GW), que proporciona proteção, amortecimento e apoio estrutural aos vasos umbilicais, impedindo a sua compressão, torção e flexão (GUPTA et al., 2020).

A GW é um tecido conjuntivo mucoso presente no cordão umbilical entre o epitélio amniótico e os vasos umbilicais. Esse tecido, em conjunto com outros do cordão umbilical mantém o fluxo sanguíneo durante movimentos fetais, durante o trabalho de parto e durante anomalias do cordão. Para desempenhar esta função, esta matriz tem várias características biomecânicas únicas relacionadas com a sua estrutura bioquímica (CONVERSE et al., 2018).

Entre essas características, a firmeza do cordão é relacionada a natureza fibrosa da matriz gelatinosa consequência da presença das às fibras de colágeno e elastina. Além desse aspecto, outro que pode ser observado é que a matriz apresenta poros em sua formação, essas estruturas canaliculares são responsáveis por alojar os proteoglicanos e o ácido hialurônico, que ao interagirem com a água formam um fluido altamente viscoso que flui quando comprimido (CONVERSE et al., 2018). Essa substância gelatinosa contém quantidades elevadas de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, ácido hialurônico e proteoglicanos sulfatados ((STEFÁŇSKA et al., 2020).

Dessa forma, constata-se que a GW apresenta diversas características desejadas para ser considerada um biomaterial, ou seja, um arcabouço celular. Isso porque é capaz de acolher e suportar células, apresenta componentes da matriz extracelular e mantém suas características mecânicas (DUBUS et al., 2022).

Alguns estudos demonstraram que o GW descelularizada pode ser capaz de fornecer uma estrutura biocompatível com características adequadas. Entre eles podem ser citados:

Foltz e colaboradores (2022) que avaliaram a utilização da GW descelularizada na recuperação do tecido cartilaginoso em defeitos traqueais em coelhos, e constataram que o arcabouço não desencadeou rejeição no hospedeiro, contudo sozinha a GW também não foi capaz de induzir benefícios histopatológicos para a regeneração do tecido da traqueia (FOLTZ et al., 2022).

Penalozzi e colaboradores (2021) avaliaram a utilização da GW descelularizada como um arcabouço para terapias regenerativas do disco intervertebral, demonstrando que a presença da matriz manteve a viabilidade das células e afetou positivamente a expressão de reguladores críticos da homeostase, como os fatores de transcrição SOX2, SOX9 e TRPS1 (PENOLAZZI et al., 2020).

Gupta e colaboradores (2021) através de uma revisão avaliaram a utilização de enxertos vasculares de tecidos poliméricos isentos de células com a matriz da GW descelularizada para o desenvolvimento e implantação de enxertos de interposição na veia jugular de coelhos. Após a análise concluíram que os enxertos que estavam associados a GW apresentaram um número maior de células recrutadas, quando comparado ao grupo controle (GUPTA et al., 2021).

Li e colaboradores (2021) analisaram o desempenho da GW descelularizada associada a células-tronco do cordão umbilical humano no reparo de defeitos da cartilagem articular no joelho de ratos. Como resultados encontraram que a utilização da GW descelularizada apresentou melhor reparo dos defeitos, sugerindo que ela mimetizou estruturalmente ao tecido cartilaginoso normal (LI et al., 2021).

Kehtari e colaboradores (2019) avaliaram a diferenciação de células-tronco pluripotente induzidas na GW descelularizada como alternativa à matriz hepática nativa. Neste estudo foi possível observar que a expressão de genes associados ao fígado, como albumina, TAT, Cytokeratin19 e Cyp7A1, secreção de albumina e ureia foi significativamente maior do que aqueles cultivados nas placas de cultura (2D) (KEHTARI et al., 2019).

Beiki e colaboradores (2017) avaliaram a GW descelularizada na regeneração de feridas em camundongos, demonstrando houve o fechamento completo da ferida e desaparecimento da crosta, além de reepitelização completa, camadas epidérmicas recém-geradas e apêndices após 12 dias de implantação.

Desta forma, sugerindo que a GW descelularizada é capaz de melhorar a fixação, penetração e crescimento das células fibroblásticas e acelerar os processos de cicatrização, o que ofereceria um enxerto de pele adequado para a cicatrização de feridas (BEIKI; ZEYNALI; SEYEDJAFARI, 2017) .

Entre as vantagens da utilização da GW está a sua obtenção, visto que é um tecido que é geralmente descartado após o nascimento do bebê, apresentando uma ampla oportunidade para a coleta.

3. JUSTIFICATIVA

A utilização da engenharia de tecidos para o desenvolvimento de novas estruturas para a manutenção da estrutura natural da traqueia tem sido extremamente promissora. Nessa área, a tecnologia de descelularização tem recebido um destaque especial, uma vez que a partir da utilização dessa tecnologia é possível manter a estrutura natural da traqueia.

Nos últimos anos foi observado o aumento das internações em unidades de cuidados intensivos, principalmente durante a vigência atual da pandemia de Covid-19, e verificou-se intubações orotraqueais mais prolongadas além do aumento no diagnóstico de estenoses traqueais.

Diante desses fatos, a busca por materiais que possam servir como um arcabouço para a regeneração tecidual é extensa. Um arcabouço ideal é aquele que permite a integração com o tecido, ser facilmente colonizado, ser capaz de aderir, proliferar, diferencial e replicar o tecido no qual é implantado. Além de ser de fácil manuseio e obtenção.

Por essas e outras razões, como a biocompatibilidade e as propriedades mecânicas favoráveis a Geleia de Wharton e a Membrana amniótica se tornam candidatos favoráveis para serem utilizadas como estruturas descelularizadas buscando a regeneração da estrutura da traqueia. Visto que, além do fornecimento de um suporte estrutural ambas apresentam componentes de modulação no processo de reparo de defeitos teciduais e, assim capazes de evitar a evolução para a estenose.

Baseado no fato de que a cirurgia de reconstrução da traqueia apresenta várias complicações relacionadas a dificuldades de autorregeneração tecidual e a dificuldade de resultados promissores, esse estudo propõe a análise da capacidade de regeneração tecidual da traqueia após o implante de Geleia de Wharton e da Membrana Amniótica descelularizadas em coelhos submetidos à traqueostomia convencional.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar a capacidade de regeneração tecidual da traqueia após o implante de Geleia de Wharton e da Membrana Amniótica descelularizadas em coelhos submetidos à traqueostomia convencional.

Objetivos específicos

- I. Identificar a presença de novos tecidos cartilagosos e vasos sanguíneos no local previamente submetido ao implante da Membrana Amniótica e da Geleia de Wharton sessenta dias após a realização da traqueostomia convencional.
- II. Comparar o perímetro e a área das traqueias no local da traqueostomia do grupo submetido ao implante da Membrana Amniótica X Grupo da Geleia de Wharton X Grupo Controle, após sessenta dias do procedimento.
- III. Analisar a capacidade dos implantes de Membrana Amniótica e da Geleia de Wharton em permitir a regeneração inicial do tecido
- IV. Analisar a biocompatibilidade dos implantes de Membrana Amniótica e da Geleia de Wharton como arcabouços para a recuperação da traqueostomia.

5. METODOLOGIA

Foram utilizados 30 coelhos, da raça Nova Zelândia, com peso médio de 3,00 – 3,500 kg procedentes do Biotério de criação e de manipulação de animais de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os coelhos foram mantidos no biotério da Universidade do Contestado (UNC) sob a responsabilidade do médico veterinário Tiago Fuchs (CRMV 5549).

O acondicionamento dos animais foi em gaiolas com estrado de 80cm³ com lotação de apenas um animal por gaiola, climatizados com temperatura regulável de forma contínua e exaustão de ar, sob ciclos claro/escuro (12/12h). Alimentados com ração Funny Bunny Blend para coelhos com ingesta aproximada de 40g/dia por animal e água *ad libitum*.

Os experimentos foram realizados seguindo as normas e princípios éticos do COBEA, com aprovação pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEUA) da Universidade do Contestado- UnC sob o número 18/20 (Apêndice I), seguindo os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009.

Desenho Experimental

Os animais (n=30) foram divididos em três grupos para análise (Figura 3):

- Grupo Controle (GCT) (n=10): submetidos à traqueostomia isolada.
- Grupo Membrana Amniótica (GMA) (n=10): submetidos à traqueostomia e posteriormente ao implante de MA no local da traqueostomia
- Grupo Geleia de Wharton (GGW) (n=10): submetidos à traqueostomia e posteriormente ao implante de GW no local da traqueostomia.

Esses grupos foram analisados segundo o modelo experimental delineado na **figura 3**.

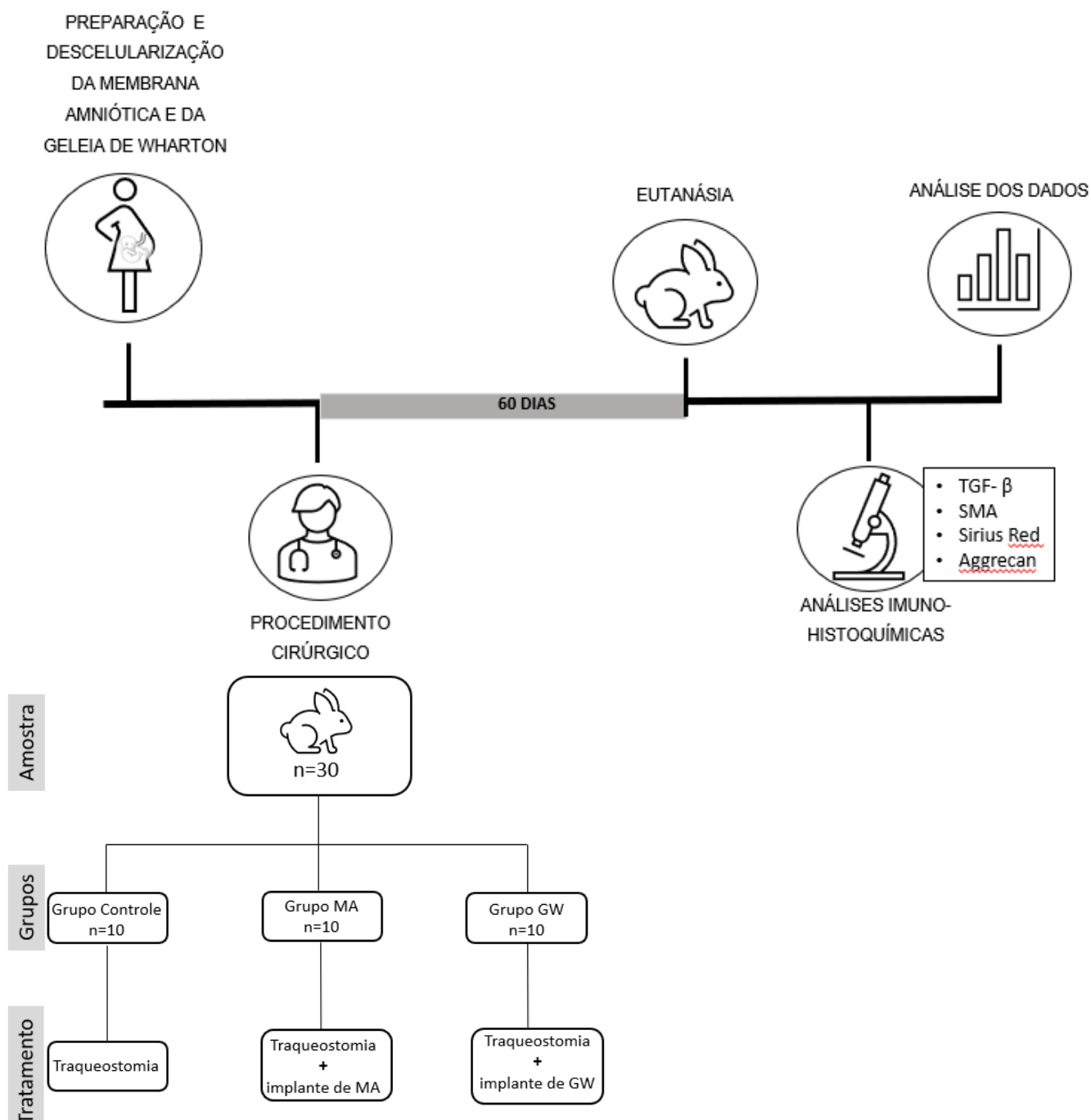


Figura 3. Modelo Experimental proposto para análise do implante de Geleia de Wharton e Membrana Amniótica em lesões traqueais.

MA= Membrana Amniótica; GW = Geleia de Wharton

Preparação da Membrana Amniótica e da Geleia De Wharton

Os cordões umbilicais para obtenção da Geleia de Wharton (GGW) e a membrana amniótica foram obtidos de duas parturientes humanas (n = 2) com 36

a 40 semanas de idade gestacional que preencheram os seguintes critérios de inclusão:

- Idade entre 20 e 30 anos;
- Sem comorbidades
- Sem história de intercorrências clínicas durante a gestação;
- Terem sido submetidas à cesariana com fetos normais;
- Exames sorológicos negativos para HIV, vírus da hepatite B e C e sífilis.

Critérios de Exclusão:

- Coleta de cordão umbilical e membrana amniótica com mais de 12hrs de dequitação
- Achados macroscópicos suspeitos na placenta/ membrana amniótica e cordão umbilical no intraoperatório de tumorações, calcificações e alterações morfológicas.
- Rompimento do material placentário devido a patologias placentárias (placenta acreta, percreta ou increta) que possa comprometer o processamento da membrana amniótica.

Cada gestante assinou o termo de doação e de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pequeno Príncipe sob número 948-11 (ANEXO I).

Os cordões e a membrana amniótica foram processados no período de 12 horas depois do parto. As membranas foram coletadas de forma estéril imediatamente após a dequitação placentária ainda em ambiente cirúrgico. Com manobra digitiforme e com a utilização de tesoura e pinça estéreis, o âmnio foi separado do córion e, em seguida, foi estendido sobre um filtro de nitrocelulose estéril.

O material foi transportado para o laboratório e, a partir deste instante, todo manuseio ocorreu dentro da proteção do fluxo laminar. Foram removidos os resíduos remanescentes, e as membranas foram acondicionadas em solução tampão fosfato contendo solução de dióxido de cloro (ClO₂) estabilizado em solução aquosa (8%) na concentração de 100 ppm e mantidas sob agitação em

temperatura ambiente por 20 minutos. Transcorrido este intervalo, foi realizada a troca da solução por outra de solução tampão salina com fosfato (PBS) 7,2.

Posteriormente, as membranas foram colocadas em papel filtro com a porção epitelial voltada para cima e recortadas em fragmentos de aproximadamente 100 x 100 mm seguido de coleta de amostras para análises microbiológicas.

Descelularização da Membrana Amniótica e da Geleia de Wharton

O processo descelularização dos cordões e da GW foi realizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) resultado de um programa de parceria firmado entre a Universidade Positivo (Prof. Dr. Júlio Cesar Francisco) e o Núcleo de Regeneração Tecidual da PUCPR, sob coordenação do Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita-Souza.

A descelularização foi realizada com técnica asséptica em uma cabine de segurança biológica classe II BioSAFE (Veco®). Para esse processo, os cordões foram retirados do meio tampão fosfato (PBS) pH 7.2 (Gibco) e tratados com solução de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 0,01% e SD (desoxicolato de sódio) a 0,01% por 24 horas a 37°C, com auxílio de agitador mecânico (mesa agitadora 109 M, Nova Ética Ltda.). Depois foram conservados em PBS a 4°C.

Procedimento Cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos nos animais foram realizados sob efeito de anestésicos. Os animais estavam em jejum alimentar de 6 horas e hídrico de 2 horas. O animal foi posicionado em decúbito dorsal com contenção física manual. Em seguida, foi instalada a monitorização de eletrocardiografia em duas derivações e a oferta de oxigênio a 100%. A indução anestésica foi realizada com acepram na dose de 0,75mg/kg e cetamina na dose de 35mg/kg ambos na via intramuscular (IM), para o relaxamento muscular foi utilizado Xilazina na dose de 5mg/kg IM.

A obtenção do plano anestésico foi constatada através do relaxamento muscular e da ausência do reflexo palpebral. Durante todo o período anestésico,

os coelhos foram monitorados, com vista a detectar complicações ou manifestações de dor, para suplementar a anestesia.

A cirurgia teve início com antisepsia da região cervical com iodopolividona (PVPI) tópico, colocação de campos estéreis, anestesia local com lidocaína 2%, sem vasoconstritor (dose de 1mg/kg) aguardando o tempo de latência de 5 minutos e respeitando o tempo de efeito de 30 minutos.

Foram realizadas cervicotomias medianas (longitudinais), após dissecação da traqueia, preservando sua porção lateral, responsável pela sua vascularização. No momento do ato cirúrgico foi realizada a traqueostomia na porção anterior da traqueia com ressecção de um retângulo de 10 mm de largura por 20 mm de comprimento) medidos com régua estéril.

Imediatamente após, os animais do grupo GMA foram submetidos ao implante de uma porção de Membrana Amniótica sobre o defeito traqueal criado, assim como o grupo GW foram submetidos ao implante de uma porção de Geleia de Wharton sobre o defeito traqueal criado. A sutura foi apoiada em quatro pontos de reparo nas extremidades do retângulo com fio de polipropileno número 4.0 agulhado. Após o término da sutura, os músculos pré-traqueais foram aproximados por sutura contínua com fio de algodão número 2.0 agulhado (**Figura 4**).



Figura 4. Procedimento cirúrgico realizado nos grupos Controle (A), Geleia de Wharton.n (B) e Membrana Amniótica (C).

Os animais do grupo controle foram apenas submetidos à traqueostomia e o conduto foi mantido aberto para cicatrização por segunda intenção. Posteriormente, foi realizada a aproximação dos músculos pré-traqueais e fechamento do tecido celular subcutâneo e pele.

A analgesia pós-operatória foi realizada durante todo período de recuperação e observação com duração de 60 dias, utilizando-se carprofen a 4mg/kg/dia subcutâneo (SC) uma vez ao dia mantidos por 5 dias, assim como,

morfina na dose de 2 a 5mg/kg SC de 4/4 horas durante o procedimento cirúrgico e no pós-operatório conforme demanda.

Outro cuidado pós-operatório foi o emprego de antibioticoterapia profilática, curativos e avaliação rotineira da ferida operatória. Para antibioticoterapia foi aplicada Cefalexina na dose de 15mg/kg via SC de 12/12 horas por 7 dias.

Eutanásia

Todos os animais foram submetidos à eutanásia após o período de observação de 60 dias. Na sala cirúrgica na área do biotério sob os cuidados do Médico Veterinário Dr. Thiago Fuchs (CRMV 5549) realizou a anestesia geral com utilização de acepram, xilazina e cetamina nas doses pré-determinadas e, após, infusão de cloreto de potássio na dose de 100mg/kg via intravenosa (IV). Foi realizado o acompanhamento e monitoração até ausência de frequência respiratória (FR) e frequência cardíaca (FC). Os animais foram retirados por empresa especializada em descarte de lixo biológico (sob responsabilidade da Empresa GR soluções ambientais).

Histopatologia

Para o estudo histológico dos padrões anatomopatológicos dos animais, as amostras das lesões foram colocadas em recipientes plásticos e etiquetados, contendo paraformaldeído a 10% permanecendo por 48 horas e enviadas ao laboratório experimental de anatomia patológica da PUCPR para serem processadas com a técnica de inclusão em parafina, cortados e corados.

Os cortes histológicos foram corados com a coloração Sirius Red (Direct Red: Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, WI, EUA) para avaliar as deposições de colágeno I (maduro) e III (imaturo) e Hematoxilina e Eosina (HE) (Harris Hematoxilina: NewProv, Cod. PA203, Paraná, BR; Eosina: BIOTEC Reagentes Analíticos, Cod. 4371, Paraná, BR) para avaliação histológica no local da lesão.

As lâminas foram fotografadas com uma ampliação de 400 (campo de alta potência ou HPF) sob luz polarizada. A avaliação dos marcadores foi através do software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA), onde as áreas polarizadas foram identificadas (vermelho para o colágeno I maduro ou verde para o colágeno III imaturo). Os valores da análise do colágeno I (maduro) e do colágeno III (imaturo) foram expressos em porcentagem por HPF.

Análise Imuno-Histoquímica

O ensaio de imuno-histoquímica foi precedido pela confecção de blocos teciduais parafinados multiamostrais, TMA (do inglês *Tissue Microarray*). As peças foram preparadas em lâminas coradas com diferentes marcadores α -SMA, TGF- β 1 e Aggrecan para a realização da técnica de imuno-histoquímica.

Tabela 1. Dados dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Tipo	Clone	Diluição	Marca
Anti- α -SMA	Monoclonal/Rato	BSB-15	1:600 pH 9	BioSB
Anti- TGF- β 1	Policlonal/Coelho	E11262	1:200	Spring
Anti-Aggrecan	Monoclonal/Rato	Ab3773 BC3	1:200	Abcam

Esse protocolo utiliza anticorpos primários em câmara úmida, com temperatura entre 2 e 8° C, *overnight* e um polímero secundário (Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit-Micropolymer, Abcam, ab236466, Cambridge, UK) em temperatura ambiente. A revelação da técnica ocorre a partir da adição do complexo 2, 3, diaminobenzidina + substrato peróxido de hidrogênio.

Os resultados foram confirmados pela reatividade de um controle positivo e outro negativo. As lâminas foram então escaneadas com Scanner Zeiss Axioscan (Jena, Alemanha) em campos de alta potência (HPFs; ampliação de 20x).

Após esse processo, as áreas de imuno positividade foram medidas pelo programa Image-Pro Plus 4.5 e posteriormente, convertidas em porcentagens.

Análise Estatística

Os resultados quantitativos foram representados através da média e desvio padrão. A análise estatística de variância foi realizada por ANOVA, seguida do teste de Kruskal-Wallis para comparar os grupos. Foram considerados valores significativos os valores nos quais o $*p < 0,05$. As análises foram feitas utilizando o programa Graph Pad Prism 9.0 (San Diego, USA).

6. RESULTADOS

Neste estudo foi avaliado o efeito da membrana amniótica (MA) e da geleia de Wharton (GW) na regeneração traqueal em um modelo animal. Dez animais foram randomizados para cada grupo: controle, MA e GW. Durante o experimento, houve perdas de animais devido à infestação por sarna e estresse, sendo estes tratados e excluídos da análise.

A análise imuno-histoquímica, utilizando marcadores como α -SMA, revelou uma maior porcentagem de transição epitelial-mesenquimal e organização da matriz extracelular no grupo GW ($71,17\% \pm 22,03$) em comparação com os grupos controle ($50,39\% \pm 21,28$) e MA ($47,43\% \pm 21,79$). Embora relevante, a análise estatística não revelou diferenças significativas entre os grupos (Figura 5).

Esses resultados sugerem que a GW proporcionou um microambiente mais favorável à regeneração tecidual. No entanto, são necessárias investigações adicionais para elucidar os mecanismos envolvidos e confirmar essa hipótese.

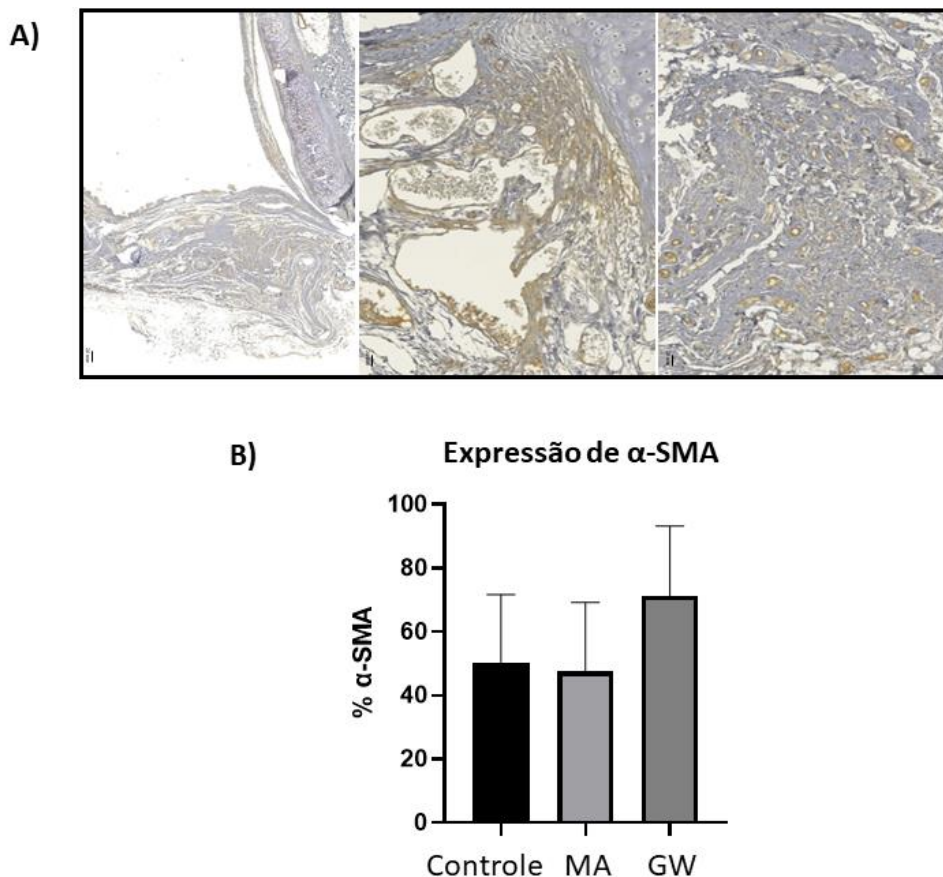


Figura 5. Expressão do marcador α -SMA no grupo controle, MA e GW. Em (A) visualiza-se a expressão do marcador no tecido traqueal (Ampliação 20x). Em (B), os resultados são apresentados com média e desvios padrão. O teste ANOVA foi seguido pelo teste de Kruskal-Wallis.

Na análise da expressão de TGF- β 1, uma citocina multifuncional que desempenha um papel crucial na recuperação tecidual após a lesão. Verificou-se que para o grupo controle TGF- β , a média foi de 41,94% (DP $\pm$ 19,04); para o MA, a média foi de 70,5% (DP $\pm$ 20,16); e para o GW, a média foi de 60,41% (DP $\pm$ 25,12). No entanto, os grupos não apresentaram diferenças significativas (Figura 6).

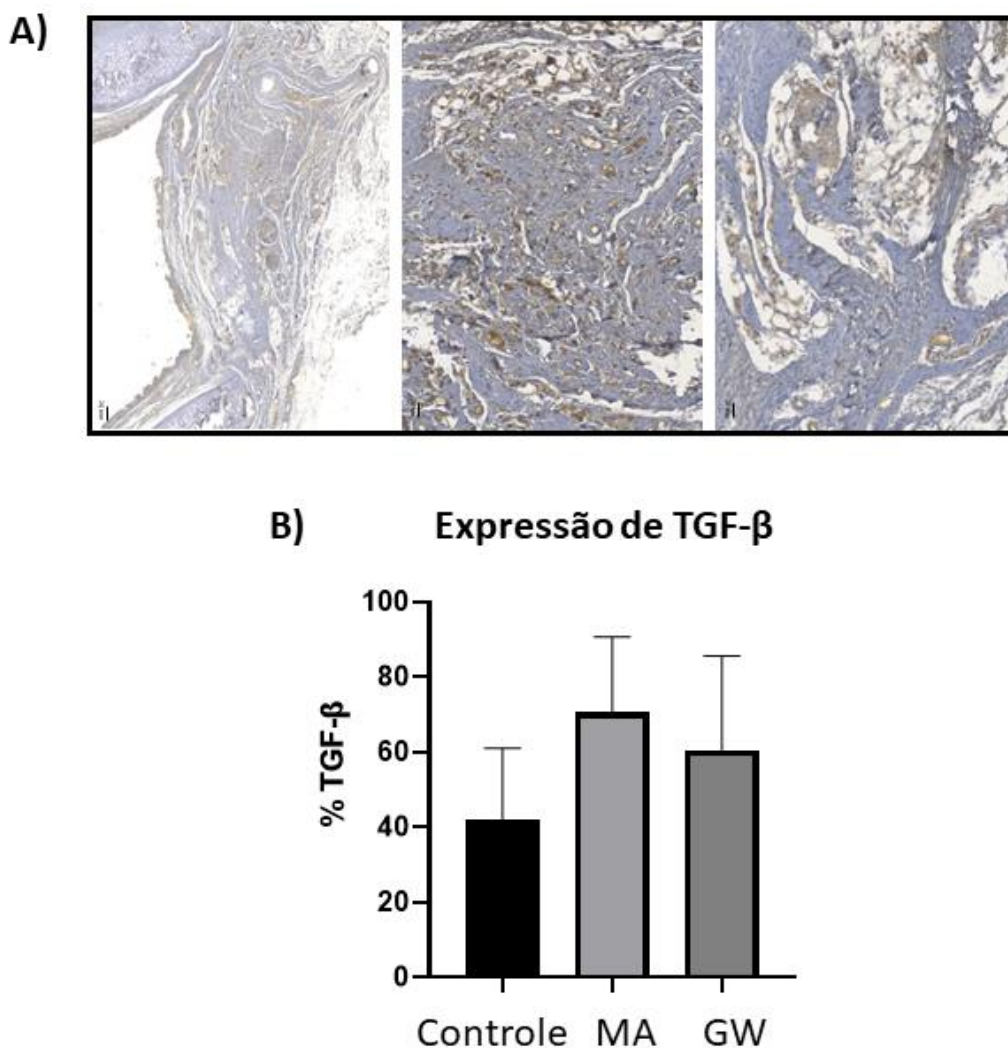


Figura 6. Expressão do marcador TGF- β no grupo controle, MA e GW. Em (A) visualiza-se a expressão do marcador no tecido traqueal (Ampliação 20x). Em (B), os resultados são apresentados com média e desvios padrão. O teste ANOVA foi seguido pelo teste de Kruskal-Wallis

Na análise da proliferação cartilaginosa nos tecidos traqueais, utilizando o anticorpo Anti-Aggregan, a porcentagem média para o grupo Controle foi de 4,93% (DP $\pm$ 3,11); para o grupo MA, foi de 3,52% (DP $\pm$ 3,14); e para o grupo GW, foi de 7,052% (DP $\pm$ 3,44). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 7).

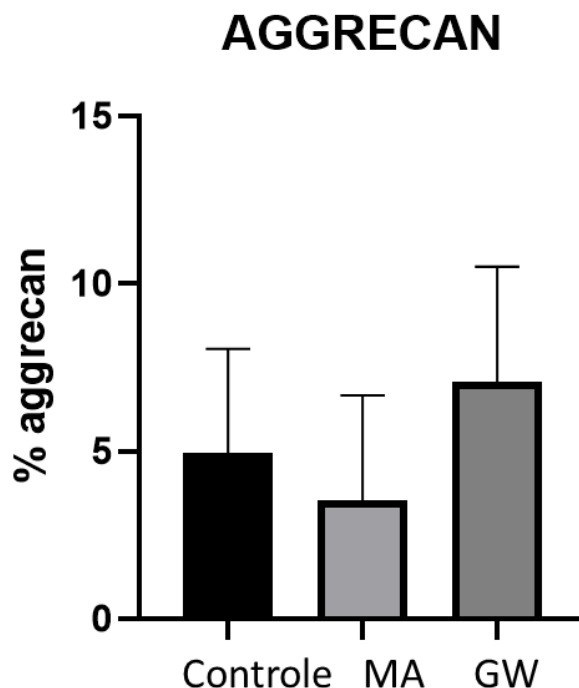


Figura 7. A imunoexpressão de Aggrecan foi analisada em três grupos: controle, MA e GW. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. Teste ANOVA seguido do teste de Kruskal-Wallis.

Em relação a produção dos colágenos tipo I e III. Os resultados demonstraram que, para o colágeno I, a percentagem média de produção foi de 75,86% (DP $\pm$ 8,46) para o CTG, 66,87% (DP $\pm$ 12,48) para o MA e 74,86% (DP $\pm$ 6,83) para o GW. No entanto, não houve diferença significativa na produção desses colágenos entre os grupos. Da mesma forma, para o colágeno III, a porcentagem média de produção foi de 24,14% (DP $\pm$ 8,46) para o controle, 33,13% (DP $\pm$ 12,48) para o MA e 25,14% (DP $\pm$ 6,83) para o GW. Entretanto, também não houve diferença significativa na produção de colágeno entre os grupos (Figura 8).

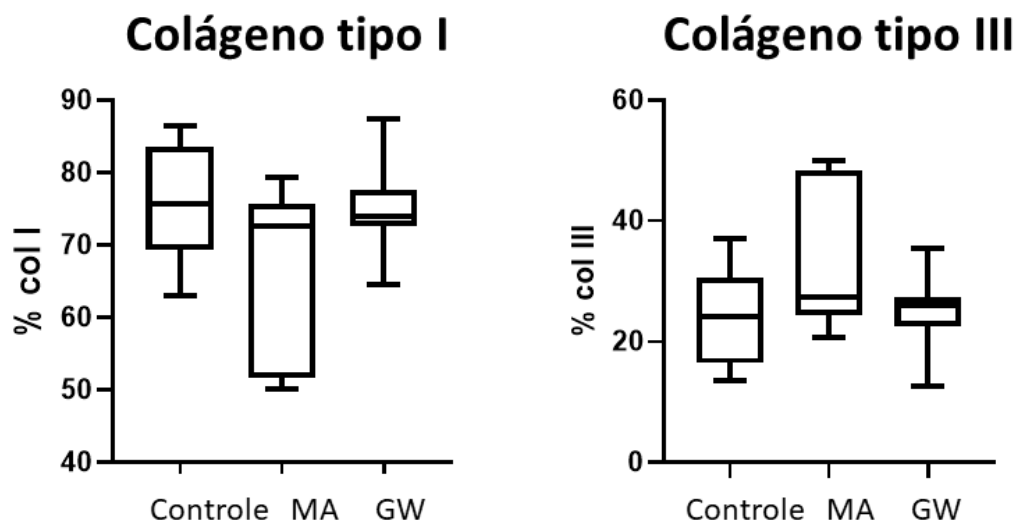


Figura 8. Análise dos colágenos tipo I e III nos três grupos analisados (controle, MA e GW). Teste ANOVA seguido do teste de Kruskal-Wallis.

Os biomateriais foram avaliados em sua capacidade de desencadear alterações no perímetro da traqueia e formação de estenoses, e o que foi observado é que tanto na análise perímetro como da área traqueal (Tabela 2). Não foi observada diferença estatística entre os grupos.

Tabela 2. Caracterização da população de coelhos.

Variáveis	Grupo Controle (n=7)	Grupo Geleia de Wharton (n=7)	Grupo Membrana Amniótica (n=5)	p
Perímetro traqueal (μm^2)	15389 $\pm$ 1961	15562 $\pm$ 1390	15257 $\pm$ 2210	>0,9
Área traqueal (μm^2) *	15523727 $\pm$ 4086295	14712626 $\pm$ 2408509	15436725 $\pm$ 4217003	>0,9

*Os dados foram gerados através de Média e desvio padrão.

7. DISCUSSÃO

A ressecção traqueal após uma lesão é considerada um procedimento seguro. No entanto, ainda é um desafio significativo devido às complicações pós-operatórias que podem afetar seriamente a qualidade de vida dos pacientes (DAMIANO et al., 2021). Neste contexto, cada vez mais estruturas biológicas baseadas em tecidos descelularizados tem sido consideradas como alternativas viáveis para restaurar a estrutura e função da traqueia após procedimentos cirúrgicos (DHASMANA; SINGH; RAWAL, 2020). Neste projeto, diferentes imunomarcadores relacionados à regeneração cicatricial, como aggrecan, TGF- β 1 e α -SMA, foram analisados para entender o comportamento celular em contato com as estruturas escolhidas. Nos resultados obtidos, observou-se que ambas as estruturas descelularizadas de Geleia de Wharton como a membrana amniótica demonstraram ser arcabouços adequados para a engenharia de tecidos, apresentando biocompatibilidade e um microambiente desejável para a sobrevivência de diferentes células.

O processo de cicatrização, seja ele causado acidentalmente ou cirurgicamente, envolve várias fases de reparação tecidual, como coagulação, inflamação, proliferação e remodelação. A desregulação de um desses processos pode levar a uma cicatrização deficiente, ou cicatrizes excessivas (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016). Uma vantagem observada foi a sua estrutura tridimensional, que permite a perfusão e vascularização, possibilitando a repopulação celular no local da lesão, permitindo que o tecido se regenerar corretamente (LEI et al., 2021).

Vários processos estão envolvidos na formação dessas cicatrizes, como a proliferação celular anormal, a transformação dos fibroblastos em resposta ao dano, a estimulação de citocinas como o TGF- β , e a regulação de genes como o α -SMA, que estão envolvidos na matriz extracelular, bem como a produção de colágeno e fibronectina.

O TGF- β está envolvido em vários processos de formação de cicatrizes, tais como a promoção da síntese de componentes da matriz extracelular, incluindo o colágeno. Esse mediador também atua na regulação da fibrose tecidual, atuando na proliferação de fibroblastos, bem como a indução da diferenciação e formação de cicatrizes através da regulação da fibrose e a proliferação de queratinócitos (HU

et al., 2018; MOON et al., 2019). Outro aspecto a considerar é o papel do TGF- β 1 na diferenciação e ativação dos miofibroblastos, que induzem a expressão de α -SMA.

A expressão mais elevada de α -SMA foi observada no grupo da Geleia de Wharton, todavia, neste mesmo grupo concomitantemente a expressão de TGF- β 1 estava mais baixa em comparação com o grupo controle. Além disso, o grupo da Membrana Amniótica não apresentou uma maior expressão de α -SMA, apesar de apresentar uma maior expressão de TGF- β 1. A expressão de α -SMA pode estar relacionada com o poder de contração da ferida e com o desenvolvimento de reações fibróticas excessivas que se manifestam como uma “má cicatriz” (HU et al., 2018).

Os principais componentes químicos da cartilagem são a água, o colágeno e os proteoglicanos (YU et al., 2022). Embora o colágeno de tipo II seja o principal constituinte do tecido cartilágneo, as abordagens de engenharia da cartilagem baseiam-se principalmente em dispositivos de colágeno de tipo I (WU et al., 2021). Na análise do aggrecan, o maior proteoglicano encontrado na cartilagem (WU et al., 2021), foi possível observar que tanto o grupo Geleia de Wharton como o da Membrana amniótica tiveram resultados semelhantes ao controle após 60 dias de análise.

Foltz et al., 2022, em um estudo que analisou as propriedades da Geleia de Wharton por 30 dias em coelhos após lesão traqueal, sugeriram que, apesar de suas diversas características como biomaterial, essa estrutura não apresentou benefícios histopatológicos para a regeneração do tecido traqueal. Neste estudo, a formação de cartilagem foi avaliada utilizando o mesmo marcador Aggrecan, onde não houve diferença significativa entre o controle entre os grupos de controle e de Geleia de Wharton ao longo de 30 dias (FOLTZ et al., 2022).

Em outro estudo, Simeoni et al. (2021) avaliaram uma membrana amniótica descelularizada como estrutura para lesões traqueais usando células-tronco mesenquimais, encontrando tecido cartilaginoso através da formação de colágeno imaturo nas regiões dos defeitos traqueais após 60 dias (BAGGIO SIMEONI et al., 2021).

Os colágenos tipo I e tipo III participam diretamente na cicatrização de feridas e na regeneração de tecidos, com aumento da síntese de colágeno tipo III durante

as fases iniciais e aumento da síntese de colágeno tipo I durante as fases finais (SINGH; RAI; K AGRAWAL, 2023). O processo de remodelação pode ocorrer de 3 semanas a 1 ano após a lesão (CHILDS; MURTHY, 2017). Durante a fase proliferativa, também conhecida como fase de regeneração tecidual, ocorre a substituição da matriz extracelular, angiogênese e epitelização, associando fatores como o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e componentes como o colágeno III (MONY et al., 2023). Nos resultados obtidos, as taxas de colágeno tipo I encontradas foram semelhantes entre os grupos. Enquanto ao analisar o colágeno tipo III, houve um ligeiro aumento no grupo MA, o que pode corroborar a sugestão de que a utilização de biomateriais leva a um atraso no processo de cicatrização do tecido observado. Esses resultados corroboram com outro estudo que utilizou uma membrana amniótica, que mostrou que, após 35 dias, não se registou qualquer diferença entre o grupo que utilizou apenas a membrana e o grupo que utilizou a membrana e uma molécula anti-inflamatória (MIGGIOLARO et al., 2023).

Entre as limitações do estudo, manter os animais vivos durante 60 dias foi desafiador, inclusive durante uma infestação de sarna levando a perda ocasional de um animal. Outra limitação, foi a análise apenas nos últimos 60 dias e não de uma maneira que possibilitasse o monitoramento contínuo da variação das taxas dos biomarcadores sob investigação. A possibilidade da utilização de biomarcadores que permitissem esse monitoramento seria capaz de apresentar resultados satisfatórios em relação ao desenvolvimento do tecido cicatricial.

A compreensão dos papéis das várias moléculas envolvidas na remodelação da matriz extracelular na lesão e regeneração dos tecidos é fundamental para avaliar as estruturas para a regeneração da traqueia. Este estudo examinou minuciosamente a formação de tecido cartilaginoso durante 60 dias. A duração prolongada deste estudo ofereceu uma compreensão mais abrangente do potencial dessas estruturas na regeneração do tecido traqueal.

Além disso, identificou a atividade de remodelação dos tecidos correlacionada com a redução da cicatrização e estenose através da actina do músculo liso (α -SMA). Além da análise do microambiente para avaliar a inflamação crônica e promoção da reconstrução dos tecidos com TGF- β 1. Estes marcadores permitiram uma maior compreensão do comportamento do implante no ambiente biológico, comprovando assim o seu potencial como uma modalidade terapêutica viável para reconstruções de defeitos traqueais.

8. CONCLUSÃO

Através da análise da regeneração do tecido traqueal e os marcadores selecionados sugere-se que:

- A Membrana Amniótica e a Geleia de Wharton demonstraram apresentar boa biocompatibilidade quando utilizadas como arcabouços em um modelo animal de traqueostomia. Uma vez que ambas as estruturas não desencadearam reações histopatológicas negativas quando implantada, demonstrando serem bem toleradas pelo organismo, não induzindo a formação de estenoses.

- A análise histopatológica dessas estruturas não evidenciou diferenças significativas entre os grupos em relação ao perímetro traqueal e aos marcadores de regeneração tecidual, sugerindo que os biomateriais proporcionam um microambiente favorável ao processo de reparo.

- A estrutura tridimensional desses arcabouços permitiu o repovoamento celular e a regeneração inicial do tecido. No entanto, a natureza bioinerte dos biomateriais pode limitar a velocidade e a extensão da regeneração, não sendo capaz de induzir a formação de novos tecidos cartilagosos.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O uso de modelos animais de pequeno porte, como o coelho, é fundamental para a avaliação inicial da biocompatibilidade e do potencial regenerativo de novos biomateriais (KIM et al., 2023). Nesta pesquisa, que teve como objetivo avaliar a capacidade de regeneração tecidual da traqueia após a implantação de membrana amniótica e geleia de Wharton descelularizadas, foi capaz de demonstrar após 60 dias de acompanhamento que ambos os biomateriais são biocompatíveis e não induzem a rejeição ou a formação de estenose traqueal.

A escolha desses biomateriais justificou-se pela sua baixa imunogenicidade, acompanhada pelo processo de descelularização que minimiza a chance de desencadear reações inflamatórias e até mesmo a rejeição do implante (Batool et al., 2021). Os biomateriais avaliados demonstraram ser eficazes em proporcionar um suporte estrutural adequado para a regeneração da traqueia. A manutenção do perímetro traqueal e a ausência de formação de estenoses indicam que os arcabouços forneceram um suporte mecânico eficiente, resistindo às pressões fisiológicas do órgão e permitindo a preservação de suas funções (BOYS et al., 2020; NETO et al., 2018).

De acordo com Neishabouri et al., 2022, os arcabouços têm como objetivo permitir a propagação das células *in vitro* e *in vivo* e o que foi visualizado na análise dos diferentes grupos foi um resultado dos grupos dos biomateriais muito semelhante ao grupo controle. Entretanto, a análise dos marcadores de regeneração tecidual não revelou diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que, embora os biomateriais proporcionem um microambiente favorável à regeneração, eles podem não ser suficientes para estimular a proliferação e diferenciação celular de forma robusta.

A análise dos marcadores de reparo tecidual, como TGF- β e α -SMA, sugeriram que os biomateriais se integraram ao tecido hospedeiro de forma harmoniosa, sem induzir a formação de cicatrizes excessivas (HU et al., 2018). Na análise da expressão de colágeno, a principal proteína estrutural da matriz extracelular, observou-se achados relevantes para a compreensão do processo de regeneração tecidual induzido pelos biomateriais (XU et al., 2024).

A manutenção dos níveis de colágeno tipo I em todos os grupos indica a preservação da integridade estrutural do tecido. O leve aumento do colágeno tipo

III no grupo tratado com membrana amniótica pode indicar uma fase inicial de cicatrização, sugerindo a necessidade de um acompanhamento mais prolongado para avaliar a remodelação completa do tecido. Além de sugerir a ativação de mecanismos de reparo e a formação de novo tecido conjuntivo. Essa observação é consistente com a literatura, que descreve o colágeno tipo III como um componente importante da matriz provisória durante a cicatrização, sendo gradualmente substituído pelo colágeno tipo I em fases mais avançadas do processo de reparo (SINGH; RAI; K AGRAWAL. Vale ressaltar, que embora o colágeno tipo II seja o principal componente da cartilagem, a utilização de colágeno tipo I em estratégias de engenharia de tecidos tem sido amplamente explorada (Wu et al., 2021).

A análise do agrecan, um proteoglicano essencial para a manutenção da matriz extracelular cartilaginosa, não revelou diferenças significativas entre os grupos, corroborando os resultados de estudos anteriores realizados por nosso grupo (FOLTZ et al., 2022). Essa constatação indica que a implantação dos biomateriais não alterou significativamente a composição bioquímica da matriz extracelular, preservando a sua função de suporte e lubrificação.

No entanto, a ausência de diferenças na expressão de agrecan sugere que os biomateriais, por si só, podem não ser suficientes para induzir uma regeneração completa da cartilagem. A adição de fatores de crescimento, ou a encapsulação de células condrogênicas em arcabouços de colágeno, pode potencializar a formação de novo tecido cartilaginoso e acelerar o processo de reparo (YANG; ATALA; YOO, 2020). Outra perspectiva de estudo, ainda pouco explorada é a possibilidade da utilização de ambas as estruturas para a regeneração, combinando suas características e apresentando uma nova possibilidade.

Um dos diferenciais deste estudo foi o período de acompanhamento de 60 dias, superior ao observado em muitos estudos da literatura, que geralmente avaliam os animais por períodos mais curtos. Essa escolha metodológica permitiu uma avaliação mais precisa da biocompatibilidade a longo prazo dos biomateriais e da ocorrência de possíveis complicações tardias, como a formação de estenoses. Embora tenham existido desafios na manutenção dos animais, uma das maiores limitações enfrentadas, que resultaram na perda de alguns indivíduos, os resultados obtidos demonstram que tanto a membrana amniótica quanto a geleia

de Wharton são biomateriais biocompatíveis e bioinertes, não induzindo formação de tecido cicatricial excessivo.

Essa característica é fundamental para a aplicação desses biomateriais em procedimentos de engenharia de tecidos. A ausência de complicações relacionadas à implantação dos biomateriais, como as descritas por Soriano et al. (2021), resposta inflamatória grave que conduziu à granulação e estenose do enxerto ou à falha do enxerto devido a infecção (SORIANO et al., 2021) corroboram com a segurança e o potencial desses materiais para a regeneração traqueal.

A partir dos resultados é possível sugerir que a Geleia de Wharton e a Membrana Amniótica demonstraram ser biomateriais favoráveis para a engenharia de tecidos traqueais, podendo ser utilizados como uma alternativa segura e eficaz para a reconstrução traqueal, devido à ausência de estenoses e a manutenção do perímetro traqueal.

No entanto, a falta de indução de uma regeneração tecidual mais intensa e a ausência de formação de colágeno significativa podem indicar que a modulação do microambiente com fatores de crescimento ou a utilização de células-tronco pode ser necessária para acelerar o processo de reparo e promover a formação de novo tecido funcional. Futuras pesquisas devem explorar a combinação desses biomateriais com outras terapias para otimizar a regeneração tecidual e melhorar os resultados clínicos para pacientes com defeitos traqueais.

10.REFERÊNCIAS

ABAZARI, M. F. et al. Decellularized amniotic membrane Scaffolds improve differentiation of iPSCs to functional hepatocyte-like cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 2, p. 1169–1181, 1 fev. 2020.

ABBASI-KANGEVARI, M. et al. Potential therapeutic features of human amniotic mesenchymal stem cells in multiple sclerosis: Immunomodulation, inflammation suppression, angiogenesis promotion, oxidative stress inhibition, neurogenesis induction, MMPs regulation, and remyelination stimulation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. FEB, 2019.

ADAMO, D. et al. The Growing Medical Need for Tracheal Replacement: Reconstructive Strategies Should Overcome Their Limits. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, n. May, 2022.

ALLGOOD, S. et al. **Acquired laryngeal and subglottic stenosis following COVID-19—Preparing for the coming deluge.** **Journal of Clinical Nursing**, 2024.

ARUTYUNYAN, I.; FATKHUDINOV, T.; SUKHIKH, G. **Umbilical cord tissue cryopreservation: A short review.** **Stem Cell Research and Therapy**, 2018.

AUCHINCLOSS, H. G.; WRIGHT, C. D. **Complications after tracheal resection and reconstruction: Prevention and treatment.** **Journal of Thoracic Disease**Pioneer Bioscience Publishing, , 1 mar. 2016.

BAGGIO SIMEONI, P. R. et al. Tracheal repair with human umbilical cord mesenchymal stem cells differentiated in chondrocytes grown on an acellular amniotic membrane: A pre-clinical approach. **Life**, v. 11, n. 9, 2021.

BATOOL, F. et al. **Modulation of immune-inflammatory responses through surface modifications of biomaterials to promote bone healing and regeneration.** **Journal of Tissue Engineering**SAGE Publications Ltd, , 2021.

BEIKI, B.; ZEYNALI, B.; SEYEDJAFARI, E. Fabrication of a three dimensional spongy scaffold using human Wharton's jelly derived extra cellular matrix for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, 2017.

BEYOGLU, M. A. et al. Complex Post-intubation Tracheal Stenosis in Covid-19 Patients. **Indian Journal of Surgery**, v. 84, n. 4, p. 805–813, 1 ago. 2022.

BITAR, M. A.; AL BARAZI, R.; BARAKEH, R. Airway reconstruction: review of an approach to the advanced-stage laryngotracheal stenosis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 83, n. 3, p. 299–312, 2017.

BORDONI, B.; SIMONELLI, M.; MORABITO, B. The Other Side of the Fascia: The Smooth Muscle Part 1. **Cureus**, 14 maio 2019.

BOYS, A. J. et al. **Building Scaffolds for Tubular Tissue Engineering**. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**Frontiers Media S.A., , 10 dez. 2020.

BRAND-SABERI, B. E. M.; SCHÄFER, T. **Trachea: Anatomy and physiology**. **Thoracic Surgery Clinics**, fev. 2014.

CARPENTER, D. J. et al. **Laryngotracheal stenosis: Mechanistic review**. **Head and Neck**John Wiley and Sons Inc, , 1 ago. 2022.

CHENG, Z. J. et al. Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 4, 2007.

CHILDS, D. R.; MURTHY, A. S. Overview of Wound Healing and Management Wound Healing Management Skin Soft tissue injuries. **Surgical Clinics of North America**, v. 97, n. 1, p. 189–207, 2017.

CIPRIANO, A. et al. An Overview of complications associated with open and percutaneous tracheostomy procedures. **Int J Crit Illn Sci**, v. 5, n. 3, p. 179–188, 2015.

CONVERSE, G. L. et al. Wharton's jelly matrix decellularization for tissue engineering applications. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2018. v. 1577p. 25–33.

DADKHAH TEHRANI, F. et al. A Review on Modifications of Amniotic Membrane for Biomedical Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. January, p. 1–25, 2021a.

DADKHAH TEHRANI, F. et al. **A Review on Modifications of Amniotic Membrane for Biomedical Applications. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**Frontiers Media S.A., , 13 jan. 2021b.

DAMIANO, G. et al. Current strategies for tracheal replacement: A review. **Life**, v. 11, n. 7, p. 1–14, 2021.

DAVIS, J. S. SKIN GRAFTING AT THE JOHNS HOPKINS HOSPITAL. **Annals of Surgery**, v. 50, n. 3, 1909.

DEWAN, A. K. et al. **Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques. BioMed Research International**, 2014.

DHASMANA, A.; SINGH, A.; RAWAL, S. **Biomedical grafts for tracheal tissue repairing and regeneration “Tracheal tissue engineering: an overview”**. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 2020.

DONATELLI, J. et al. To breathe or not to breathe: a review of artificial airway placement and related complications. **Emergency Radiology**, v. 22, n. 2, p. 171–179, 2015.

DUBUS, M. et al. Decellularization of Wharton's Jelly Increases Its Bioactivity and Antibacterial Properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 11 mar. 2022.

ELALOUF, A. Immune response against the biomaterials used in 3D bioprinting of organs. **Transplant Immunology**, 2021.

ETIENNE, H. et al. Tracheal replacement. **European Respiratory Journal**, v. 51, n. 2, p. 1–9, 2018.

FARZANEGAN, R. et al. An overview of tracheal stenosis research trends and hot topics. **Archives of Iranian Medicine**, 2017.

FÉNELON, M. et al. Applications of human amniotic membrane for tissue engineering. **Membranes**, v. 11, n. 6, p. 1–27, 2021a.

FÉNELON, M. et al. Applications of human amniotic membrane for tissue engineering. **Membranes** MDPI AG, , 1 jun. 2021b.

FOLTZ, K. M. et al. Decellularized Wharton Jelly Implants Do Not Trigger Collagen and Cartilaginous Tissue Production in Tracheal Injury in Rabbits. **Life**, v. 12, n. 7, 2022.

FORTE, V. ESTENOSES TRAQUEAIS BENIGNAS. **Sociedade Brasileira de Cirurgia Torácica**, 2013.

FRIEL, N. A. et al. Amniotic Fluid, Cells, and Membrane Application. **Operative Techniques in Sports Medicine**, v. 25, n. 1, p. 20–24, 1 mar. 2017.

GAO, N. et al. Physiological vs. pharmacological signalling to myosin phosphorylation in airway smooth muscle. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 19, p. 6231–6247, 1 out. 2017.

GELBARD, A. et al. Comparative treatment outcomes for patients with idiopathic subglottic stenosis. **JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 146, n. 1, 2020.

GENDEN, E. M.; LAITMAN, B. M. **Human Tracheal Transplantation. Transplantation**, 2023.

GHIANI, A. et al. Tracheal stenosis in prolonged mechanically ventilated patients: prevalence, risk factors, and bronchoscopic management. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2022.

GHORBANI, F. et al. In-vivo characterization of a 3D hybrid scaffold based on PCL/decellularized aorta for tracheal tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 81, p. 74–83, 1 dez. 2017.

GILPIN, A.; YANG, Y. **Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. BioMed Research International**Hindawi Limited, , 2017.

GREANEY, A. M.; NIKLASON, L. E. The History of Engineered Tracheal Replacements: Interpreting the Past and Guiding the Future. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 27, n. 4, p. 341–352, 2021.

GRILLO, H. C. et al. Postintubation tracheal stenosis. Treatment and results. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 109, n. 3, p. 486–493, 1995.

GUPTA, A. et al. Umbilical cord-derived Wharton's jelly for regenerative medicine applications. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 15, n. 1, 13 fev. 2020.

GUPTA, P. et al. Functionalized Silk Vascular Grafts with Decellularized Human Wharton's Jelly Improves Remodeling via Immunomodulation in Rabbit Jugular Vein. **Advanced Healthcare Materials**, v. 10, n. 19, 1 out. 2021.

HANSEL, J. et al. **Videolaryngoscopy versus direct laryngoscopy for adults undergoing tracheal intubation. Cochrane Database of Systematic Reviews** John Wiley and Sons Ltd, , 4 abr. 2022.

HEATH, D. E. **A Review of Decellularized Extracellular Matrix Biomaterials for Regenerative Engineering Applications. Regenerative Engineering and Translational Medicine**, 2019.

HILLEL, A. T. et al. Laryngotracheal Microbiota in Adult Laryngotracheal Stenosis. **mSphere**, v. 4, n. 3, 26 jun. 2019.

HOSNA, A. et al. Cryotherapy for the Treatment of Tracheal Stenosis: A Systematic Review. **Cureus**, 27 jun. 2023.

HU, H. H. et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 292, p. 76–83, 2018.

HUANG, Z. et al. Role of Erythromycin-Regulated Histone Deacetylase-2 in Benign Tracheal Stenosis. **Canadian Respiratory Journal**, v. 2020, 2020.

IQBAL, S. et al. **Biomaterials evolution: from inert to instructive. Biomaterials Science**, 2023.

JADALANNAGARI, S. et al. Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–23, 2017.

JEONG, H. J. et al. **3D bioprinting strategies for the regeneration of functional tubular tissues and organs. Bioengineering**, 2020.

JORGE, L. F. et al. Tracheal repair with acellular human amniotic membrane in a rabbit model. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 3, 2018.

KAMRAN, A.; JENNINGS, R. W. **Tracheomalacia and Tracheobronchomalacia in Pediatrics: An Overview of Evaluation, Medical Management, and Surgical Treatment.** *Frontiers in Pediatrics* Frontiers Media S.A., , 12 dez. 2019.

KANDAKURE, V. T.; MISHRA, S.; LAHANE, V. J. Management of Post-traumatic Laryngotracheal Stenosis: Our Experience. **Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, v. 67, n. 3, p. 255–260, 2015.

KEHTARI, M. et al. Decellularized Wharton's jelly extracellular matrix as a promising scaffold for promoting hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 4, p. 6683–6697, 1 abr. 2019.

KIM, A. et al. **Investigating Immunomodulatory Biomaterials for Preventing the Foreign Body Response.** *Bioengineering* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 dez. 2023.

KIMMEL, H.; GITTLEMAN, H. Retrospective observational analysis of the use of an architecturally unique dermal regeneration template (Derma Pure®) for the treatment of hard-to-heal wounds. **International Wound Journal**, v. 14, n. 4, 2017.

LAMPLOT, J. D.; RODEO, S. A.; BROPHY, R. H. A Practical Guide for the Current Use of Biologic Therapies in Sports Medicine. **American Journal of Sports Medicine**, v. 48, n. 2, p. 488–503, 1 fev. 2020.

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÄHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 20, p. 3861–3885, 2016.

LEAL-MARIN, S. et al. Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 109, n. 8, p. 1198–1215, 2021a.

LEAL-MARIN, S. et al. Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 109, n. 8, p. 1198–1215, 2021b.

LEI, C. et al. Decellularized tracheal scaffolds in tracheal reconstruction: An evaluation of different techniques. **Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials**, v. 19, n. 158, 2021a.

LEI, C. et al. Decellularized tracheal scaffolds in tracheal reconstruction: An evaluation of different techniques. **Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials**, v. 19, n. 158, 2021b.

LI, Z. et al. A composite scaffold of Wharton's jelly and chondroitin sulphate loaded with human umbilical cord mesenchymal stem cells repairs articular cartilage defects in rat knee. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 32, n. 4, 2021.

LUO, Y. et al. Various administration forms of decellularized amniotic membrane extract towards improving corneal repair. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 45, 2021.

MÄKITIE, A. A. et al. Novel additive manufactured scaffolds for tissue engineered trachea research. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 133, n. 4, p. 412–417, abr. 2013.

MALLIS, P. et al. Vitrified Wharton's jelly tissue as a biomaterial for multiple tissue engineering applications. **Gynecological Endocrinology**, v. 36, n. 2, p. 139–142, 2020.

MARIANCE; YOAN LEVIA MAGDI. Overview Aspects of Anatomy and Histology of the Trachea, Pharynx, Larynx, and Esophagus: A Narrative Literature Review. **Sriwijaya Journal of Otorhinolaryngology**, v. 1, n. 1, 2023.

MARIN, E.; BOSCHETTO, F.; PEZZOTTI, G. **Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. Journal of Biomedical Materials Research - Part A** John Wiley and Sons Inc., , 1 ago. 2020.

MARINO, L. et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. **International Journal of Stem Cells**, v. 12, n. 2, p. 218–226, 2019.

MCCULLAGH, K. L.; SHAH, R. N.; HUANG, B. Y. **Anatomy of the Larynx and Cervical Trachea. Neuroimaging Clinics of North America**, 2022.

MIGGIOLARO, A. F. R. S. et al. Tracheal regeneration with acellular human amniotic membrane and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin₂ nanoparticles in a rabbit model. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 95, 2023.

MIWA, M. et al. Two cases of post-intubation laryngotracheal stenosis occurring after severe covid-19. **Internal Medicine**, v. 60, n. 3, p. 473–477, 1 fev. 2021.

MONY, M. P. et al. An Updated Review of Hypertrophic Scarring. **Cells**, v. 12, n. 5, 2023.

MOON, J. et al. Atrophic acne scar: a process from altered metabolism of elastic fibres and collagen fibres based on transforming growth factor- β 1 signalling. **British Journal of Dermatology**, v. 181, n. 6, p. 1226–1237, 2019.

NEISHABOURI, A. et al. **Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** Frontiers Media S.A., , 25 abr. 2022.

NEJAD, A. R. et al. Update review on five top clinical applications of human amniotic membrane in regenerative medicine. **Placenta**, v. 103, p. 104–119, 1 jan. 2021.

NETO, N. B. et al. Regeneration of tracheal tissue in partial defects using porcine small intestinal submucosa. **Stem Cells International**, v. 2018, p. 1–8, 2018.

OTT, L. M. et al. Mechanical evaluation of gradient electrospun scaffolds with 3D printed ring reinforcements for tracheal defect repair. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 11, n. 2, 2016.

PALACIOS, J. M. et al. Tracheal stenosis as a complication of prolonged intubation in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients: a Peruvian cohort. **Journal of Thoracic Disease**, v. 14, n. 4, p. 955–1008, 2022.

PECHRIGGL, E. et al. **Embryology of the Abdominal Wall and Associated Malformations—A Review**. **Frontiers in Surgery**Frontiers Media S.A., , 7 jul. 2022.

PENOLAZZI, L. et al. Extracellular Matrix From Decellularized Wharton's Jelly Improves the Behavior of Cells From Degenerated Intervertebral Disc. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 27 mar. 2020.

PERRONI, G. et al. Incidence of Tracheal Stenosis in ICU Hospitalized COVID-19 Patients: Results from a Prospective, Observational, Multicenter Study. **Journal of Personalized Medicine**, v. 14, n. 1, 1 jan. 2024.

PIAZZA, C. et al. **Long-term intubation and high rate of tracheostomy in COVID-19 patients might determine an unprecedented increase of airway stenoses: a call to action from the European Laryngological Society**. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 jan. 2021.

PLOJOUX, J. et al. Management of benign dynamic “a-shape” tracheal stenosis: A retrospective study of 60 patients. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 99, n. 2, p. 447–453, 2015.

POTTER, J. et al. Tracheal Stenosis after Tracheostomy. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 59, n. 1, p. 82–85, 2020.

RAHMATI, M. et al. Biomaterials for regenerative medicine: Historical perspectives and current trends. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2018. v. 1119p. 1–19.

RAMOS, T.; MORONI, L. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2019: The Role of Biofabrication - A Year in Review. Tissue Engineering - Part C: Methods** Mary Ann Liebert Inc., , 1 fev. 2020.

RANA, D. et al. **Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine** John Wiley and Sons Ltd, , 1 abr. 2017.

RAVIKUMAR, N. et al. **The role of bronchoscopy in the multidisciplinary approach to benign tracheal stenosis. Journal of Thoracic Disease** AME Publishing Company, , 31 jul. 2023.

SAHIN, M. F. et al. Analysis of 40 patients who underwent tracheal resection due to benign complex tracheal stenosis. **Asian Journal of Surgery**, v. 45, n. 1, p. 213–219, 1 jan. 2022.

SAKAGUCHI, Y. et al. Development of a novel tissue-engineered nitinol frame artificial trachea with native-like physical characteristics. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 156, n. 3, p. 1264–1272, 1 set. 2018.

SEOK, S. **Polymer-based biocompatible packaging for implantable devices: Packaging method, materials, and reliability simulation.** *Micromachines*, 2021.

SEZGIN, E. A.; ATIK, O. Ş. Are orthobiologics the next chapter in clinical orthopedics? A literature review. **Eklemleri Hastalıkları ve Cerrahisi**, v. 29, n. 2, 2018.

SILINI, A. R. et al. **Perinatal Derivatives: Where Do We Stand? A Roadmap of the Human Placenta and Consensus for Tissue and Cell Nomenclature.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* Frontiers Media S.A., , 17 dez. 2020.

SINGH, D.; RAI, V.; K AGRAWAL, D. Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. **Cardiology and Cardiovascular Medicine**, v. 07, n. 01, p. 5–16, 2023.

SORIANO, L. et al. **Development and clinical translation of tubular constructs for tracheal tissue engineering: A review.** *European Respiratory Review* European Respiratory Society, , 31 dez. 2021.

SOUMAGNE, T. et al. Dilation versus laser resection in subglottic stenosis: Protocol for a prospective international multicentre randomised controlled trial (AERATE trial). **BMJ Open**, v. 12, n. 3, 17 mar. 2022.

SPATARU, M. C. et al. General Trends on Biomaterials Applications: Advantages and Limitations. **Biomedical Engineering. IntechOpen**, p. 1148, 2024.

STEFANİSKA, K. et al. **Human Wharton's Jelly—cellular specificity, stemness potency, animal models, and current application in human clinical trials.** *Journal of Clinical Medicine* MDPI, , 1 abr. 2020.

TURAKHIA, A.; LITTLE, B. P.; HENRY, T. S. Tracheal Narrowing and Tracheomalacia. Em: **Chest Imaging**. [s.l: s.n.].

TURCATEL, G. et al. Cartilage rings contribute to the proper embryonic tracheal epithelial differentiation, metabolism, and expression of inflammatory genes. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 312, p. 196–207, 2017.

ULUSAN, A. et al. Surgical treatment of postintubation tracheal stenosis: A retrospective 22-patient series from a single center. **Asian Journal of Surgery**, v. 41, n. 4, p. 356–362, 2018.

WAIN, J. C. Postintubation Tracheal Stenosis. **Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 21, n. 3, p. 284–289, set. 2009.

WANG, M.; YUAN, Q.; XIE, L. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: Properties and clinical application. **Stem Cells International**, v. 2018, 2018.

WISNEWSKI, A. V et al. Reaction products of hexamethylene diisocyanate vapors with “self” molecules in the airways of rabbits exposed via tracheostomy. **Xenobiotica**, v. 48, n. 5, p. 488–497, 2018.

WU, Z. et al. Collagen type II: From biosynthesis to advanced biomaterials for cartilage engineering. **Biomaterials and Biosystems**, v. 4, n. November, 2021.

WURTZ, A. et al. Construction of a tube-shaped tracheal substitute using fascial flap-wrapped revascularized allogenic aorta. **European Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 41, n. 3, 2012.

XU, P. et al. **Decellularized extracellular matrix-based composite scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. Regenerative Biomaterials**Oxford University Press, , 2024.

YANG, H.; ATALA, A.; YOO, J. J. Kidney regeneration approaches for translation. **World Journal of Urology**, v. 38, n. 9, p. 2075–2079, 1 set. 2020.

YOON, S. BIN et al. Palliation of Postintubation Tracheal Stenosis Using Insulation-Tipped Diathermic Knife 2: A Case Report. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. 1, p. 90–92, 2016a.

YOON, S. BIN et al. Palliation of Postintubation Tracheal Stenosis Using Insulation-Tipped Diathermic Knife 2: A Case Report. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. 1, p. 90–92, 2016b.

YU, X. et al. Recent strategies of collagen-based biomaterials for cartilage repair: from structure cognition to function endowment. **Journal of Leather Science and Engineering**, v. 4, n. 1, 2022.

ZHANG, X. et al. **Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering**. **Bioactive Materials** KeAi Communications Co., , 1 abr. 2022.

ZHOU, H. et al. Mineral Distribution Spatially Patterns Bone Marrow Stromal Cell Behavior on Monolithic Bone Scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 112, p. 274–285, 1 ago. 2020.

ZHU, D. et al. **Insights into the use of genetically modified decellularized biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine**. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2022.

11. ANEXOS

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Este documento é um termo de consentimento livre e esclarecido, ele informa a você os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios sobre o estudo de pesquisa clínica no qual você está sendo convidada a participar. Você precisa ler, entender e assinar este termo de consentimento livre e esclarecido se concordar em participar deste estudo.

Eu _____
_____, RG nº _____, estou sendo convidada a participar de um estudo denominado: “Desenvolvimento de biomaterial a partir de placenta”, cujo objetivo é produzir enxertos a partir da placenta.

Sei que para o avanço da pesquisa a participação de voluntários é de fundamental importância. Caso aceite participar desta pesquisa eu doarei a minha placenta após o nascimento da minha criança assim como responderei a um questionário médico.

Entendo que a placenta é um órgão da gestação e que após o término do parto sofre descarte (jogada no lixo hospitalar) e não havendo prejuízo para a mãe e nem para o meu (minha) filho (a) recém-nascido (a).

Entendo que a placenta será utilizada para o estudo, portanto não apresentará fins lucrativos.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. A elaboração final dos dados será feita de maneira codificada, respeitando o imperativo ético da confidencialidade.

Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, sem sofrer qualquer dano.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho e o Doutorando em Biotecnologia, Julio César Francisco, com quem poderei manter contacto pelos telefones.

Estarão garantidas todas as informações que eu queira saber antes, durante e depois do estudo.

Li, portanto, este termo e fui orientada quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi todas as informações dadas, estou satisfeita com as informações recebidas, pude formular todas as perguntas convenientes e me foram esclarecidas todas as dúvidas. Concordo, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei e nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.

Assinatura da doadora da placenta

Pesquisador Responsável

Tel: (41) 3223-1689/ (41)3271-2617/ (41)9664-6070

Doutorando em Biotecnologia - UFPR

Tel: (41) 3339-9653 / (41) 8849-0662

Curitiba_____de _____de 2008.



Article

Decellularized Wharton's Jelly and Amniotic Membrane Demonstrate Potential Therapeutic Implants in Tracheal Defects in Rabbits

Aloysio Enck Neto ^{1,*}, Katia Martins Foltz ¹, Thiago Fuchs ², Luíze Kremer Gamba ¹, Marcos Antonio Denk ³, Paulo Cesar Lock Silveira ⁴, Thatyanne Gradowski do Nascimento ¹, Alice Machado Clemencia ⁴, Julio César Francisco ¹, Lucia de Noronha ¹ and Luiz César Guarita-Souza ¹

¹ Graduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba 80215-901, PR, Brazil; katia_foltz@hotmail.com (K.M.F.); luizekremer@hotmail.com (L.K.G.); thaty.gfr@gmail.com (T.G.d.N.); julio.apfr@gmail.com (J.C.F.); lino.noronha@gmail.com (L.d.N.); guaritasouza@hotmail.com (L.C.G.-S.)

² Veterinary Medicine Undergraduate Program, University of Contestado (UNC), Mafra 89300-000, SC, Brazil; thiago.fuchs@professor.unc.br

³ Biomedicine Undergraduate Program, School of Medicine and Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba 80215-901, PR, Brazil; slidesdenk@gmail.com

⁴ Program of Postgraduate in Science of Health, Laboratory of Experimental Physiopathology, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma 88806-000, SC, Brazil; psilveira@unesc.net (P.C.L.S.); alicemachadoclemencia@hotmail.com (A.M.C.)

* Correspondence: aloysioenck@gmail.com



Citation: Neto, A.E.; Foltz, K.M.; Fuchs, T.; Gamba, L.K.; Denk, M.A.; Silveira, P.C.L.; Nascimento, T.G.d.; Clemencia, A.M.; Francisco, J.C.; Noronha, L.d.; et al. Decellularized Wharton's Jelly and Amniotic Membrane Demonstrate Potential Therapeutic Implants in Tracheal Defects in Rabbits. *Life* 2024, 14, 782. <https://doi.org/10.3390/life14060782>

Academic Editor: Gerhard A. Holzapfel

Received: 22 May 2024

Revised: 12 June 2024

Accepted: 16 June 2024

Published: 20 June 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: Tracheal grafts have been investigated for over a century, aiming to replace various lesions. However, tracheal reconstruction surgery remains a challenge, primarily due to anatomical considerations, intraoperative airway management, the technical complexity of reconstruction, and the potential postoperative morbidity and mortality. Due to research development, the amniotic membrane (AM) and Wharton's Jelly (WJ) arise as alternatives within the new set of therapeutic alternatives. These structures hold significant therapeutic potential for tracheal defects. This study analyzed the capacity of tracheal tissue regeneration after 60 days of decellularized WJ and AM implantation in rabbits submitted to conventional tracheostomy. Methods: An in vivo experimental study was carried out using thirty rabbits separated into three groups (Control, AM, and WJ) (n = 10). The analyses were performed 60 days after surgery through immunohistochemistry. Results: Different immunomarkers related to scar regeneration, such as aggrecan, TGF- β 1, and α -SMA, were analyzed. However, they highlighted no significant difference between the groups. Collagen type I, III, and Aggrecan also showed no significant difference between the groups. Conclusions: Both scaffolds appeared to be excellent frameworks for tissue engineering, presenting biocompatibility and a desirable microenvironment for cell survival; however, they did not display histopathological benefits in trachea tissue regeneration.

Keywords: biomaterial; tissue engineering; scaffold

1. Introduction

Clinicians and engineers have investigated tracheal grafts for over 100 years to replace different lesions [1]. Tracheal reconstruction surgery is still a challenge due to anatomical considerations, intraoperative airway management, the technical complexity of reconstruction, and the potential postoperative morbidity and mortality [2]. Among the central pathologies observed, prolonged intubation is the leading cause of laryngotracheal stenosis, followed by neoplasms [3,4]. The treatment may depend on the localization and extent of the tracheal lesions [2].

Available prostheses often suffer from drawbacks like inflammation, inadequate integration with the host tissue, and extrusion. Moreover, they fail to emulate the properties of natural tissue [5]. In this way, tissue engineering has emerged as a promising technique for reconstructing long-segment tracheal injuries and restoring the trachea's structure and function [6]. To this end, researchers are exploring a decellularization method that maintains the trachea's original structure and offers mechanical strength and biocompatibility [7,8].

The ideal substitute for tracheal reconstruction needs to present good biocompatibility and tolerability, no local or systemic toxic effect, and the ability to generate growth factors and cytokines favorable to organ and tissue regeneration [9].

Due to the development of research in regenerative medicine, the amniotic membrane (AM) and Wharton's Jelly (WJ) arise as alternatives within the new therapeutic alternatives. These structures hold significant therapeutic potential for tracheal defects as they can serve as a substrate for tissue regeneration, effectively reducing undesirable scarring effects [9,10].

The AM is a biocompatible tissue with mechanical properties that make it a potential framework due to its stability, flexibility, and permeability. It can support cell migration, adhesion, and tissue development [11,12]. WJ is a gelatinous substance of connective tissue and mesenchymal cells, abundant in substances such as hyaluronic acid and some sulfated glycosaminoglycans immobilized in an insoluble network of collagen fibers [13]. WJ is a promising candidate for tissue-engineered trachea as it shares similarities with cartilage tissue in composition and function [14].

In previous studies, the use of decellularized structures has yielded promising results. For instance, a 2021 study demonstrated that the combination of bone marrow stem cells and decellularized human amniotic membrane, when tested in a heart failure model, showed potential for regenerating cardiac function [15]. Additionally, another study focused on the amniotic membrane revealed that including an anti-inflammatory molecule supported tissue regeneration in the trachea, leading to the development of immature cartilage and collagen formation, thereby preventing the reduction of the tracheal lumen [16]. Furthermore, research on using Wharton's jelly in tracheal regeneration found that implantation did not elicit adverse reactions such as rejection and extrusion [17].

The studies mentioned all focused on a decellularized biomaterial choice and shared the common limitation of not assessing a period longer than 35 days. In this way, in the current study, we analyzed the capacity of tracheal tissue regeneration after 60 days of decellularized Wharton's Jelly and amniotic membrane implantation in rabbits submitted to conventional tracheostomy.

2. Materials and Methods

This was an experimental, interventional, and randomized study with 30 male New Zealand rabbits with an average weight of 3.00–3.500 kg. The entire process was registered and approved by an ethics committee (registration 18/20) and followed all the guidelines of the Declaration of Helsinki.

The animals were housed in 80 cm³ cages, with only one animal per cage; the cages were air-conditioned with continuously adjustable temperature and exhaust air, under light/dark cycles (12/12 h). They were fed Funny Bunny Blend rabbit food with an approximate intake of 40 g/day per animal and water ad libitum.

The animals were randomly divided into three groups for analysis: Control Group (CTG) (n = 10): submitted to tracheostomy alone; Amniotic Membrane Group (AMG) (n = 10): submitted to tracheostomy and later implantation of AM at the tracheostomy site; Wharton's Jelly Group (WJG) (n = 10): submitted to tracheostomy and later implantation of WJ at the tracheostomy site (Figure 1).

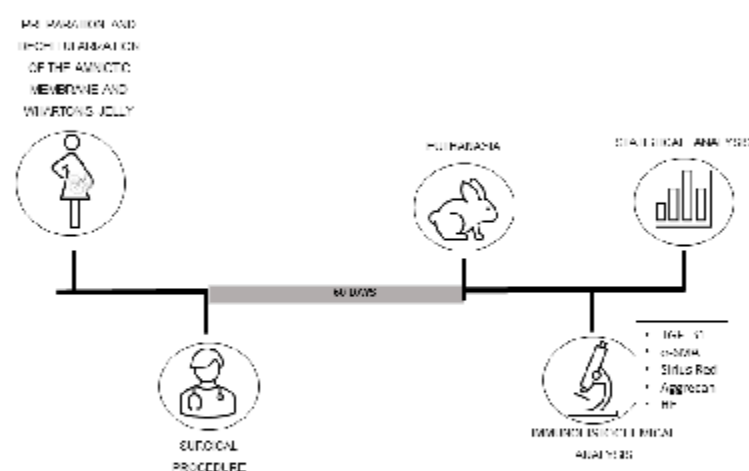


Figure 1. Experimental design.

2.1. Preparation of the Umbilical Cord

Two pregnant women ($n = 2$) with gestational age between 36 and 40 weeks who had a vaginal delivery were selected. After the mothers signed the free and informed consent form approved by the Research Ethics Committee of Hospital Pequeno Príncipe under number 948-11, the maternal donors were tested to be serologically negative for HIV, hepatitis B, hepatitis C, and syphilis. The donated umbilical cords were processed within six to twelve hours after the delivery.

2.2. Decellularization of the Amniotic Membrane and Wharton's Jelly

Decellularization was performed using an aseptic technique in a Class II BioSAFE (Veco®) biological. Thereafter, the sample was treated with chemical and mechanical processes using 0.01% SDS solution (sodium dodecyl sulfate) (Sigma Aldrich, Munich, Germany) and SD (sodium deoxycholate) (Sigma Aldrich, Munich, Germany) at 0.01% for 24 h at 37 °C in pH 7.2 saline phosphate buffer (PBS), with the aid of a stirrer mechanic (Shaking Table 109 M, Nova Ética Ltda, São Paulo, Brazil). Then, the sample was preserved in PBS (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) at 4 °C, according to the methodology described by Blume et al., 2021 [15].

2.3. Surgical Procedure

All surgical procedures on the animals were conducted under the effect of anesthetics. The animals were fasted for 6 h on food and 2 h on water. The animals were placed in dorsal decubitus with manual physical restraint. Two-lead electrocardiography monitoring and a 100% oxygen supply were then installed. Induction of anesthesia was carried out with aceprom at a dose of 0.75 mg/kg and ketamine at a dose of 35 mg/kg, both intramuscularly (IM). Five mg/kg Xylazine IM was used for muscle relaxation.

The surgery started with antisepsis of the cervical region with topical iodopolyvidone (PVPI), sterile drapes, local anesthesia with 2% lidocaine, without vasoconstrictor (dose of 1 mg/kg), waiting for a latency time of 5 min and respecting an effect time of 30 min. Median (longitudinal) cervicotomies were performed after dissecting the trachea, preserving its lateral portion, which is responsible for its vascularization.

At the time of surgery, tracheostomy was performed on the anterior portion of the trachea, resecting a rectangle (10 mm wide by 20 mm long) measured with a sterile ruler.

The membrane was washed in PBS containing antibiotics as well as antifungal (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin) and antimycotics (2.5 µg/mL amphotericin B) agents

to reduce the microbial load. Then, immediately afterward, the animals in the AMG underwent implantation of a portion of amniotic membrane over the tracheal defect created, and the WJ group underwent implantation of a piece of Wharton's Jelly over the tracheal defect created. A rectangular section of Wharton jelly, measuring 3×5 mm (15 mm^2), was applied over the tracheostomy.

The suture was supported by four repair stitches at the ends of the rectangle using a 4.0 needle polypropylene thread. After the suture was completed, pre-tracheal muscles were approximated by a continuous suture using a number 2.0 needle cotton thread.

The CTG animals only underwent tracheostomy, and the conduit was kept open for healing by the second intention. Subsequently, pre-tracheal muscles were approximated, and the subcutaneous cellular tissue and skin were closed (Figure 2).



Figure 2. Surgical procedure. In (A) Control group: only tracheostomy; in (B) Amniotic Membrane Group: implantation of a portion of amniotic membrane over the tracheostomy; in (C) Wharton's Jelly group: implantation of a portion of Wharton's Jelly over the tracheostomy.

Postoperative analgesia was carried out throughout the 60-day recovery and observation period, using carprofen at 4 mg/kg/day subcutaneously (SC) once a day for five days, as well as morphine at a dose of 2 to 5 mg/kg SC every 4/4 h during the surgical procedure and in the postoperative period as required.

Other postoperative care included prophylactic antibiotic therapy, dressings, and routine assessment of the surgical wound. For antibiotic therapy, Cephalexin was given at a dose of 15 mg/kg SC every 12 h for seven days.

2.4. Euthanasia

All the animals were euthanized after an observation period of 60 days. General anesthesia was performed in the operating room in the vivarium under the care of veterinarian Dr. T.F. (CRMV 5549) using aceprom, xylazine, and ketamine in the pre-determined doses, followed by an infusion of potassium chloride at a dose of 100 mg/kg intravenously (IV). Respiratory rate (RR) and heart rate (HR) were monitored until they were absent. The animals were removed by a company specializing in biological waste disposal (under the responsibility of GR Environmental Solutions).

2.5. Histopathology

For the histological study of the anatomopathological patterns of the animals, the lesion samples were placed in plastic containers and labeled; they contained 10% paraformaldehyde for 48 h and were sent to the experimental pathological anatomy laboratory at PUCPR to be processed using the paraffin embedding technique, were cut, and were stained.

The histological sections were stained with Sirius Red (Direct Red: Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, WI, USA) to evaluate the deposition of collagen I (mature) and III (immature) and Hematoxylin and Eosin (HE) (Harris Hematoxylin: NewProv, Cod. PA203, Paraná, Brazil; Eosin: BIOTEC Reagentes Analíticos, Cod. 4371, Paraná, Brazil) for histological evaluation at the site of the lesion.

The slides were photographed at a magnification 400 (high power field or HPF) under polarized light. The markers were evaluated using Image-Pro Plus 4.5 software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA), where the polarized areas were identified (red for mature collagen I or green for immature collagen III). The collagen I (mature) and III (immature) analysis values were expressed as a percentage per HPF.

2.6. Immunohistochemical Analysis

The immunohistochemistry test was preceded by preparing multi-sample paraffin-embedded tissue blocks, TMA (Tissue Microarray). The pieces were ready on slides stained with different α -SMA, TGF- β 1, and Aggrecan markers for the immunohistochemistry technique.

The immunohistochemistry technique begins with a protocol for incubating the primary antibodies in a humid chamber (at a temperature of between 2 and 8 °C, overnight) and using a secondary polymer (Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit-Micropolymer, Abcam, ab236466, Cambridge, UK) at room temperature. The technique was revealed by adding the 2, 3, diaminobenzidine complex + hydrogen peroxide substrate (Table 1). The reactivity of positive and negative controls confirmed the results. The slides were then scanned with a Zeiss Axioscan scanner (Jena, Germany) in high-power fields (HPFs; 20 $\times$ magnification).

Table 1. Antibodies description.

Antibody	Type	Clone	Dilution	Label
Anti- α -SMA	Monoclonal/Rato	BSB-15	1:600 pH 9	BioSB
Anti-TGF- β 1	Policlonal/Coelho	E11262	1:200	Spring
Anti-Aggrecan	Monoclonal/Rato	Ab3773 BC3	1:200	Abcam

2.7. Statistical Analysis

Quantitative results were represented using the mean and standard deviation. Statistical analysis of variance was carried out using ANOVA, followed by the Kruskal–Wallis test to compare the groups. Values where * $p < 0.05$ were considered significant. The analyses were carried out using the Graph Pad Prism 9.0 program (San Diego, CA, USA).

3. Results

The animals used in this study were separated into three groups (Control, Amniotic Membrane, and Wharton's Jelly), and all groups started this study with $n = 10$. However, during the analysis of the animal groups, there were losses due to infestation by Sarcoptic mange, where the animals were treated for 30 days with advokt (0.4 mL) and for behavioral stress.

Only the best tracheal segments from each group were chosen for the immunohistochemical analysis using HE staining. Slides with unreadable artifacts or cuts were excluded. In order to analyze the epithelial–mesenchymal transition and the arrangement of the extracellular matrix in healing wounds and scars, slides stained with α -SMA were used. Two images of each slide were taken, and a final percentage was generated based on these images. Statistical analysis was performed using the mean percentage for each group. The average percentage in the SMA CTG was 50.39% (SD $\pm$ 21.28); in the AMG, it was 47.43% (SD $\pm$ 21.79); and in the WJG, it was 71.17% (SD $\pm$ 22.03). These results indicate that the use of decellularized Wharton's Jelly may lead to a higher percentage of an epithelial–mesenchymal transition and extracellular matrix arrangement, suggesting a more favorable environment for tissue regeneration. However, no significant difference was observed when comparing the groups, indicating that further research is needed to fully understand the implications of these findings (Figure 3).

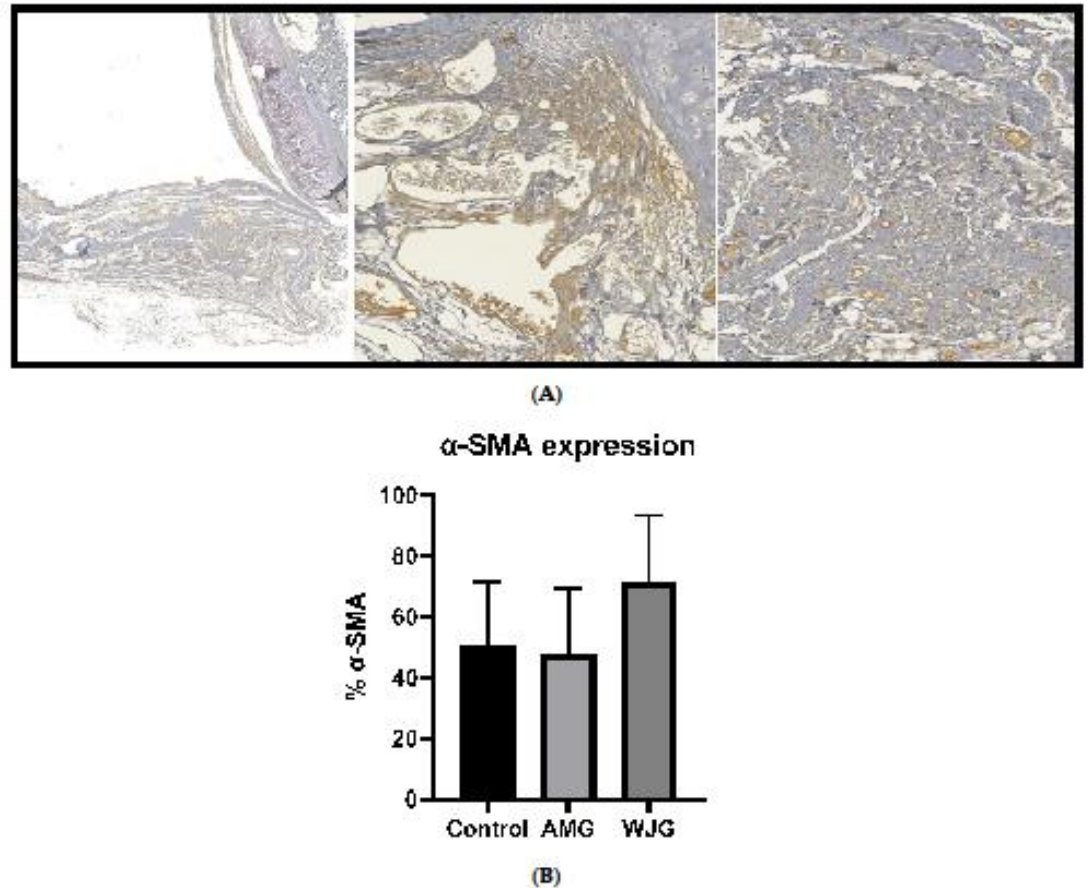


Figure 3. Expression of α -SMA marker in CTG, AMG, and WJG. Panel (A) displays the marker's expression in tracheal tissue. In Panel (B), the results are presented with mean and standard deviations. ANOVA test was followed by the Kruskal–Wallis test.

The same grouping was used to analyze the expression of TGF- β 1, a multifunctional cytokine that plays a crucial role in tissue recovery after injury. It was found that for the TGF- β CTG, the average was 41.94% (SD $\pm$ 19.04); for AMG, the average was 70.5% (SD $\pm$ 20.16); and for WJG, the average was 60.41% (SD $\pm$ 25.12). However, the groups displayed no significant differences (Figure 4).

In the analysis of cartilaginous proliferation in the tracheal tissues using the Anti-Aggregan antibody, the mean percentage for the Control group was 4.93% (SD $\pm$ 3.11); for the AMG, it was 3.52% (SD $\pm$ 3.14); and for the WJG, it was 7.052% (SD $\pm$ 3.44). No significant differences were observed between the groups (Figure 5).

This study checked the production of type I and III collagens. The results showed that for collagen I, the mean production percentage was 75.86% (SD $\pm$ 8.46) for the CTG, 66.87% (SD $\pm$ 12.48) for the AMG, and 74.86% (SD $\pm$ 6.83) for the WJG. However, there was no significant difference in the production of these collagens between the groups.

Similarly, for collagen III, the mean production percentage was 24.14% (SD $\pm$ 8.46) for the CTG, 33.13% (SD $\pm$ 12.48) for the AMG, and 25.14% (SD $\pm$ 6.83) for the WJG. Again, there was no significant difference in the production of collagen between the groups (Figure 6).

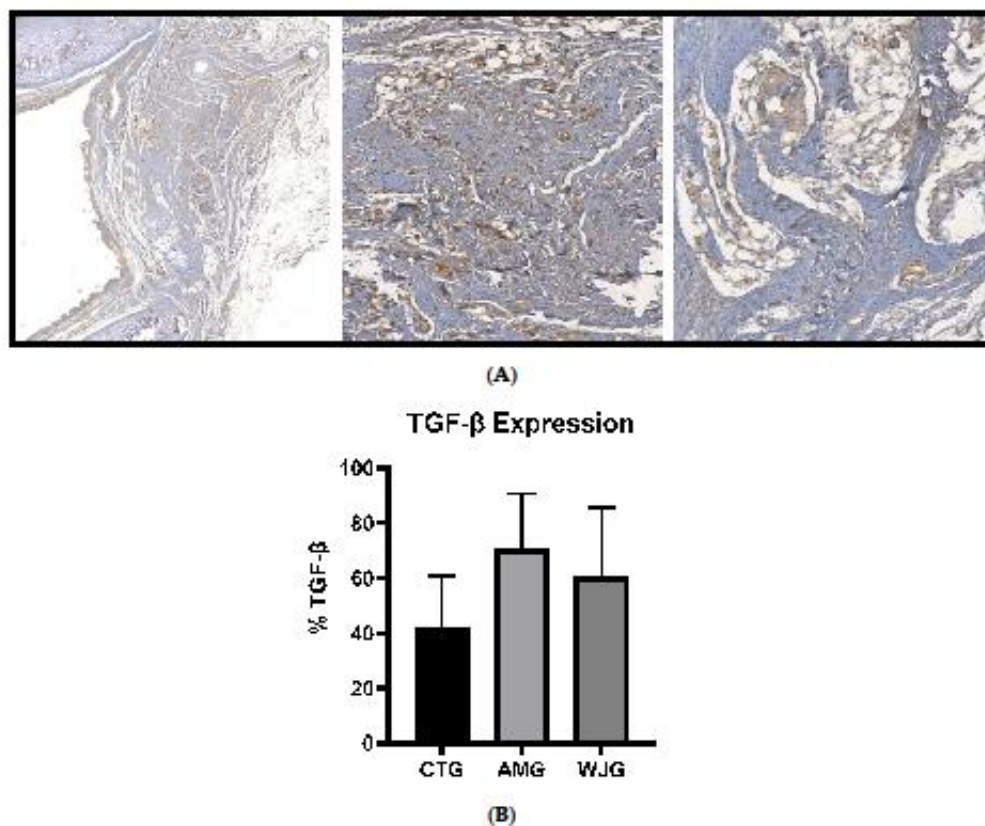


Figure 4. Analysis of TGF- β immunoreexpression in the three groups analyzed (CTG, AMG, and WJG). Part (A) displays the marker's expression in the tracheal tissue examined. Part (B) shows the results with mean and standard deviations. ANOVA test followed by Kruskal–Wallis test.

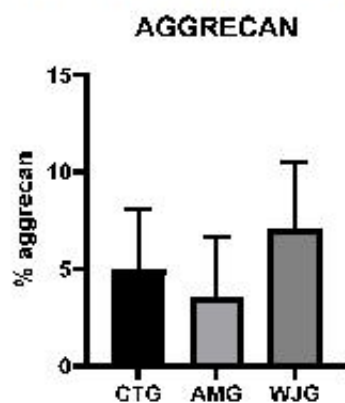


Figure 5. Immunoreexpression of Aggrecan was analyzed in three groups: CTG, AMG, and WJG. Results are presented as mean and standard deviation. ANOVA test followed by Kruskal–Wallis test.

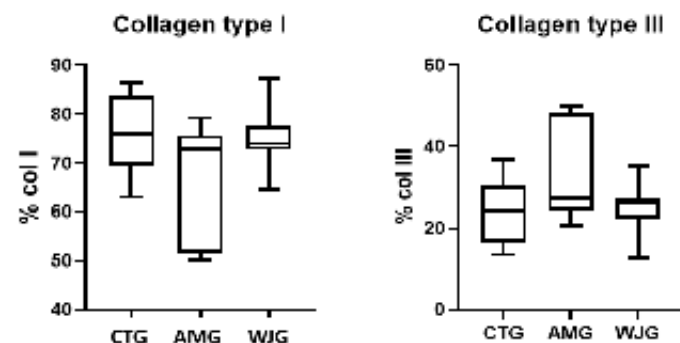


Figure 6. Analysis of collagens I and III in the three groups analyzed (CTG, AMG, and WJG). All the results were presented with mean and standard deviations. ANOVA test followed by Kruskal–Wallis test.

The perimeter and tracheal areas of the animals were also measured based on HE staining, which was utilized to evaluate measurements by analyzing the area and size of a defect. No statistical difference was observed between the groups in any of the variables (Table 2).

Table 2. Characterization of the rabbit population.

	Control Group (n = 7)	Wharton Jelly Group (n = 7)	Amniotic Membrane Group (n = 5)	p
Tracheal perimeter (μm^2)	15,389 $\pm$ 1961	15,562 $\pm$ 1390	15,257 $\pm$ 2210	>0.9
Tracheal area (μm^2) *	15,523,727 $\pm$ 4,086,295	14,712,626 $\pm$ 2,408,509	15,436,725 $\pm$ 4,217,003	>0.9

* Mean and standard deviation.

4. Discussion

Tracheal resection after an injury is considered a safe procedure. However, it still represents a significant challenge due to postoperative complications that can seriously affect patients' quality of life [8]. In this context, researchers have increasingly investigated decellularized tissue-based biological structures as an alternative for restoring the structure and function of the trachea after surgical procedures [5]. Different immunomarkers related to scar regeneration, such as aggrecan, TGF- β 1 and α -SMA, were analyzed to understand cell behavior in contact with the chosen structures. Both Wharton's Jelly and the amniotic membrane have proven to be excellent frameworks for tissue engineering, presenting biocompatibility and a desirable microenvironment for the survival of different cells.

The healing process, whether caused accidentally or surgically, involves several phases of tissue repair, such as coagulation, inflammation, proliferation, and remodeling. Dysregulation of one of these processes can lead to poor healing, such as excessive scarring [18]. Several processes are involved in the formation of these scars, such as abnormal cell proliferation, the transformation of fibroblasts in response to damage, the stimulation of cytokines such as TGF- β , and the regulation of genes such as α -SMA, which are involved in the extracellular matrix, as well as the production of collagen and fibronectin.

TGF- β is involved in several scar formation processes, such as promoting the synthesis of extracellular matrix (ECM) components, including collagen and fibroblast proliferation, as well as inducing fibroblast differentiation. It also participates in scar formation by regulating fibrosis and keratinocyte proliferation [19]. It is also considered a crucial mediator in tissue fibrosis and causes scar formation in tissues [20].

Another aspect to consider is the role of TGF- β 1 in the differentiation and activation of myofibroblasts, which induce the expression of α -SMA. The highest expression of α -

SMA was in the Wharton's Jelly group, but it displayed the lowest expression of TGF- β 1 compared to the control group. However, when comparing the same biomarker, the values are very close, which could be associated with the connection between the two markers. Despite the MAG displaying a higher expression of TGF- β 1, it did not show a higher expression of α -SMA.

The expression of α -SMA can be related to the wound's contraction power and the development of excessive fibrotic reactions that manifest as a "bad scar" [20]. The advantage of both analyzed structures is their three-dimensional structure, which allows perfusion and vascularization, enabling cell repopulation to occur at the injury site, allowing the tissue to regenerate correctly [6].

The main chemical components of cartilage are water, collagen, and proteoglycans [21]. Although type II collagen is the main constituent of cartilage tissue, cartilage engineering approaches are mainly based on type I collagen devices [22].

In the analysis of aggrecan, the largest proteoglycan found in cartilage [22], it was possible to observe that the WJG or AMG were similar to the control after 60 days of analysis. Foltz et al., 2022, in a similar study, which analyzed the properties of Wharton's Jelly for 30 days in rabbits after a tracheal injury, suggested that despite its various characteristics as a biomaterial, this structure did not present histopathological benefits for the regeneration of tracheal tissue. In this study, cartilage formation was evaluated using the same Aggrecan marker, where there was no significant difference between the control and the Wharton's Jelly groups over 30 days [17]. In another study, Simeoni et al. (2021) evaluated a decellularized amniotic membrane as a framework for tracheal lesions using mesenchymal stem cells, finding cartilaginous tissue through the formation of immature collagen in the regions of the tracheal defects after 60 days [23].

Type I and type III collagens participate directly in wound healing and tissue regeneration, with an increase in type III collagen synthesis during the initial phases and an increase in type I collagen synthesis during the final phases [24]. The remodeling process can occur from 3 weeks to 1 year after the injury [25]. During the proliferative phase, also known as the tissue regeneration phase, extracellular matrix replacement, angiogenesis, and epithelization occur, associating factors such as transforming growth factor- β (TGF- β) and components such as collagen III [26]. In the results obtained, the rates of type I collagen found were similar between the groups. As for type III collagen, there was a slight increase in the MA group, which may corroborate the suggestion that using biomaterials leads to a delayed healing process in the observed tissue. These results corroborate another study that used an amniotic membrane, which showed that, after 35 days, there was no difference between the group that used only the membrane and the group that used the membrane as well as an anti-inflammatory molecule [16].

Some of the challenges we faced included keeping the animals alive for a specific duration and the occasional loss of an animal. Additionally, we could only analyze the final 60 days of this study and we could not continually monitor the rates of the biomarkers under investigation. It would have been helpful to have markers that could be tracked throughout this study.

Different strategies can be used for tracheal regeneration—insemination of cells on an implanted scaffold, implantation of tissue grown *in vitro* on a scaffold, or scaffold implantation without cells to support tissue regeneration *in situ*—to allow the new tissue to grow and for it to present biological properties compatible with the implanted site [8].

Understanding the roles of various molecules involved in extracellular matrix (ECM) remodeling in tissue injury and regeneration is pivotal in evaluating frameworks for tracheal regeneration. This study thoroughly examined the formation of cartilaginous tissue over 60 days. The extended duration of this study offers a more comprehensive understanding of the potential of these structures in the regeneration of tracheal tissue. This study evaluated the ability of aggrecan to form an adequate cartilaginous matrix and type I and III collagens to support the regeneration and repair of tracheal tissue by assessing their strength and flexibility.

Moreover, it identified tissue remodeling activity correlated with reducing scarring and stenosis through smooth muscle actin (α -SMA). This study culminated in a microenvironment analysis to evaluate chronic inflammation and promote tissue reconstruction with TGF- β 1. These markers allowed for a robust understanding of implant behavior within the biological environment, thus substantiating their potential as a viable therapeutic modality for tracheal defect reconstructions.

5. Conclusions

Our research has shown promising results, with both frameworks demonstrating the potential to restore the mechanical characteristics of the trachea's extracellular matrix. These biomaterials provided the required support and environment to regulate the healing process of any remaining defects, thus preventing stenosis and maintaining the desired tracheal diameter. However, although they created a favorable microenvironment, they did not show significant histopathological benefits compared to natural tracheal regeneration.

However, there is still much to learn about the trachea's recovery process, pathophysiology, and the molecular mechanisms associated with recuperation post-injury, presenting exciting opportunities for further investigation.

Author Contributions: Conceptualization, A.E.N. and K.M.F.; data curation, A.E.N.; formal analysis, A.E.N. and L.d.N.; investigation, A.E.N. and Y.E.; methodology, A.E.N., K.M.F., Y.E. and J.C.F.; project administration, L.C.G.-S.; supervision, L.C.G.-S.; validation, A.E.N., L.K.G., M.A.D., P.C.L.S. and A.M.C.; visualization, A.E.N., Y.G.d.N., L.d.N. and L.C.G.-S.; writing—original draft preparation, A.E.N.; writing—review and editing, A.E.N., Y.G.d.N., L.d.N. and L.C.G.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the ethics committee of the University of Contestation (registration 18/20 and 14 December 2020).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Laboratory of Experimental Pathology, specially Seiho Nagashima and Caroline B. Vaz de Paula, for their contributions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Greaney, A.M.; Niklason, L.E. The History of Engineered Tracheal Replacements: Interpreting the Past and Guiding the Future. *Tissue Eng.-Part B Rev.* **2021**, *27*, 341–352. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Siciliani, A.; Rendina, E.A.; Ibrahim, M. State of the Art in Tracheal Surgery: A Brief Literature Review. *Multidiscip. Respir. Med.* **2018**, *13*, 34. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Kandakure, V.T.; Mishra, S.; Lahare, V.J. Management of Post-Traumatic Laryngotracheal Stenosis: Our Experience. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2015**, *67*, 255–260. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Palacios, J.M.; Bellido, D.A.; Valdivia, F.B.; Ampuero, P.A.; Figueroa, C.F.; Medina, C.; Cervera, J.E. Tracheal Stenosis as a Complication of Prolonged Intubation in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Patients: A Peruvian Cohort. *J. Thorac. Dis.* **2022**, *14*, 955–1008. [\[CrossRef\]](#)
5. Dhasmana, A.; Singh, A.; Rawal, S. Biomedical Grafts for Tracheal Tissue Repairing and Regeneration “Tracheal Tissue Engineering: An Overview”. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2020**, *14*, 653–672. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Lei, C.; Mei, S.; Zhou, C.; Xia, C. Decellularized Tracheal Scaffolds in Tracheal Reconstruction: An Evaluation of Different Techniques. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2021**, *19*, 1–13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Chiang, Y.; Pepper, V.; Best, C.; Onwuka, E.; Breuer, C.K. Clinical Translation of Tissue Engineered Trachea Grafts. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **2016**, *125*, 873–885. [\[CrossRef\]](#)
8. Damiano, G.; Palumbo, V.D.; Fazzotta, S.; Curione, F.; Lo Monte, G.; Brucato, V.M.B.; Lo Monte, A.I. Current Strategies for Tracheal Replacement: A Review. *Life* **2021**, *11*, 618. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

9. Marino, L.; Castaldi, M.A.; Rosamilio, R.; Ragni, E.; Vitolo, R.; Fulgione, C.; Castaldi, S.G.; Serio, B.; Bianco, R.; Guida, M.; et al. Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Int. J. Stem Cells* **2019**, *12*, 218–226. [\[CrossRef\]](#)
10. Porzionato, A.; Stocco, E.; Barbon, S.; Grandi, E.; Macchi, V.; De Caro, R. Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 4117. [\[CrossRef\]](#)
11. Fénelon, M.; Catros, S.; Meyer, C.; Fricain, J.C.; Obert, L.; Auber, E.; Louvriat, A.; Gindraux, E. Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. *Membranes* **2021**, *11*, 387. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Leal-Marín, S.; Kern, Y.; Hofmann, N.; Pogozhykh, O.; Framme, C.; Börgel, M.; Figueiredo, C.; Glasmacher, B.; Gryshkov, O. Human Amniotic Membrane: A Review on Tissue Engineering, Application, and Storage. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2021**, *109*, 1198–1215. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Arutyunyan, L.; Fatkhudinov, Y.; Sukhikh, G. Umbilical Cord Tissue Cryopreservation: A Short Review. *Stem Cell Res. Ther.* **2018**, *9*, 236. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Xu, Y.; Duan, L.; Li, Y.; She, Y.; Zhu, J.; Zhou, G.; Jiang, G.; Yang, Y. Nanofibrillar Decellularized Wharton's Jelly Matrix for Segmental Tracheal Repair. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30*, 1910067. [\[CrossRef\]](#)
15. Blume, G.G.; Machado-Junior, P.A.B.; Simeoni, R.B.; Bertinato, G.P.; Tonial, M.S.; Nagashima, S.; Pinho, R.A.; de Noronha, L.; Olandoski, M.; de Carvalho, K.A.T.; et al. Bone-Marrow Stem Cells and Acellular Human Amniotic Membrane in a Rat Model of Heart Failure. *Life* **2021**, *11*, 958. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Miggiolaro, A.F.R.S.; Takejima, A.L.; Francisco, J.C.; De Noronha, L.; Takejima, M.L.; Foltz, K.; Enck, A.; Yannous, L.; Simeoni, R.B.; Stricker, P.E.F.; et al. Tracheal Regeneration with Acellular Human Amniotic Membrane and 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin $_2$ Nanoparticles in a Rabbit Model. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2023**, *95*, e20220288. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Foltz, K.M.; Neto, A.E.; Francisco, J.C.; Simeoni, R.B.; Miggiolaro, A.F.R.D.S.; Do Nascimento, Y.G.; Mogharbel, B.F.; de Carvalho, K.A.T.; Faria-Neto, J.R.; de Noronha, L.; et al. Decellularized Wharton Jelly Implants Do Not Trigger Collagen and Cartilaginous Tissue Production in Tracheal Injury in Rabbits. *Life* **2022**, *12*, 942. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Landén, N.X.; Li, D.; Ståhle, M. Transition from Inflammation to Proliferation: A Critical Step during Wound Healing. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 3861–3885. [\[CrossRef\]](#)
19. Moon, J.; Yoon, J.Y.; Yang, J.H.; Kwon, H.H.; Min, S.; Suh, D.H. Atrophic Acne Scar: A Process from Altered Metabolism of Elastic Fibres and Collagen Fibres Based on Transforming Growth Factor- β 1 Signalling. *Br. J. Dermatol.* **2019**, *181*, 1226–1237. [\[CrossRef\]](#)
20. Hu, H.H.; Chen, D.Q.; Wang, Y.N.; Feng, Y.L.; Cao, G.; Vaziri, N.D.; Zhao, Y.Y. New Insights into TGF- β /Smad Signaling in Tissue Fibrosis. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *292*, 76–83. [\[CrossRef\]](#)
21. Yu, X.; Zhang, H.; Miao, Y.; Xiong, S.; Hu, Y. Recent Strategies of Collagen-Based Biomaterials for Cartilage Repair: From Structure Cognition to Function Endowment. *J. Leather Sci. Eng.* **2022**, *4*, 11. [\[CrossRef\]](#)
22. Wu, Z.; Kornrater, S.H.; Mullen, A.M.; Zeugolis, D.I. Collagen Type II: From Biosynthesis to Advanced Biomaterials for Cartilage Engineering. *Biomater. Biosyst.* **2021**, *4*, 100030. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Baggio Simeoni, P.R.; Simeoni, R.B.; Bispo Machado Junior, P.A.; de Almeida, M.B.; Dziedzic, D.S.M.; da Rosa, N.N.; Stricker, P.E.F.; Dos Santos Miggiolaro, A.F.R.; Naves, G.; Neto, N.B.; et al. Tracheal Repair with Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Differentiated in Chondrocytes Grown on an Acellular Amniotic Membrane: A Pre-Clinical Approach. *Life* **2021**, *11*, 879. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Singh, D.; Rai, V.; Agrawal, D.K. Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. *Cardiol. Cardiovasc. Med.* **2023**, *7*, 5–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Childs, D.R.; Murthy, A.S. Overview of Wound Healing and Management Wound Healing Management Skin Soft Tissue Injuries. *Surg. Clin. N. Am.* **2017**, *97*, 189–207. [\[CrossRef\]](#)
26. Mory, M.P.; Harmon, K.A.; Hess, R.; Dorafshar, A.H.; Shafikhani, S.H. An Updated Review of Hypertrophic Scarring. *Cells* **2023**, *12*, 678. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

12. APÊNDICE

Aprovação na Comissão de Ética no Uso e Experimentação de animais (CEUA) da Universidade do Contestado



Universidade
do Contestado

Universidade do Contestado – UnC
Comissão de Ética no Uso e Experimentação de Animais - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Capacidade de regeneração tecidual da traqueia após implante de geléia de wharton e da membrana amniótica em coelho submetidos à traqueostomia", registrada com o nº 18/20, sob a responsabilidade de Aloysio Enck Neto - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Contestado, em 14/12/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até dezembro de 2021
Espécie/linhagem/raça	<i>Oryctolagus cuniculus</i> / Coelhos / Nova Zelândia
Nº de animais	30
Peso/Idade	3-3,5kg / 1 ano
Sexo	Machos
Origem	Biotério de Criação e Manipulação de Animais da PUCPR

Canoinhas, 14 de dezembro de 2020.

Profª. Dra. Daniela Pedrassani
Coordenadora CEUA/UnC