



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DOUTORADO

NELSON BERGONSE NETO

**REGENERAÇÃO DO TECIDO TRAQUEAL EM DEFEITOS PARCIAIS
COM O USO DE SUBMUCOSA INTESTINAL SUÍNA**

CURITIBA

2018

NELSON BERGONSE NETO

**REGENERAÇÃO DO TECIDO TRAQUEAL EM DEFEITOS PARCIAIS
COM O USO DE SUBMUCOSA INTESTINAL SUÍNA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Luiz César Guarita-Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Júlio César Francisco

CURITIBA

2018

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Giovanna Carolina Massaneiro dos Santos – CRB 9/1911

Bergonse Neto, Nelson
B499r Regeneração do tecido traqueal em defeitos parciais com o uso de
2018 submucosa intestinal suína / Nelson Bergonse Neto ; orientador: Luiz César
Guarita de Souza ; co-orientador: Júlio Cesar Francisco. – 2018.
39 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,
2018
Bibliografia: f. 36-39

1. Ciências da saúde. 2. Pele - enxerto. 3. Regeneração tecidual guiada.
4. Neovascularização. I. Souza, Luiz César Guarita de. I. Francisco, Júlio
Cesar. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 22. ed. – 610



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 23 dias do mês de novembro de 2018 às 13hs e 00min., realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese “Regeneração do tecido traqueal em defeitos parciais com o uso de submucosa intestinal suína” apresentado por **Nelson Bergonse Neto** para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza – Presidente – (PUCPR)	
Prof. Dr. Cristina Pellegrino Baena – (PUCPR)	
Prof. Dr. Sergio Luiz Rocha (PUCPR)	
Prof. Dr. Marlus de Souza Coelho (HMC)	
Prof. Dr. Luiz Antônio Rivetti (SC/SP)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza Conceito APROVADO
Prof. Dra. Cristina Pellegrino Baena Conceito Aprovado
Prof. Dr. Sergio Luiz Rocha Conceito Aprovado
Prof. Dr. Marlus de Souza Coelho Conceito Aprovado
Prof. Dr. Luiz Antônio Rivetti Conceito Aprovado
Parecer Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela benção da vida e por me proporcionar a capacidade de superar as dificuldades e provações do dia a dia.

Aos meus pais, Nelson (*in memoriam*) e Márcia, que me amaram incondicionalmente com todos os meus defeitos, obrigado pelo exemplo de vida e pela educação.

À minha esposa, Patricia, que, embora não conste, é co-autora de todas as realizações da minha vida profissional e pessoal. Obrigado pelo amor, paciência e dedicação.

Aos meus filhos, Bernardo e Breno, que enchem minha vida de alegria e me estimulam a ser a cada dia uma pessoa melhor.

Ao meu irmão, Gilberto, que assumiu em parte minhas obrigações profissionais para que eu pudesse me dedicar à este trabalho.

À Dra. Lianna F. Jorge, Prof. Dr. Julio C. Francisco, Dra. Bruna O. Erbano, Dra. Barbara E. G. Barboza, Dra. Larissa L. G. Silva, Prof. Marcia Olandoski, Prof. Katherine A. T. Carvalho, Dr. Luiz F. P. Moreira, Prof. Dr. José R. Faria Neto e Dr. Eltyeb Abdelwahid, pela participação e co-autoria neste trabalho.

À equipe da técnica operatória da PUC/PR: Dra. Celina T. N. Duque, Sr. Douglas O. Santos e em especial ao amigo Misael Gomes Barbosa pela presteza e colaboração além do dever sem a qual este trabalho não seria possível.

Aos graduandos em medicina da PUC/PR: Amaury R. Sauvesuk, Mariana K. Prado, Raul N. Pigatto e Guilherme N. L. Alves, pela colaboração e comprometimento que trouxeram maior celeridade no desenvolvimento da pesquisa.

Às colegas Dilcele M. S. Dziedzic e Priscila E. Ferreira do Instituto Pelé Pequeno Príncipe que me guiaram com perfeição no maravilhoso mundo do cultivo e manipulação celular.

À Prof. Dra. Lucia Noronha e os funcionários Seigo Nagashima e Ana P. C. Matrins do laboratório de patologia da PUC/PR pela condução e auxílio na análise histopatológica deste trabalho.

Em especial meu muito obrigado ao meu orientador Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza pela oportunidade, orientação, confiança e amizade que tornaram possíveis conquistar mais esta vitória.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso deste trabalho e que por um lapso de memória eu tenha esquecido de citar os nomes. Minhas mais sinceras desculpas e profundo agradecimento.

RESUMO

Introdução: A correção cirúrgica de defeitos traqueais ainda é um procedimento complexo e desafiador. O tratamento padrão-ouro é a ressecção da lesão com anastomose término-terminal primária. Contudo, quando não passível de ser realizada, alternativas de tratamento devem ser consideradas. A submucosa de intestino delgado suíno (SIS) tem sido amplamente utilizada em várias áreas da medicina como enxerto, objetivando regeneração tecidual e bioengenharia. O objetivo desse estudo foi avaliar se enxertos SIS melhoram a regeneração tecidual da traqueia em um modelo experimental de traqueostomia em coelhos.

Método: Dezesseis coelhos foram randomizados em dois grupos. Animais no grupo controle foram submetidos somente à traqueostomia e animais no grupo SIS foram submetidos à traqueostomia e receberam enxertia de SIS que cobriu o defeito na traqueia. Os tecidos no local da traqueostomia foram examinados 60 dias após a cirurgia por meio de análise histológica com hematoxilina e eosina (H&E) e o perímetro e área do defeito também foram analisados com o software IMAGE PRO-PLUS® 4.5 (Media Cybernetics).

Resultados: As médias do perímetro e área dos defeitos após 60 dias da cirurgia foram menores nos animais do grupo SIS, apresentando perímetro 15.3% menor e área 21.8% menor que aqueles no grupo controle ($p = 0.034$ e $p = 0.151$, respectivamente). Análises histológicas do tecido nos animais do grupo SIS evidenciaram ilhas de cartilagem imatura, epitélio pseudoestratificado ciliado e tecido conjuntivo no local de enxertia em 54.5% dos animais ($p=0.018$), enquanto que não foi observada regeneração cartilaginosa no grupo controle.

Conclusões: Embora o enxerto traqueal de submucosa de intestino delgado suíno não tenha sido capaz de evitar a ocorrência de estenose em um modelo de lesão traqueal em coelhos, propiciou alterações notáveis, facilitando eficazmente a neovascularização, a re-epitelização e a neoformação de cartilagem imatura.

Palavras-chave: submucosa de intestino delgado suíno (SIS); enxertos; lesões traqueais; regeneração tecidual; neovascularização.

ABSTRACT

Background: Surgical correction of tracheal defects is still a complex and challenging procedure. The gold standard treatment is primary end-to-end anastomosis. However, when this is not possible, alternative treatments must be considered. The porcine small intestinal submucosa (SIS) has been widely used in many areas of medicine as graft material for bioengineering applications and to promote tissue regeneration. The aim of this study was to evaluate whether SIS grafts improved tracheal tissue regeneration in a rabbit model of experimental tracheostomy.

Methods: Sixteen rabbits were randomized into two groups. Animals in the control group underwent only surgical tracheostomy, while animals in the SIS group underwent surgical tracheostomy and received an SIS graft that covered the defect site. We examined tissues at the site of tracheostomy 60 days after surgery using histological analysis with hematoxylin and eosin (H&E) staining and analyzed the perimeter and area of the defect with IMAGE PRO-PLUS® 4.5 (Media Cybernetics).

Results: The average perimeter and area of the defects 60 days after surgery were smaller by 15.3% ($p = 0.034$) and 21.8% ($p = 0.151$), respectively, in animals in the SIS group than in those of the control group. Histological analysis revealed islands of immature cartilage, pseudostratified ciliated epithelium, and connective tissue at the site of SIS engraftment in 54.5% ($p = 0.018$) of the animals in the SIS group, while no cartilaginous regeneration was observed at the defect site in animals of the control group.

Conclusions: Although tracheal SIS engraftment could not prevent stenosis in a rabbit model of tracheal injury, it produced some remarkable changes, efficiently facilitating neovascularization, reepithelialization, and neof ormation of immature cartilage.

Keywords: porcine small intestinal submucosa (SIS); grafts; tracheal injuries; tissue regeneration; neovascularization.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA.....	15
3 OBJETIVO GERAL.....	16
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4 DESENVOLVIMENTO	17
4.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
4.2 ARTIGO PUBLICADO.....	27
Regeneration of Tracheal Tissue in Partial Defects Using Porcine	27
1 Introduction	27
2 Material and Methods.....	28
3 Results	30
4 Discussion.....	31
5 Conclusions.....	33
References.....	33
Declaration	35
Supplementary Materials.....	36
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 - Mucosa of the inverted intestinal segment isolated.....	28
Figure 2 - Trachea exposition with a 6x8 mm (48 mm ²) made with a scalpel.	28
Figure 3 - SIS group: implantation of the graft into the tracheal defect.....	29
Figure 4 - SIS group: defect covered by a rectangular graft supported by four points in the vertices with polypropylene 4.0.....	29
Figure 5 - Trachea removed two centimeters above the main carina.....	29
Figure 6 - Photograph of the macroscopic section of the tracheal defect to analyze the morphology of the tracheal lumen.	29
Figure 7 - Tracheal defect perimeters of the groups.....	30
Figure 8 - Tracheal defect areas of the groups.....	30
Figure 9 - Inflammatory cells: group comparison.....	31
Figure 10 - Fibrosis: group comparison.....	31
Figure 11 - Neovascularization: group comparison.	31
Figure 12 - Tissue regeneration: group comparison.....	31
Figure 13 - Control group without cartilaginous tissue regeneration (newly formed cartilage) at the site of the tracheal defect, H&E (100x): (a) mature cartilaginous tissue, (b) pseudostratified ciliated epithelium, (c) connective tissue, (d) blood vessels, (e) fibrosis, and (f) acute and chronic inflammatory tissue.	31
Figure 14 - Tissue regeneration in the SIS group with reepithelialization, neovascularization, and the newly formed cartilage, H&E (40x): (a) mature cartilaginous tissue, (b) pseudostratified ciliated epithelium, (c) connective tissue, (d) blood vessels, (e) immature cartilaginous tissue (newly formed cartilage), and (f) fibrosis.....	32
Figure 15 - SIS group with immature cartilaginous tissue at the site of the tracheal defect., H&E (400x): (a) immature cartilaginous tissue (newly formed cartilage), (b) mature cartilaginous tissue, (c) connective tissue, and (d) blood vessels.	32
Figure 16 - Tissue regeneration: group comparison.....	33
Figure 17 - Tissue regeneration type within the SIS group.....	33

LISTA DE TABELAS

Table 1: Tracheal defect perimeter: comparison between groups.....	30
Table 2: Tracheal defect area: comparison between groups.....	30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

bFGF – fator de crescimento fibroblástico básico.

CEUA – comite de ética no uso de animais.

CITOPAR – Centro de Citopatologia do Paraná.

cm – centímetro.

EDTA – ácido etilenodiaminotetra-acético.

EGF – fator de crescimento epidérmico.

HDTM: Hydrated Xenogenic Decellularized Tracheal Matrix – matriz traqueal xenogênica hidratada descelularizada.

H&E – hematoxilina e eosina.

InCor – Instituto do coração.

Kg – kilograma.

mg – miligrama.

mm – milímetro.

mm² – milímetro quadrado.

n – número da amostra.

p – nível descritivo ou probabilidade de significância.

[P(CL/LA)] – copolímero esponja com fibra de ácido poliglicólico, gelatina hidrogel e

PGA – ácido poliglicólico.

fator de crescimento.

PUCPR – Pontificia Universidade Católica do Paraná.

SD – desoxicolato de sódio.

SDS – duodecil sulfato de sódio.

SEMS – stents metálicos auto-expansível.

SIS – submucosa de intestino delgado suíno.

TGF β 1 – fator de transformação do crescimento beta 1.

T^m – trade mark.

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular.

1 INTRODUÇÃO

Há mais de 2 séculos a traquéia vem sendo estudada através de diversas pesquisas experimentais e clínicas (GRILLO, 2002). Tal interesse neste “órgão”, que para os menos informados pode não passar de um simples tubo cartilaginoso, deve-se ao risco eminente de morte que suas patologias podem promover através da obstrução do fluxo aéreo e evolução para insuficiência respiratória.

Os defeitos traqueais podem ocorrer devido a várias anormalidades adquiridas e congênitas, destacando-se entre elas: complicações decorrentes de intubação, traumas, neoplasias primárias ou por envolvimento secundário, tuberculose, blastomicose, atresias congênitas e causas idiopáticas, entre outras (KASHIWA et al., 2009).

Apesar de sua aparência simples de um tubo conectivo com anéis cartilagosos, a traqueia é constituída de tecidos altamente especializados que conferem rigidez e suporte, revestimento longitudinal e cobertura epitelial funcional (KLIN et al., 2007; FUJIWARA; NISHINO; NUMAJIRI, 2009). Esses tecidos são altamente reativos às lesões induzindo a proliferação de células subjacentes ao iniciar um processo de cicatrização que pode culminar com a formação de uma cicatriz importante que diminuirá o lúmen, assim como a passagem de ar, ocasionando a estenose da traqueia (OKUMUS et al., 2007). Além disso, nessas situações não há nenhuma proliferação ou regeneração da cartilagem, podendo promover a perda de sustentação da parede do órgão conhecida como traqueomalácia - que se comporta semelhante à estenose (OKUMUS et al., 2007).

Devido a essa complexa estrutura, o tratamento de defeitos traqueais e a regeneração efetiva após lesão tornam-se uma meta de difícil alcance (KAMIL et al., 2004; OKUMUS et al., 2005).

No século passado, devido à aparente simplicidade da substituição traqueal, várias tentativas de reparo cirúrgico utilizando condutos tubulares orgânicos e artificiais foram encorajadas, demonstrando, infelizmente, complicações graves - como infecção, extrusão, obstrução, estenose e rejeição crônica -, associadas ao uso de órteses e próteses traqueais ainda presentes nos dias atuais (GRILLO, 2002).

As opções terapêuticas para reconstrução traqueal dependem do tamanho

do defeito (GRILLO, 2002; HALLERS et al., 2004). Em casos de lesões, sabe-se que a traqueia pode ter seu comprimento reduzido, no máximo, pela metade em adultos e aproximadamente a 1/3 em crianças (TSUKADA et al., 2010). O tratamento padrão-ouro é a anastomose término-terminal primária (PARK et al., 2012; HE et al., 2009; PARK et al., 2000). Contudo, quando os defeitos excedem esses limites, terapias alternativas devem ser consideradas.

Novas tecnologias na área da engenharia de tecidos vêm sendo propostas para assistir a regeneração da traqueia. Embora diversos biomateriais autólogos e heterólogos tenham sido usados na reparação de lesões traqueais, a maioria não se mostrou eficaz ou confiável, especialmente para o manejo de lesões traqueais a longo-termo (BUTLER; BIRCHALL; GIANGRECO, 2012; DU et al., 2012; NOMOTO et al., 2013; BENDERS, 2013; RICH; GULLANE, 2012).

A submucosa do intestino delgado suíno (SIS) tem sido usada amplamente em várias áreas da medicina como material de enxerto, incluindo reconstrução da bexiga e uretra, substituição de valvas cardíacas, reparo de defeitos diafragmáticos e da parede abdominal, entre outros, todos com resultados encorajadores (RICH; GULLANE, 2012; CAKAMAK et al., 2010; POULOSE et al., 2005; LIM et al., 2013). Diversos estudos demonstraram a habilidade da SIS em promover re-epitelização e completa infiltração de células mesenquimais, com crescimento de neovascularização (OKUMUS et al., 2007; GUBBELS et al., 2006).

A cirurgia corretiva das lesões traqueais continua a ser um procedimento desafiador devido a várias complicações potenciais, tais como infecções, potencial formação de fístula e necrose tecidual (BAIGUERA; D'INNOCENZO; MACCHIARINI, 2011).

Considerando as dificuldades encontradas no processo de reconstrução traqueal e na capacidade da SIS em promover regeneração tecidual, esse estudo teve por objetivo avaliar se enxertos de SIS são capazes de melhorar a regeneração tecidual da traqueia em um modelo experimental de lesão traqueal em coelhos.

2 JUSTIFICATIVA

Esse trabalho tem como justificativa colaborar com o desenvolvimento de um material orgânico heterólogo que possa ser utilizado para a reconstrução de defeitos traqueais quando, devido à extensão, as técnicas cirúrgicas convencionais já consagradas na literatura não se fizerem adequadas, seja pela alta incidência de complicações relacionadas aos procedimentos cirúrgicos ou pelas dificuldades de auto-regeneração tecidual.

Para tanto, aproveitando as qualidades de regeneração tecidual da SIS, a mesma será utilizada no tratamento de defeitos traqueais em um modelo experimental de traqueostomia em coelhos.

3 OBJETIVO GERAL

Analisar a capacidade de regeneração tecidual da traqueia após o implante de submucosa de intestino delgado suíno em coelhos submetidos à traqueostomia.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a presença de novos tecidos cartilagosos, epitélio pseudoestratificado ciliado e vasos sanguíneos no local previamente submetido ao implante da SIS, sessenta dias pós traqueostomia;
- Comparar o perímetro e a área das traqueias no local da traqueostomia do grupo submetido ao implante de SIS com o seu grupo controle, após sessenta dias.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 REVISÃO DA LITERATURA

Durante as últimas décadas, esforços na reconstrução traqueal têm sido realizados visando tratar uma variedade de doenças benignas e malignas (HALLERS et al., 2004; RAMOS et al., 2014), como tumores, traumas, infecções, defeitos congênitos e até mesmo as lesões mais comuns causadas por traqueostomia e intubação (PARK et al., 2012; ZHANG et al., 2007). Por mais que a maioria das lesões traqueais possam ser tratadas com ressecção e anastomose primária, lesões que não permitem tal terapêutica permanecem um desafio na prática médica (GRILLO, 2002; OKUMUS et al., 2007; TSUKADA et al., 2010).

O propósito principal do tratamento das lesões traqueais é a reorganização e substituição do tecido lesado por um tecido viável, seja ele a própria traqueia do paciente ou através de técnicas de implante e transplante. O procedimento tem como objetivo crucial a manutenção da patência da via aérea.

A redução do calibre da traqueia, na dependência de sua severidade, é uma condição potencialmente fatal devido a sua possível evolução para insuficiência respiratória. A intubação endotraqueal e a traqueostomia são as causas mais comuns de estenose traqueal e estão frequentemente presentes nas unidades de cuidados intensivos, apesar das melhorias no projeto e gestão de tubos com balonetes de alto volume e baixa pressão (KASHIWA et al., 2009).

As estenoses traqueais pós-intubação se originam em mais de 90% dos adultos pela isquemia e a necrose da mucosa e da cartilagem traqueal, secundária à interrupção de fluxo vascular pela compressão do balonete de alta pressão de uma cânula naso ou orotraqueal, ou de uma traqueostomia sobre estas estruturas. Em crianças, onde 95% das estenoses são subglóticas, a isquemia e a necrose ocorrem pelo contato da superfície externa do tubo na laringe; portanto estão relacionadas com o diâmetro do tubo. Além da lesão isquêmica, há também uma resposta anormal do tecido, produzindo uma maior quantidade de fibrose (SAAD-JUNIOR et al., 2011).

Atualmente, em pacientes sintomáticos de estenose traqueal, o tratamento padrão-ouro é a ressecção cirúrgica com anastomose traqueal término-terminal (KASHIWA et al., 2009).

Nesse cenário, em condições ideais, ressecções podem ser feitas até o limite de

50% do comprimento da traquéia no adulto e até 66% do comprimento da traquéia na criança (KASHIWA et al., 2009; TSUKADA et al., 2010). Existem algumas técnicas cirúrgicas que podem ser usadas e, em alguns casos, são essenciais para que se consiga realizar a anastomose término-terminal em ressecções maiores. Elas são denominadas manobras de relaxamento traqueal e as mais utilizadas são: a liberação da parede traqueal anterior, a liberação da traquéia a partir do esôfago, a liberação da musculatura supra-laríngea, a secção dos cornos laterais do osso Hióide, a secção dos ligamentos pulmonares, a liberação dos hilos pulmonares a partir da pleura menistinal e do pericárdio, e re-implante do brônquio principal direito no brônquio principal esquerdo (SHIELDS; LOCICERO; PONN, 2000).

Infelizmente, apesar de toda a variedade de técnicas existentes para possibilitar o tratamento do defeito com anastomose traqueal término-terminal, em alguns casos esta modalidade terapêutica acaba sendo contraindicada.

Uma vez que as opções terapêuticas para reconstrução traqueal dependem da extensão da lesão (GRILLO, 2002; HALLERS et al., 2004), a causa mais comum da impossibilidade do tratamento cirúrgico padrão são lesões muito extensas da traquéia. Outras causas são inflamação, condições respiratórias de difícil controle, insuficiências cardíacas ou problemas neurológicos, falta de condições clínicas do paciente, alta taxa de complicações cirúrgicas que as manobras de relaxamento traqueal podem induzir, presença de doenças neoplásicas malignas e recidiva do defeito após tratamento cirúrgico com ressecção prévia (KASHIWA et al., 2009).

Nos casos não passíveis de tratamento cirúrgico, atualmente utiliza-se o implante de Stents para o tratamento de estreitamentos traqueais sintomáticos (KASHIWA et al., 2009) - lembrando que, nesses casos, é obrigatório não ser uma obstrução traqueal completa, ou seja, haver algum grau remanescente de abertura da luz traqueal.

Os Stents implantáveis na traqueia utilizados atualmente são os de silicone em "T" ou tubulares endoluminais e os metálicos auto-expansíveis - sendo esses últimos reservados para pacientes com expectativa de vida limitada, como em neoplasias malignas (KASHIWA et al., 2009).

Apesar de serem a opção atual para a substituição do tratamento cirúrgico dos defeitos traqueais, estes Stents não eliminam o tecido doente, não promovem a regeneração traqueal e ainda atuam como corpos estranhos no interior da traqueia. Assim, estão sujeitos a diversas complicações, sendo a migração, a formação de

tecido de granulação e as infecções recorrentes por colonização dos Stents, as mais comuns.

Charokopos et al. (2011) avaliaram 11 pacientes com estenose traqueal pós entubação que foram submetidos a implante de Stents metálicos auto-expansíveis (SEMS). Segundo os autores, a aplicação da SEMS em estenoses traqueais pós entubação resultou em uma melhora imediata dos sintomas obstrutivos sem complicações peri-operatórias significativas. Entretanto, apresentou riscos potenciais de migração e de formação de tecido de granulação no final do Stent. Desta forma, os autores sugeriram que os SEMS fossem aplicados apenas em pacientes rigorosamente selecionados com estenose traqueal pós entubação que são considerados impróprios para a realização de cirurgia corretiva com anastomose término-terminal e com expectativa de vida limitada (TATEKAWA et al., 2010).

Uma área ativa de investigação envolve o uso de Stents absorvíveis para reconstrução traqueal. O uso deste Stent intraluminal apresenta múltiplos problemas, tanto no modelo experimental quanto na sua aplicação clínica. No entanto, os Stents absorvíveis são projetados para serem colocados internamente (intraluminal) ou externamente e evitam a necessidade de remoção posterior do Stent. Um estudo utilizou placas bioabsorvíveis de Lactosorb para reconstrução traqueal a partir de um modelo suíno com uma incisão na parede traqueal anterior vertical de 5 anéis. Eles descobriram que o Stent foi absorvido com formação mínima de cicatriz ou tecido de granulação quando colocado externamente, embora a taxa de mortalidade nesse grupo tenha sido de 33% (PEARSON et al., 2001).

Visto que o tratamento ideal com ressecção da lesão e anastomose término-terminal não é factível para todos os pacientes com lesão traqueal e que a utilização de Stents, apesar de ter ótimos resultados à curto prazo, apresenta complicações que o tornam impróprio para o uso à longo prazo, já há algumas décadas iniciou-se a procura pelo material ideal para substituir a traqueia.

Um estudo realizado por Tatekawa et al. (2010) retirou um segmento circunferencial de 50mm de comprimento da traqueia e um homoenxerto de aorta de 60mm foi então implantado através de anastomoses proximais e distais com os cotos da traqueia. Um Stent de 70mm foi utilizado dentro do homoenxerto, com o objetivo de dar suporte ao órgão durante o desenvolvimento celular. Entretanto, quando o stent foi retirado, identificaram-se sinais de insuficiência respiratória (por obstrução traqueal). Os autores sugeriram que os homoenxertos aórticos frescos

parecem impróprios para substituição traqueal primária (TATEKAWA et al., 2010).

A traqueia é constituída de tecidos altamente especializados que conferem rigidez e suporte, revestimento longitudinal e cobertura epitelial funcional (KLIN et al., 2007; FUJIWARA; NISHINO; NUMAJIRI, 2009). Como já afirmou Hermes C. Grillo (2002), a traquéia é um órgão de forma tubular com propriedades rígidas em sua porção lateral e flexível na sua porção longitudinal. Portanto, todos os esforços para sua correção deveriam observar essa característica particular (GRILLO, 2002). Devido à esta complexa estrutura, o tratamento de defeitos traqueais e a regeneração efetiva após lesão tornam-se uma meta de difícil alcance KAMIL et al., 2004; OKUMUS et al., 2005).

O material ideal para substituir a parede traqueal deve ser hermético, rígido o suficiente para evitar colapso, deve ter flexibilidade longitudinal, ser revestido com tecido epitelial e ser altamente vascularizado para prevenir infecções e permitir cicatrização (WURTZ et al., 2013).

Dentre as pesquisas com materiais substitutivos da traqueia, existem vários estudos na literatura, todos com pontos favoráveis e desfavoráveis, destacando-se os exemplos a seguir.

A utilização de dois materiais compostos de copolímeros: um copolímero [P(CL/LA)] esponja reforçada com malha de fibra de ácido poliglicólico (PGA) e outros dois incorporando gelatina hidrogel com e sem fator de crescimento para correção de uma lesão de 4mm X 10mm na parede anterior da traqueia. Os implantes foram realizados e os resultados sugeriram que a gelatina revestida retardou a epitelização da traqueia por causa de sua fragilidade. Além disso, o copolímero bioabsorvível implantado induziu uma imunorreação com a migração de células inflamatórias para esses materiais implantados (TSUKADA et al., 2010).

Outro experimento utilizou cães, nos quais foram realizados implantes de matriz extracelular da traqueia do porco (HDTM: Hydrated Xenogenic Decellularized Tracheal Matrix—matriz traqueal xenogênica hidratada descelularizada) com enxertos de 20mm a 30mm de comprimento em defeitos criados nas traqueias. Este estudo sugeriu que o HDTM manteve características mecânicas necessárias para a função nas condições sob carga fisiológica, mesmo depois de oito semanas após o implante. Os enxertos proporcionaram o desenvolvimento do epitélio colunar pseudoestratificado ciliado, mas com relação as estruturas de cartilagem, identificaram-se evidências de degradação e limitação na formação de novo tecido

cartilaginoso (REMLINGER et al., 2010).

Em um estudo clínico realizado em pacientes com defeitos traqueais de 12mm a 23mm de comprimento, três deles apresentavam defeitos após a traqueostomia (60%), um após entubação (20%) e um com lesão traumática (20%). Realizou-se um retalho axial crondromuscular preliminar em duas etapas, incluindo o músculo esterno-hióideo como uma camada receptora bem vascularizada e um enxerto de cartilagem auricular como tecido doador. Esse estudo sugeriu outra forma de reconstrução traqueal, utilizando tecido do próprio paciente, embora causando cicatrizes em outros locais, assim como focos de potencial infecção. Após um ano de seguimento, a função traqueal se recuperou completamente. Uma imagem endoscópica demonstrou recuperação do epitélio três meses após a cirurgia. Segundo os autores, esse método parece ser confiável, porque a vascularização muscular permitiu uma sobrevida viável da prótese auricular, as características biomecânicas dos tecidos substituídos foram semelhantes aos tecidos traqueais nativos, a fase de epitelização regenerativa foi produzida espontaneamente, e desta forma o uso de material alogênico foi evitado (GUERRISSI; GUERRISSI; MIRANDA, 2009).

Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado a viabilidade de substituição traqueal por aortas alogênicas com Stent de silicone. Em ensaios clínicos, no entanto, estes enxertos não apresentaram regeneração de cartilagem madura, como foi observado em modelos animais. Para resolver esse problema, investigou-se a substituição traqueal por um enxerto composto com base em uma porção de aorta alogênica com apoio de anel cartilaginoso externo em um modelo de coelho. No grupo de coelhos submetidos à substituição traqueal os resultados anatômicos foram caracterizados por uma discrepância entre a gravidade das lesões isquêmicas envolvendo aorta alogênica, anéis de cartilagem e características satisfatórias biomecânicas da prótese em sete dos dez animais, provavelmente devido aos depósitos de calcificação de cartilagem associados com cicatrizes inflamatórias garantindo a rigidez da construção (WURTZ et al., 2012).

Quanto à possibilidade de transplante traqueal, dez coelhos adultos masculinos, na Nova Zelândia, foram randomizados em dois grupos de cinco animais e submetidos à ressecção traqueal de três anéis. Os animais do grupo I foram submetidos à anastomose término-terminal. Os segmentos ressecados foram transplantados para os coelhos de grupo II. Os animais foram sacrificados no

vigésimo dia pós-operatório, e as traqueais foram removidas. O diâmetro lateral e ântero-posterior do lúmen foram medidos e calculou-se a área de secção transversal no local da anastomose. O objetivo da análise histopatológica foi identificar alterações inflamatórias, fibrose e estenose. Secreções e aderências fibróticas foram insignificantes e mais comuns no grupo II, mas o grau de fibrose e inflamação foi o mesmo. Nos animais do grupo II, houve uma rejeição leve. Ambos os procedimentos causaram uma redução significativa nos diâmetros traqueais ($p < 0.05$). A área de secção transversal foi reduzida significativamente em ambos os grupos. Entretanto, estas reduções foram consideradas como normais. Nem toda estenose provocou manifestações clínicas. Segundo os autores, quando a área de secção transversal é reduzida em até 75% da original, não existem sinais clínicos e sintomas (CAKMAK et al., 2010). Em humanos, uma diminuição do lúmen traqueal de até 40% pode ser aceitável sem comprometer a dinâmica respiratória (RAMOS et al., 2014).

Os estudos descritos anteriormente enfatizam a dificuldade do tratamento dos defeitos traqueais, principalmente no que se refere à regeneração tecidual, apesar de constituírem trabalhos bem elaborados.

Frente a esse panorama onde a substituição tecidual da traqueia com Dacron, poliuretano, retalhos de cartilagem costal e de orelha, aloenxerto de aorta, dentre outros (FUJIWARA; NISHINO; NUMAJIRI, 2009; WURTZ et al., 2012), demonstraram resultados insatisfatórios, a engenharia de tecidos vem ganhando importância cada vez maior no intuito de criação e confecção de novos materiais mais próximos dos nativos que possam substituir e proporcionar a regeneração dos tecidos traqueais (SAAD-JUNIOR et al., 2011). O conceito da engenharia tecidual é baseado na ressemeadura celular *in vitro* de estruturas biológicas ou artificiais (TUDORACHE et al., 2007).

Membranas biológicas atualmente estão sendo consideradas as melhores opções para realizar essas reconstruções, visto que elas oferecem o arcabouço para a re-epitelização do defeito e proliferação do tecido cartilaginoso, por meio de fatores de regeneração que facilitam o crescimento da matriz celular do tecido hospedeiro (KLIN et al., 2007; GUBBELS et al., 2006).

O emprego de membranas biológicas tem se expandido para diversas áreas da medicina, como na criação de curativos cirúrgicos, bem como na reconstrução da cavidade oral, bexiga, timpanoplastia, artroplastia, onfalocele, cirurgias oftalmológicas e também na prevenção de adesão tecidual em cirurgias da cabeça,

abdômen, pelve, vagina e de laringe por apresentar capacidade em reforçar a cicatrização, epitelização de feridas, grande potencial de absorção e elevada biocompatibilidade (OKUMUS et al., 2007; KIM; TSENG, 1995).

Muito tem sido pesquisado no intuito de se encontrar uma estratégia que crie uma prótese biocompatível e resistente à longo prazo. Evidências anteriores apontam que a descelularização em biomateriais torna o tecido menos antigênico, induzindo menor resposta inflamatória e menor degeneração tecidual (COSTA et al., 2005).

Um processo de descelularização implicaria na remoção completa de componentes celulares e simultânea manutenção da matriz extracelular com mínima influencia na matriz de montagem. Se a matriz celular diminui a imunogenicidade do enxerto, é esperado que uma ótima preservação dos componentes da matriz extracelular resultaria na manutenção das propriedades biomecânicas da estrutura (BENDERS et al., 2013).

Associado à vantagem que a descelularização propicia de redução da imunogenicidade do enxerto, não há necessidade de instituição de imunossupressão, o que poderia desencadear um processo com maior risco de infecção (TSUKADA et al., 2010).

Tudorache et al. (2007) publicaram um estudo comparando três diferentes protocolos de descelularização das valvas pulmonares porcinas e as suas influências nas propriedades morfológicas e biomecânicas. Utilizaram separadamente desoxicolato de sódio (SD) a 1%, duodecil sulfato de sódio (SDS) a 1%, tripsina a 0,05%, ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) a 0,02%. Os autores verificaram que a integridade morfológica e biomecânica, assim como a preservação das proteínas da matriz extracelular, foram claramente superiores nos grupos tratados com os detergentes, enquanto que o grupo tratado com enzima resultou em destruição da membrana basal.

Relatos na literatura descrevem que o processo de descelularização não remove os fatores de crescimento intrínsecos e outras proteínas funcionais que propiciam o alinhamento das fibras de colágeno mantendo a força de estrutura, responsáveis pela regeneração celular no local do implante (COSTA et al., 2005).

O processo ideal de descelularização deve remover todas as células e antígenos celulares mantendo todos os fatores de crescimento e proliferação celular que residem na matriz. Chun et al. (2007) utilizaram a submucosa de bexiga

completamente descelularizada por diversas lavagens com detergentes e agentes enzimáticos e asseguraram que fatores de crescimento importantes, tais como VEGF, TGF β 1, bFGF e EGF, permanecem presentes no tecido descelularizado.

A utilização de matrizes extracelulares descelularizadas que não sejam provenientes de cartilagem, apresentou-se vantajoso, pois é possível desenvolver modelos padronizados de enxertos que podem ser estabelecidos com novos tecidos: mais fáceis de serem obtidos, com maior volume e com características ainda não descobertas (IWASA et al., 2009).

A submucosa do intestino delgado suíno (SIS) é uma membrana xenogênica, classificada como material biodegradável, já que possui características que permitem seu uso como biomaterial (ABRAHAM et al., 2000; VOYTIK-HARBIN, 1997). Tem sido usada amplamente em várias áreas da medicina como material de enxerto, incluindo reconstrução da bexiga e uretra, substituição de valvas cardíacas, reparo de defeitos diafragmáticos e da parede abdominal, entre outros, todos com resultados encorajadores (RICH; GULLANE, 2012; CAKAMAK et al., 2010; POULOSE et al., 2005; LIM et al., 2013). Diversos estudos demonstraram a habilidade da SIS em promover re-epitelização e completa infiltração de células mesenquimais, com crescimento de neovascularização (OKUMUS et al., 2007; KAMIL et al., 2004; OKUMUS et al., 2005; HALLERS et al., 2004; TSUKADA et al., 2010; PARK et al., 2012; HE et al., 2009; PARK et al., 2000; BUTLER; BIRCHALL; GIANGRECO, 2012; DU et al., 2012; NOMOTO et al., 2013; BENDERS, 2013; RICH; GULLANE, 2012; CAKAMAK et al., 2010; POULOSE et al., 2005; LIM et al., 2013; RAMOS et al., 2014; ZHANG et al., 2007; gubbels et al., 2006).

Uma das formas de obtenção da SIS é a partir da ressecção do segmento proximal do jejuno de porcos saudáveis. O mesentério é removido, o segmento intestinal é invertido e a mucosa removida por raspagem. Após reversão do segmento invertido, o extrato seromuscular é removido da mesma maneira. O tecido resultante, constituído pela camada submucosa do intestino delgado, é lavado em solução salina isotônica e armazenado em uma solução de sulfato de neomicina à 10%. Descontaminação e descelularização são realizadas com solução salina e detergentes biológicos, usando um shaker (Bureau 109M, New Ethics Ltda.) por 24 horas (GRECA et al., 2001; SENIOR, 1999).

Atualmente já existe no mercado uma versão industrializada da SIS, conhecida como Surgisis[™] (Cook Biotech). O produto é biocompatível, acelular, matriz com

base em colágeno derivada de submucosa de intestino delgado porcino. Surgisis[™] tem sido usado clinicamente para reparos/reconstrução de defeitos na parede abdominal e torácica, hérnias diafragmáticas, prolapso de tecidos, assoalho pélvico, e bexiga (CLARKE et al., 1996; VECCHIA, 1999). Surgisis[™], como um substituto para enxertos autólogos, tem a vantagem de evitar morbidade ao sítio doador e eliminar o tempo operatório requerido para retirada de enxertos e mobilização de tecidos.

A SIS tem demonstrado resultados superiores a outros materiais à base de colágeno, graças à sua estrutura tri-dimensional e à presença de glicoproteínas, proteoglicanas, glicosaminoglicanas, colágeno, fibronectina, fatores de crescimento vascular e fibroblastos. Esses componentes naturais podem promover interação entre as células hospedeiras e o material, criando múltiplas adesões celulares (ABRAHAM et al., 2000). A combinação desses fatores promove migração, interação da matriz celular, diferenciação celular e crescimento - todos processos essenciais para a regeneração tecidual (VOYTIK-HARBIN et al., 1997; BADYLAK, 1989). Efeitos sinérgicos entre fatores de crescimento podem ainda aumentar os efeitos biológicos além daquele de um único fator isolado.

A Imunogenicidade é de fundamental importância ao se usar enxertos xenogênicos. Como já mencionado, a maioria das pesquisas afirmam que a SIS é acelular e não carrega informação imunológica. Estudos *in vivo* com a utilização de enxertos de SIS demonstraram a presença de células inflamatórias no local da enxertia, mas sem sinais de necrose, levando à confirmação da propriedade antigênica e ausência de rejeição ao material (LIM et al., 2013; GUBBELS et al., 2006).

Um estudo para a avaliação da regeneração miocárdica após implantação de SIS no ventrículo esquerdo de animais identificou células endoteliais e vasos sanguíneos na SIS implantada. Isso confirma a capacidade da membrana de formar novos vasos, que se estabeleceram tanto na zona de transição entre a SIS e o miocárdio, quanto na parte interna da membrana implantada. A presença de novos vasos sanguíneos, novas fibras musculares lisas e cardiomiócitos em ambas as zonas de transição e no corpo da SIS, sugeriu a regeneração angiomuscular, o que suporta a hipótese de regeneração do tecido cardíaco (RAMOS et al., 2014). Poulouse et al. (2005) já haviam descrito previamente a presença de neovascularização em veia cava de porcos tratados com enxertia SIS. Um detalhe importante desse estudo foi o

espessamento da SIS observado no momento da eutanásia sem calcificação, sugerindo bioatividade, ou seja, a membrana cresce junto ao coração, integrando-se ao tecido hospedeiro (RAMOS et al., 2014), como já sugerido anteriormente por Cayan et al (2002).

Acredita-se que a falta de uma camada epitelial intacta seja um fator crítico envolvido na formação de cicatriz e consequente estenose (KANZAKI et al., 2006). A linha epitelial intacta é de grande importância, uma vez que impede o crescimento do tecido de granulação, o que pode levar à obstrução fatal das vias aéreas. Se o epitélio não cobrir o tecido de granulação, o crescimento do tecido de granulação torna-se profuso e obstrui o lúmen traqueal. Gubbels et al. (2006) demonstraram a capacidade da SIS de permitir uma completa epitelização e infiltração de células mesenquimais com o crescimento de uma rede microvascular robusta. Em um modelo em roedores, Surgisis[™] foi usado para reparo de estenoses traqueais letais; observando-se completa epitelização do reparo traqueal por células colunares ciliadas (UGARTE et al., 2003).

SIS contém fatores de crescimento funcionais que são favoráveis ao processo de regeneração vital (VOYTIK-HARBIN et al., 1997). Também tem se mostrado ser não imunogênico, como evidenciado pela sua performance em mais de 1000 transplantes entre espécies, sem evidência de rejeição e com testes formais de desafio imunogênico diretos sem desencadear resposta significativa (ALLMAN et al., 2001). Além disso, o SIS induz inflamação moderada que facilita a neovascularização. A epitelização do SIS com células ciliadas sugeriram potencial para clearance normal de secreções e risco reduzido para aspiração ou bronquites (ALLMAN et al., 2001). A ocorrência desse nível de interação tecidual suporta a utilidade do SIS como enxerto para regeneração tecidual (KG; HUTMACHER, 2006).

Nesse cenário, a submucosa de intestino delgado suína surge como um tecido biodegradável, capaz de servir como suporte para remodelamento tecidual (PARK et al., 2012; NOMOTO et al., 2013). Ela tem sido amplamente usada em diversas áreas da medicina, com resultados satisfatórios na regeneração de aorta, veia cava, ligamentos, pele e outros (GRILLO, 2002). As características da SIS, combinadas com sua propriedade antigênica, aparentemente tornam a SIS uma versátil e eficiente opção que parece substituir, apropriadamente, o tecido traqueal.

4.2 ARTIGO PUBLICADO

Hindawi
Stem Cells International
Volume 2018, Article ID 5102630, 8 pages
<https://doi.org/10.1155/2018/5102630>

*Research Article*

Regeneration of Tracheal Tissue in Partial Defects Using Porcine Small Intestinal Submucosa

Nelson Bergonse Neto ¹, **Lianna Ferrari Jorge**,¹ **Julio C. Francisco**,¹
Bruna Olandoski Urbano,¹ **Barbara Evelin Gonçalves Barboza**,¹
Larissa Luvison Gomes da Silva,² **Marcia Olandoski**,¹
Katherine Athayde Teixeira de Carvalho,³ **Luiz Felipe Pinho Moreira**,⁴
Jose Rocha Faria Neto ¹, **Eltyeb Abdelwahid** ⁵, and **Luiz Cesar Guarita-Souza** ¹

¹Experimental Laboratory of Institute of Biological and Health Sciences of Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição 1155, 80215-901 Curitiba, PR, Brazil

²Center of Cytopathology of Paraná (CITOPAR), Av. Sete de Setembro 5426, 80240-220 Curitiba, PR, Brazil

³Cell Therapy and Biotechnology in Regenerative Medicine Research Group, Pelé Pequeno Príncipe Institute, Avenida Silva Jardim 1632, 80250-200 Curitiba, PR, Brazil

⁴Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, LM, 11 São Paulo, SP, Brazil

⁵Feinberg School of Medicine, Feinberg Cardiovascular Research Institute, Northwestern University, 303 E. Chicago Ave., Chicago, IL 60611, USA

Correspondence should be addressed to Nelson Bergonse Neto; nelson.bergonse@gmail.com

Academic Editor: Celeste Scotti

Copyright © 2018 Nelson Bergonse Neto et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Surgical correction of tracheal defects is a complex procedure when the gold standard treatment with primary end-to-end anastomosis is not possible. An alternative treatment may be the use of porcine small intestinal submucosa (SIS). It has been used as graft material for bioengineering applications and to promote tissue regeneration. The aim of this study was to evaluate whether SIS grafts improved tracheal tissue regeneration in a rabbit model of experimental tracheostomy. **Methods.** Sixteen rabbits were randomized into two groups. Animals in the control group underwent only surgical tracheostomy, while animals in the SIS group underwent surgical tracheostomy with an SIS graft covering the defect. We examined tissues at the site of tracheostomy 60 days after surgery using histological analysis with hematoxylin and eosin (H&E) staining and analyzed the perimeter and area of the defect with Image-Pro® PLUS 4.5 (Media Cybernetics). **Results.** The average perimeter and area of the defects were smaller by 15.3% ($p = 0.034$) and 21.8% ($p = 0.151$), respectively, in the SIS group than in the control group. Histological analysis revealed immature cartilage, pseudostratified ciliated epithelium, and connective tissue in 54.5% ($p = 0.018$) of the SIS group, while no cartilaginous regeneration was observed in the control group. **Conclusions.** Although tracheal SIS engraftment could not prevent stenosis in a rabbit model of tracheal injury, it produced some remarkable changes, efficiently facilitating neovascularization, reepithelialization, and neoformation of immature cartilage.

1. Introduction

The trachea is composed of highly specialized tissues, which confer rigid support, longitudinal coating, and a functional epithelial covering [1, 2]. As a result of this complex

structure, the treatment of tracheal defects and effective regeneration following injury are difficult [3, 4].

Tracheal defects are caused by various acquired and congenital abnormalities, including trauma, tuberculosis, cancer, and idiopathic causes [5]. Corrective surgery for

tracheal lesions remains a challenging procedure due to various potential complications, such as the formation of fistulae and tissue necrosis [6].

Treatment options for tracheal reconstruction depend on the defect size [7, 8]. It is known that the trachea, in cases of injury, can have its length reduced by half in adults and by about one third in young children [9]. The gold standard treatment is end-to-end primary anastomosis [10–12]. However, when defects exceed these limits, alternative treatments must be considered.

New technologies based on tissue engineering approaches have been proposed to assist regeneration of the trachea. Although diverse autologous and heterologous biomaterials have been used to repair tracheal lesions, most are neither effective nor reliable, especially for the long-term management of tracheal defects [13–17]. Porcine small intestinal submucosa (SIS) has been widely used in many areas of medicine as a graft material, including bladder and urethra reconstruction, heart valve replacement, diaphragmatic defect, and abdominal wall repair, amongst others, all of them with encouraging results [17–20]. Several studies have demonstrated SIS's ability to promote reepithelialization and complete infiltration of mesenchymal cells with new vascular growth [21–24].

Considering the difficulties encountered in the tracheal reconstruction process and the capacity of SIS to promote tissue regeneration, we carried out this study to evaluate whether SIS grafts could improve tissue regeneration of the trachea in a rabbit model of experimental tracheostomy.

2. Material and Methods

This is an experimental, interventional, and randomized study with 16 New Zealand white rabbits. Animals were randomly divided into two groups: the control group, which underwent only tracheostomy ($n=8$), and the SIS group ($n=8$), which underwent tracheostomy followed by SIS graft implantation at the tracheal defect site. The experiments were performed according to Law 6.638, May 8, 1979—Standards for the Practice, Teaching and Scientific Practice of Animal Vivisection. This project was presented to CEUA (Committee of Ethics in Research in Animal Use of the PUCPR) and approved under article number 640 (Annex 1).

2.1. Preparation of Porcine Small Intestinal Submucosa (SIS) Grafts. The SIS was obtained from a slaughterhouse. A segment of jejunum 20 cm from the duodenal-jejunal flexure was removed from recently sacrificed, healthy pigs. Subsequently, the mesentery was removed from the jejunal segment. The intestinal segment was inverted by exposing the mucosa, which was removed by scraping with a bistoury. After reinversion of the tissue, the seromuscular layer was removed by the same procedure, leaving only the jejunal submucosa (Figure 1). The SIS was washed in 0.9% isotonic saline solution (JP/Equiplex) and stored in 10% neomycin sulfate solution. Decontamination was performed with 8% chlorine dioxide saline solution (Veromax 80®, Veros Chemical) at a dilution of 0.04% using a shaker (109M



FIGURE 1: Mucosa of the inverted intestinal segment isolated.



FIGURE 2: Trachea exposition with a 6×8 mm (48 mm^2) defect made with a scalpel.

Bureau, New Ethics) for 24 hours [20]. The ultimate preparation was that of an acellular, decontaminated, porcine small intestinal submucosa composed of structural proteins, like collagen and elastin; glycoproteins (fibronectin and laminin); glycosaminoglycans and proteoglycans (hyaluronan, heparan sulfate, heparin, and dermatan sulfate); and matricellular proteins (thrombospondins, osteopontin, and tenascins).

2.2. Tracheostomy and Tracheal Reconstruction. The study included sixteen New Zealand male rabbits, with an average weight of 6 kg (± 0.5 kg) and was conducted in the laboratory of experimental surgical technique of PUCPR.

The animals were anesthetized with xylazine (10 mg/kg), ketamine (20 mg/kg), acepromazine maleate (0.05 mg/kg), and propofol (5 mg/kg), and they were treated with the prophylactic antibiotic (gentamicin sulfate 5 mg/kg) intravenously. The necks of the rabbits were shaved and disinfected with 10% povidone-iodine and 70% ethanol in preparation for surgical tracheostomy. Local anesthesia was conducted with 1 mL of lidocaine hydrochloride (2%) immediately before the skin incision. A vertical incision was made at the neck, and the strap muscles were divided along the midline. After fully exposing the trachea, a 6×8 mm (48 mm^2) tracheal defect was excised with a scalpel (Figure 2). In the SIS group, the defect was covered with a rectangular SIS graft supported at the four vertices and continuously sutured with polypropylene 4.0 (Figures 3 and 4). The strap muscles were replaced and reinforced over the graft, and the skin was sutured. In the animals of the control group, the tracheal defect was kept open and left to heal by secondary intention. The strap muscles were replaced and reinforced over the defect, and the skin was sutured.

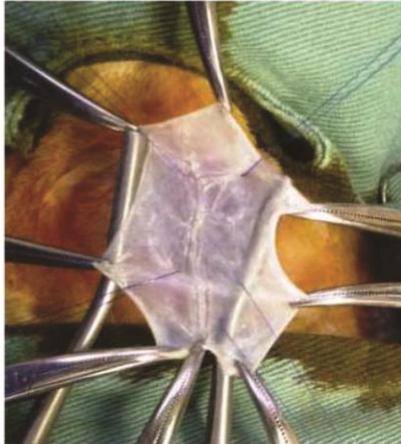


FIGURE 3: SIS group: implantation of the graft into the tracheal defect.

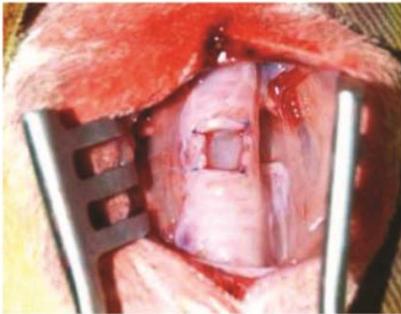


FIGURE 4: SIS group: defect covered by a rectangular graft supported by four points in the vertices with polypropylene 4.0.

Following surgery, rabbits were administered carprofen (2.2 mg/kg) for postoperative analgesia for three days.

Sixty days after undergoing surgical tracheostomy, rabbits were sedated and euthanized by intravenous administration of an overdose of pentobarbital (100 mg/kg).

The trachea of each animal was dissected from two centimeters above the main carina and removed for histopathological analysis (Figure 5). The tracheas were fixed with 10% formaldehyde for 72 hours. Dehydration of the samples was performed by successive baths of alcohol (concentrations of 70%, 80%, and 90%) and three baths of 100% ethanol for 1 hour. Following dehydration, the samples were embedded in liquid paraffin using two baths at 65°C in the same equipment. After cooling, histological sections were taken by means of a microtome (Leica model RM 2145, Solms, Germany).

2.3. Analysis of Perimeter and Area of the Tracheal Defects. Tracheal sections were macroscopically photographed to analyze the morphology of the tracheal lumen after surgery. The perimeters and areas of tracheal lumens in the defect



FIGURE 5: Trachea removed two centimeters above the main carina.



FIGURE 6: Photograph of the macroscopic section of the tracheal defect to analyze the morphology of the tracheal lumen.

regions of all sections were measured using Image-Pro PLUS 4.5 (Media Cybernetics) (Figure 6). In order to avoid differential operator bias, the same individual measured the variables three times, and the average values were taken for analysis. All photographs were taken with the same parameters, and a numerical scale was added to evaluate the defect dimensions in millimeters and square millimeters.

The results of the measurements of circumference and area of the defects were calculated as mean, median, minimum, maximum, and standard deviation values. Student's *t*-test for independent samples was used to compare between groups. Qualitative variables were compared using the Fisher exact test. *p* values < 0.05 were considered statistically significant. Data were analyzed with IBM SPSS Statistics V20 software.

TABLE 1: Tracheal defect perimeter: comparison between groups.

Group	<i>n</i>	Mean, mm	Median, mm	Minimum, mm	Maximum, mm	Standard deviation	<i>p</i> value
Control	8	1.703	1.697	1.342	2.005	0.229	
SIS	8	1.443	1.405	1.147	1.827	0.215	0.034

Student's *t*-test for independent samples, $p < 0.05$.

TABLE 2: Tracheal defect area: comparison between groups.

Group	<i>n</i>	Mean, mm ²	Median, mm ²	Minimum, mm ²	Maximum, mm ²	Standard deviation	<i>p</i> value
Control	8	0.151	0.151	0.090	0.197	0.039	
SIS	8	0.118	0.109	0.060	0.211	0.047	0.151

Student's *t*-test for independent samples, $p < 0.05$.

2.4. Histological Analysis. Histological sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined by light microscopy for identification of inflammatory reaction, fibrosis, neovascularization, and the presence of tissue regeneration characterized by evidence of reepithelialization and formation of new islands of cartilage.

Tissue regeneration was classified as present or absent. Other variables were also classified as present or absent. However, the present groups have also been divided into discreet, moderate, or severe presence for future analysis. The Fisher exact test was used to compare qualitative variables between the experimental groups. p values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Defect Perimeter and Area. Following a recovery period of 60 days, the average perimeter and area of the tracheal defects in control and SIS group animals were measured and compared (Tables 1 and 2; Figures 7 and 8). The average perimeter of the tracheal defect in the SIS group was 15.3% smaller than that of the control group, and the difference was statistically significant ($p = 0.035$). Similarly, the average area of the tracheal defect in the SIS group was 21.8% smaller than that in the control group, but this decrease was not statistically significant ($p = 0.151$).

3.2. Histological Analysis. The presence of inflammatory tissue, fibrosis, neovascularization, and tissue regeneration in the tracheal defect of control and SIS group animals was compared.

Although inflammatory cells were observed at the site of the graft in 54.5% of the SIS group animals as against 12.5% of the control group animals, the difference was not statistically significant ($p = 0.147$) (Figure 9). Necrosis was not observed.

There were also no statistically significant differences in fibrosis or neovascularization, although they were preferentially observed in the SIS group [9.09% against 0.0% ($p = 1.000$) and 27.27% against 12.5% ($p = 0.603$), resp.] (Figures 10 and 11). The SIS group presented evidence for the growth of new vessels in 3 of 8 animals.

A statistically significant difference in the presence of regenerated tissue was observed between the groups

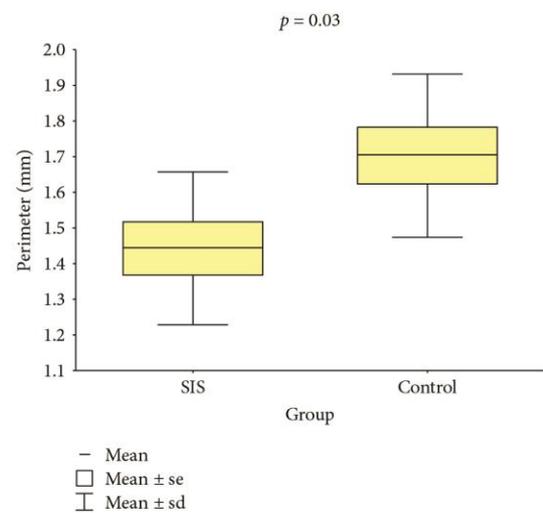


FIGURE 7: Tracheal defect perimeters of the groups.

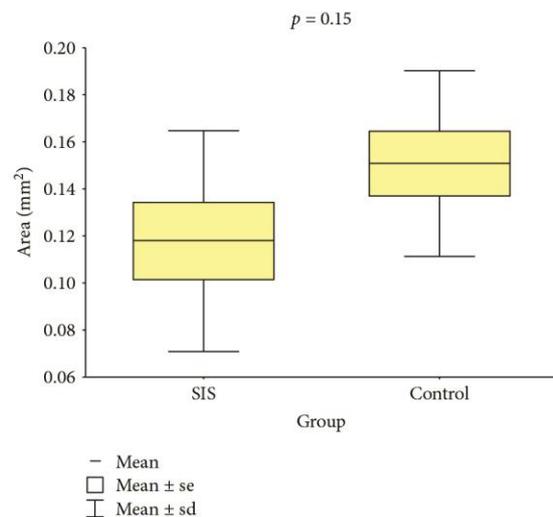


FIGURE 8: Tracheal defect areas of the groups.

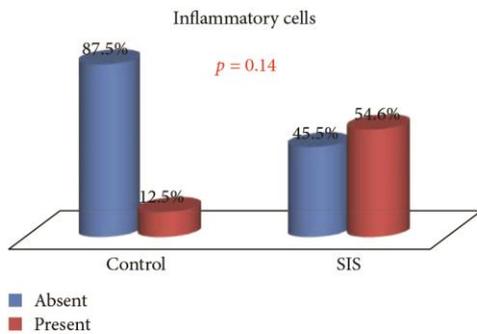


FIGURE 9: Inflammatory cells: group comparison.

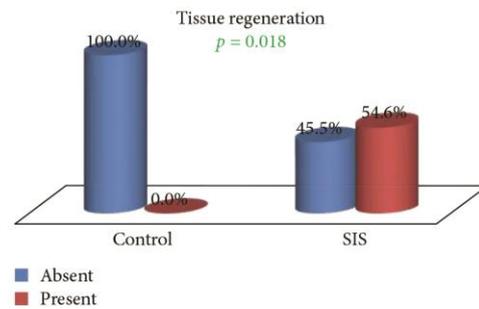


FIGURE 12: Tissue regeneration: group comparison.

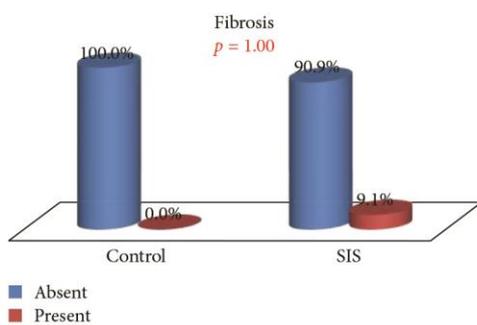


FIGURE 10: Fibrosis: group comparison.

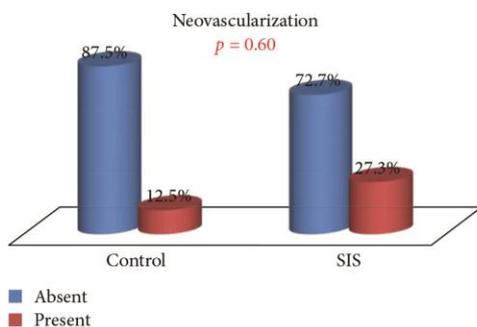


FIGURE 11: Neovascularization: group comparison.

($p = 0.018$) (Figure 12). In the control group, there was no detectable tissue regeneration in any of the samples, while in the SIS group, reepithelialization and newly formed cartilage were observed in 54.5% of the cases (Figures 13–17).

4. Discussion

Although most tracheal lesions can be treated with resection and primary anastomosis, defects that do not allow such treatment remain a challenge in medical practice [8, 9, 17, 20, 25]. During the last few decades, efforts in tracheal reconstruction have been aimed at treating a variety of malignant and benign diseases [7, 26] such as

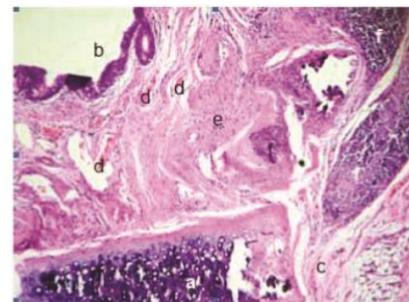


FIGURE 13: Control group without cartilaginous tissue regeneration (newly formed cartilage) at the site of the tracheal defect, H&E (100x): (a) mature cartilaginous tissue, (b) pseudostratified ciliated epithelium, (c) connective tissue, (d) blood vessels, (e) fibrosis, and (f) acute and chronic inflammatory tissue.

tumors, trauma, infections, birth defects, and the most common injuries caused by tracheostomy and tracheal intubation [10, 14, 17]. Biological membranes are considered the best option to perform these reconstructions as they provide a scaffold for reepithelialization of the defect and proliferation of cartilage tissue through regeneration factors, which promote the cellular matrix growth of the host tissue [1, 17, 20, 24, 27].

The ideal material for replacing the tracheal wall must be airtight, hard, longitudinally flexible, coated with epithelial tissue, and highly vascularized to prevent infection and to allow healing [28]. There are many materials available for tissue replacement, for example, Dacron®, polyurethane, costal and ear cartilage flaps, and allograft aorta [2, 5, 17, 20]. However, they present many complications, such as infection, extrusion, obstruction, stenosis, and chronic graft rejection [12, 17, 20, 29]. Alternative possibilities, discussed by Grillo [30], are the use of synthetic structures such as stents, which have two distinct disadvantages: Correction of the lesion is permanently prevented, and severe complications may develop from the stent. Removable silicone stents also hinder curative treatment and may induce granulation, especially in the subglottic region. However, granulation is sometimes reversible in contrast to problems caused by permanent stents, which include stenosis of the trachea.

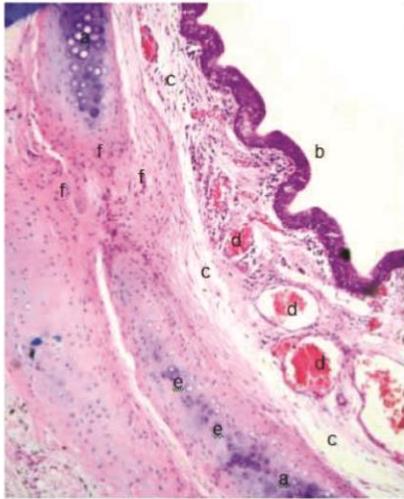


FIGURE 14: Tissue regeneration in the SIS group with reepithelialization, neovascularization, and newly formed cartilage, H&E (40x): (a) mature cartilaginous tissue, (b) pseudostratified ciliated epithelium, (c) connective tissue, (d) blood vessels, (e) immature cartilaginous tissue (newly formed cartilage), and (f) fibrosis.

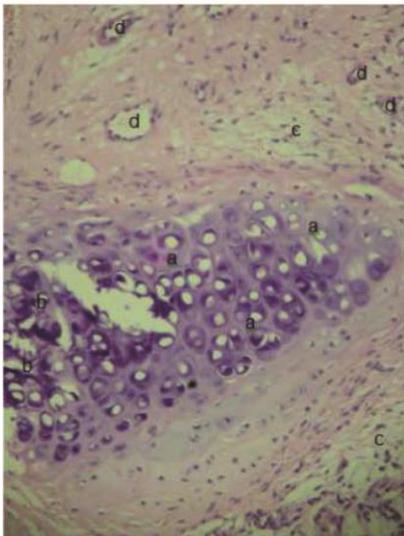


FIGURE 15: SIS group with immature cartilaginous tissue at the site of the tracheal defect, H&E (400x): (a) immature cartilaginous tissue (newly formed cartilage), (b) mature cartilaginous tissue, (c) connective tissue, and (d) blood vessels.

This study aimed at testing the use of SIS for repairing tracheal defects in rabbits by analyzing the dimensions of the tracheal defects after reconstruction and by evaluating the regeneration of the tracheal wall.

In order to perform this study, we created partial tracheal defects of 6×8 mm (48 mm^2) dimensions in our rabbit

model. The size of this defect was chosen because a 6 mm resection of a circumferential segment from a rabbit trachea would cause a reduction of approximately 30% of the normal rabbit tracheal transverse section area and a decrease in tracheal lumen of up to 40% may occur without compromising the respiratory dynamics [31]. As the aim of this study was not to evaluate respiratory dynamics, animals were not submitted to respiratory distress. We considered it appropriate to use an approximately 30% tracheal lumen reduction to avoid a stenosis progression.

A surprising result of this study was the shorter average perimeter and smaller average area of defects in the SIS group. This was not expected as there was interposition of a tissue graft between the edges of the tracheal defect, avoiding decrease in tracheal lumen area during reparation. The average perimeter of the tracheal defect in the SIS group decreased by 15.3% compared to that of the control group ($p = 0.035$), and the average area decreased by 21.8% ($p = 0.151$). A decrease in tracheal lumen of up to 40% may be acceptable without compromising respiratory dynamics [31], as seen in our experimental animals, all of which survived the surgical procedure with no signs of obstruction or stenosis of the airway. Although the decrease in average perimeter was small and, in the case of the average area, not statistically significant, it points to the inability of this method in maintaining the tracheal structure. We believe that the decrease might have occurred due to contraction at the healing stage secondary to the inflammation and fibrosis induction caused by surgical injury. It might be possible that the use of a temporary endotracheal support (stent) could prevent this stenosis.

Histological analysis revealed an inflammatory tissue in both groups with no statistically significant difference ($p = 0.147$), but the presence of inflammatory cells at the site of the graft in SIS group without any signs of necrosis confirms biocompatibility, lack of antigenicity, and absence of rejection and is in agreement with the observations of other *in vivo* studies with SIS [22, 27].

There was also no significant difference when comparing the presence of fibrosis ($p = 1.000$) and neovascularization ($p = 0.603$) between the two groups. However, it was important to verify the occurrence of neovascularization in almost 38% of the animals in the SIS group, a result that is in accordance with the findings of Poulouse et al. [19], who previously described the occurrence of neovascularization in the SIS graft matrix used in the vena cava of pigs.

Probably the most important finding in this study is that related to tissue regeneration. There was a statistically significant difference ($p = 0.018$) in favor of the SIS group relating to reepithelialization and formation of new cartilage in more than one half of the cases (54.5%), while there was no tissue regeneration in any of the samples of the control group. The occurrence of this level of tissue interaction supports the utilization of SIS as a graft material to support tissue regeneration [12, 27].

The tissue engineering industry is still seeking the ideal tracheal substitute that provides cell-matrix interaction with receptor cells for the promotion of migration, proliferation, and reepithelialization of defects [1].

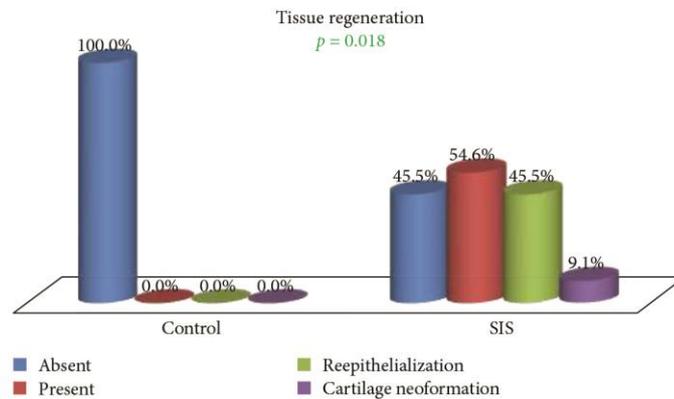


FIGURE 16: Tissue regeneration: group comparison.

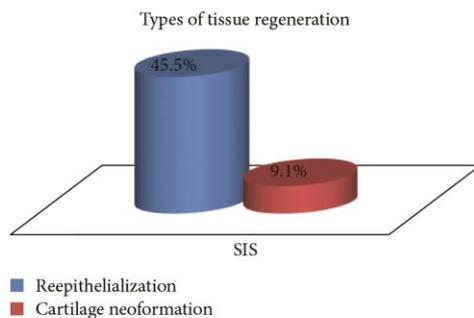


FIGURE 17: Tissue regeneration type within the SIS group.

Thus, porcine small intestinal submucosa, as a biodegradable tissue, is able to serve as a support for tissue remodeling [10, 15]. It has been widely used in many areas of medicine with satisfactory results in the regeneration of the aorta, vena cava, ligaments, skin, and other tissues [32]. The chemical and mechanical characteristics of SIS, combined with its low antigenicity, clearly make SIS a versatile and efficient option that appears to appropriately replace the tracheal tissue, although in our study it failed to prevent the occurrence of tracheal stenosis.

5. Conclusions

In summary, SIS showed some desirable properties when used as a graft material, partially replacing the tracheal wall in a rabbit model of tracheal injury, such as the capacity to promote tissue regeneration and to lower the risk of some serious postoperative complications like infection and graft extrusion or obstruction. However, it did not prevent the occurrence of tracheal stenosis but was successful in regenerating the tracheal wall by promoting efficient neovascularization, reepithelialization, and formation of new cartilage.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Supplementary Materials

Annex 1: Committee of Ethics in Research in Animal decision. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] B. Klin, M. Weinberg, I. Vinograd et al., "Experimental repair of tracheal defects using a new biodegradable membrane," *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques Part A*, vol. 17, no. 3, pp. 342–349, 2007.
- [2] T. Fujiwara, K. Nishino, and T. Numajiri, "Tracheal reconstruction with a prefabricated and double-folded radial forearm free flap," *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, vol. 62, no. 6, pp. 790–794, 2009.
- [3] S. H. Kamil, R. D. Eavey, M. P. Vacanti, C. A. Vacanti, and C. J. Hartnick, "Tissue-engineered cartilage as a graft source for laryngotracheal reconstruction: a pig model," *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, vol. 130, no. 9, pp. 1048–1051, 2004.
- [4] A. Okumus, O. Cizmeci, F. Kabakas, S. V. Kuvat, A. Bilir, and A. Aydin, "Circumferential trachea reconstruction with a prefabricated axial bio-synthetic flap: experimental study," *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, vol. 69, no. 3, pp. 335–344, 2005.
- [5] K. Kashiwa, S. Kobayashi, H. Tono, T. Nohara, T. Honda, and S. Sakurai, "Reconstruction of the cervical trachea using a prefabricated corticoperiosteal flap from the femur," *Annals of Plastic Surgery*, vol. 62, no. 6, pp. 633–636, 2009.
- [6] S. Baiguera, B. D'Innocenzo, and P. Macchiarini, "Current status of regenerative replacement of the airway," *Expert Review of Respiratory Medicine*, vol. 5, no. 4, pp. 487–494, 2011.
- [7] E. J. O. ten Hallers, G. Rakhorst, H. A. M. Marres et al., "Animal models for tracheal research," *Biomaterials*, vol. 25, no. 9, pp. 1533–1543, 2004.
- [8] H. C. Grillo, "Tracheal replacement: a critical review," *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 73, no. 6, pp. 1995–2004, 2002.
- [9] H. Tsukada, S. Gangadharan, R. Garland, F. Herth, M. DeCamp, and A. Ernst, "Tracheal replacement with a bioabsorbable scaffold in sheep," *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 90, no. 6, pp. 1793–1797, 2010.

- [10] J. H. Park, J. W. Jung, H. W. Kang, Y. H. Joo, J. S. Lee, and D. W. Cho, "Development of a 3D bellows tracheal graft: mechanical behavior analysis, fabrication and an *in vivo* feasibility study," *Biofabrication*, vol. 4, no. 3, article 035004, 2012.
- [11] J. He, X. Xu, M. Chen et al., "Novel method to repair tracheal defect by pectoralis major myocutaneous flap," *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 88, no. 1, pp. 288–291, 2009.
- [12] J. W. Park, D. Pavcnik, B. T. Uchida et al., "Small intestinal submucosa covered expandable Z stents for treatment of tracheal injury: an experimental pilot study in swine," *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 11, no. 10, pp. 1325–1330, 2000.
- [13] C. Butler, M. Birchall, and A. Giangreco, "Interventional and intrinsic airway homeostasis and repair," *Physiology*, vol. 27, no. 3, pp. 140–147, 2012.
- [14] X. F. Du, S. K. Kwon, J. J. Song, C. G. Cho, and S. W. Park, "Tracheal reconstruction by mesenchymal stem cells with small intestine submucosa in rabbits," *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, vol. 76, no. 3, pp. 345–351, 2012.
- [15] M. Nomoto, Y. Nomoto, Y. Tada et al., "Bioengineered trachea using autologous chondrocytes for regeneration of tracheal cartilage in a rabbit model," *Laryngoscope*, vol. 123, no. 9, pp. 2195–2201, 2013.
- [16] K. E. M. Benders, P. R. van Weeren, S. F. Badylak, D. B. F. Saris, W. J. A. Dhert, and J. Malda, "Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration," *Trends in Biotechnology*, vol. 31, no. 3, pp. 169–176, 2013.
- [17] J. T. Rich and P. J. Gullane, "Current concepts in tracheal reconstruction," *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, vol. 20, no. 4, pp. 246–253, 2012.
- [18] M. Çakmak, A. E. Balci, B. Çobanoğlu, and M. O. Özyurtkan, "Tracheal reconstruction with end-to-end anastomosis and allografting: an experimental study," *Firat Tıp Dergisi*, vol. 15, no. 4, pp. 168–172, 2010.
- [19] B. K. Poulouse, S. Scholz, D. E. Moore et al., "Physiologic properties of small intestine submucosa," *The Journal of Surgical Research*, vol. 123, no. 2, pp. 262–267, 2005.
- [20] M. L. Lim, P. Jungebluth, F. Ajalloueiian et al., "Whole organ and tissue reconstruction in thoracic regenerative surgery," *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 88, no. 10, pp. 1151–1166, 2013.
- [21] A. Okumuş, O. Cizmeci, S. V. Kuvat et al., "Comparison of different methods of circumferential tracheal reconstruction: an experimental study," *Kulak Burun Bogaz İhtisas Dergisi*, vol. 17, no. 3, pp. 158–166, 2007.
- [22] C. M. Ramos, J. C. Francisco, M. Olandoski et al., "Myocardial regeneration after implantation of porcine small intestinal submucosa in the left ventricle," *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, vol. 29, no. 2, pp. 202–213, 2014.
- [23] L. Zhang, Z. Liu, P. Cui, D. Zhao, and W. Chen, "SIS with tissue-cultured allogenic cartilages patch tracheoplasty in a rabbit model for tracheal defect," *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 127, no. 6, pp. 631–636, 2007.
- [24] S. P. Gubbels, M. Richardson, D. Trune, D. A. Bascom, and M. K. Wax, "Tracheal reconstruction with porcine small intestine submucosa in a rabbit model," *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, vol. 134, no. 6, pp. 1028–1035, 2006.
- [25] A. Wurtz, I. Hysi, E. Kipnis et al., "Tracheal reconstruction with a composite graft: fascial flap-wrapped allogenic aorta with external cartilage-ring support," *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, vol. 16, no. 1, pp. 37–43, 2013.
- [26] C. Alberti, "Tissue engineering technologies: just a quick note about transplantation of bioengineered donor trachea and augmentation cystoplasty by de novo engineered bladder tissue," *Il Giornale di Chirurgia*, vol. 30, no. 11-12, pp. 514–519, 2009.
- [27] E. Olender, I. Uhrynowska-Tyszkiewicz, and A. Kaminski, "Revitalization of biostatic tissue allografts: new perspectives in tissue transplantation," *Transplantation Proceedings*, vol. 43, no. 8, pp. 3137–3141, 2011.
- [28] J. Kim, S. W. Suh, J. Y. Shin, J. H. Kim, Y. S. Choi, and H. Kim, "Replacement of a tracheal defect with a tissue-engineered prosthesis: early results from animal experiments," *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 128, no. 1, pp. 124–129, 2004.
- [29] L. C. Guarita-Souza, *Regeneração miocárdica pós implante de submucosa porcina no ventrículo esquerdo*, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Departamento de Pós-Graduação, Curitiba, PR, 2011.
- [30] H. C. Grillo, "Development of tracheal surgery: a historical review. Part 1: techniques of tracheal surgery," *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 75, no. 2, pp. 610–619, 2003.
- [31] M. Brouns, S. T. Jayaraju, C. Lacor et al., "Tracheal stenosis: a flow dynamics study," *Journal of Applied Physiology*, vol. 102, no. 3, pp. 1178–1184, 2007.
- [32] Y. Wang and L. Liao, "Histologic and functional outcomes of small intestine submucosa-regenerated bladder tissue," *BMC Urology*, vol. 14, no. 1, p. 69, 2014.

DECLARATION

I, [Nelson Bergonse Neto](#), submit for publication in the Stem Cells International the article titled: **Regeneration of Tracheal Tissue by Using Porcine Small Intestinal Submucosa in Tracheal Partial Defects**

I certify that the study submitted has not received any financial support from pharmaceutical industry or other commercial source and neither I or any First degree relative possess a financial interest in the subject approached in the manuscript.

Date: Friday, April 28, 2017

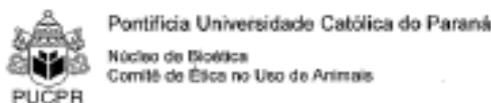
Name: [Nelson Bergonse Neto](#)

Signature(s):|

A handwritten signature in black ink on a light blue background, appearing to read "Nelson Bergonse Neto".

Supplementary Materials

Annex 1: Committee of Ethics in Research in Animal decision.



Curitiba, 1 de setembro de 2011.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 640 - 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Implante da submucosa do intestino porcino e da membrana amniótica em defeitos traqueais

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Luiz César Guarita Souza

EQUIPE DE PESQUISA:

Luiz César Guarita Souza

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

CCBS / Mestrado em Ciências da Saúde

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Machos	08 meses	C	25

O colegiado do CEUA em reunião no dia 01/09/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.



Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,


Profª Graziela Maria D'Amêlida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi realizado em um modelo experimental de traqueostomia em coelhos, nos quais se procederam o implante de submucosa de intestino delgado suína para a correção do defeito traqueal. Foi demonstrado com sucesso a propriedade de regeneração tecidual inerente ao enxerto através da identificação de neoformação de cartilagem, epitélio pseudoestratificado ciliado e vascularização na área tratada.

A evidência de regeneração da traquéia com o uso da SIS indica uma grande possibilidade de tratamento futuro em pacientes para os quais o tratamento cirúrgico atual não é factível e permanecem condenados ao uso de traqueostomia definitiva.

Apesar de o uso da SIS não ter prevenido a ocorrência de estenose na região cirúrgica tratada, acreditamos que tal situação pode ser contornada com o uso concomitante de uma órtese tubular endotraqueal temporária - atualmente existente no mercado - durante o período de cicatrização, servindo como molde para o tecido em regeneração.

Como próximo passo em nossa pesquisa, pretende-se testar a interação do uso de SIS e órteses tubulares endotraqueais temporárias em grandes defeitos traqueais visando tanto a regeneração traqueal quanto a prevenção da estenose.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, G. A. et al. Evaluation of the porcine intestinal collagen layer as a biomaterial. **J. Biomed Mater. Res.**, v. 51, n. 3, p. 442-452, 2000.
- ALBERTI, C. Tissue engineering technologies: just a quick note about transplantation of bioengineered donor trachea and augmentation cystoplasty by de novo engineered bladder tissue. **G. Chir.**, v. 30, n. 11-12, p. 514-519, 2009.
- ALLMAN, A. J. et al. Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a Th2-restricted immune response. **Transplantation**, v. 71, n. 11, p. 1631-1640, 2001.
- BADYLAK, S. F. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. **J. Surg. Res.**, v. 47, n. 1, p. 74-80, 1989.
- BAIGUERA, S.; D'INNOCENZO, B.; MACCHIARINI, P. Current status of regenerative replacement of the airway. **Expert Rev. Respir. Med.**, v. 5, n. 4, p. 487-494, 2011.
- BENDERS, K. E. M. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. **Trends in Biotechnol.**, v. 31, n. 3, p. 169-176, 2013.
- BUTLER, C; BIRCHALL, M.; GIANGRECO, A. Interventional and intrinsic airway homeostasis and repair. **Physiology**, v. 27, n. 3, p. 140-147, 2012.
- CAKAMAK, M. et al. Tracheal reconstruction with end-to-end anastomosis and allografting: an experimental study. **Firat Tıp Dergisi**, v. 15, n. 4, p. 168-172, 2010.
- CAYAN, S. et al. The bladder acellular matrix graft in a rat chemical cystitis model: functional and histologic evaluation. **J. Urol.**, v. 168, n. 2, p. 798-804, 2002.
- CHAROCOPOS, N. et al. The management of post-intubation tracheal stenoses with self-expandable stents: early and long-term results in 11 cases. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.**, v. 40, n. 4, p. 919-924, 2011.
- CHUN, S. Y. et al. Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix. **Biomaterials**, v. 28, n. 29 p. 4251-4256, 2007.
- CLARKE, K. M. et al. Intestine submucosa and polypropylene mesh for abdominal wall repair in dogs. **J. Surg. Res.**, v. 60, n. 1, p. 107-114, 1996.
- COSTA, J. N. L. et al. Comparação entre o pericárdio bovino descelularizado e o pericárdio bovino tradicional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 20, p. 14-22, 2005.
- DU, X. F. et al. Tracheal reconstruction by mesenchymal stem cells with small intestine submucosa in rabbits. **Int. J. Pediat. Otorhinolaryngol.**, v. 76, n. 3, p. 345-351, 2012.

FUJIWARA, T.; NISHINO, K.; NUMAJIRI, T. Tracheal reconstruction with a prefabricated and double-folded radial forearm free flap. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v. 62, n. 6, p. 790–794, 2009.

GRECA, F. H. et al. The influence of differing pore sizes on the biocompatibility of two polypropylene meshes in the repair of abdominal defects. Experimental study in dogs. **Hernia**, v. 5, n. 2, p. 59-64, 2001.

GRILLO, H. C. Tracheal replacement: a critical review. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 73, n. 6, p. 1995–2004, 2002.

GUBBELS, S. P. et al. Tracheal reconstruction with porcine small intestine submucosa in a rabbit model. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 134, n. 6, p. 1028–1035, 2006.

GUERRISSI, J. O.; GUERRISSI, J. A.; MIRANDA, M. G. Functional reconstruction of the trachea: prelaminated chondromuscular flap. **J. Craniofac. Surg.**, v. 20, n. 3, p. 868-871, 2009.

HALLERS, E. J. O. et al. Animal models for tracheal research. **Biomaterials**, v. 25, n. 9, p. 1533–1543, 2004.

HE, J. et al. Novel method to repair tracheal defect by pectoralis major myocutaneous flap. **The Ann. Thorac. Surg.**, v. 88, n. 1, p. 288–291, 2009.

IWASA, J. et al. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. **Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.**, v. 17, n. 6, p. 561-577, 2009.

KAMIL, S. H. et al. Tissue-engineered cartilage as a graft source for laryngotracheal reconstruction: a pig model. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 130, n. 9, p. 1048–1051, 2004.

KANZAKI, M. et al. Tissue engineered epithelial cell sheets for the creation of a bioartificial trachea. **Tissue Eng.**, v. 12, n. 5, p. 1275–1283, 2006.

KASHIWA, K. et al. Reconstruction of the cervical trachea using a prefabricated corticoperiosteal flap from the femur. **Ann. of Plast. Surg.**, v. 62, n. 6, p. 633–636, 2009.

KIM, J. C.; TSENG, S. C. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. **Cornea**, v. 14, n. 5, p. 473-484, 1995.

KLIN, B. et al. Experimental repair of tracheal defects using a new biodegradable membrane. **J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech.**, v. 17, n. 3, p. 342–349, 2007.

LIM, M. L. et al. Whole organ and tissue reconstruction in thoracic regenerative surgery. **Mayo Clin. Proc.**, v. 88, n. 10, p. 1151–1166, 2013.

NG, K.W.; HUTMACHER, D.W. Reduced contraction of skin equivalent engineered using cell sheets cultured in 3D matrices. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4591–4598, 2006.

NOMOTO, M. et al. Bioengineered trachea using autologous chondrocytes for regeneration of tracheal cartilage in a rabbit model. **Laryngoscope**, v. 123, n. 9, p. 2195–2201, 2013.

OKUMUS, A. et al. Comparison of different methods of circumferential tracheal reconstruction: an experimental study. **Kulak Burun Bogaz Ihtis. Derg.**, v. 17, n. 3, p. 158-66, 2007.

OKUMUS, A. et al. Circumferential trachea reconstruction with a prefabricated axial bio-synthetic flap: experimental study. **Int. J. Pediatr Otorhinolaryngol.**, v. 69, n. 3, p. 335–344, 2005.

PARK, J. H. et al. Development of a 3D bellows tracheal graft: mechanical behavior analysis, fabrication and an in vivo feasibility study. **Biofabrication**, v. 4, n. 3, article 035004, 2012.

PARK, J. W. et al. Small intestinal submucosa covered expandable Z stents for treatment of tracheal injury: an experimental pilot study in swine. **J. Vasc. Interv. Radiol.**, v. 11, n. 10, p. 1325–1330, 2000.

PEARSON, S. E. et al. Tracheal reconstruction with a synthetic material in a porcine model. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, v. 110, p. 718–722, 2001.

POULOSE, B. K. et al. Physiologic properties of small intestine submucosa. **J. Surg. Res.**, v. 123, n. 2, p. 262–267, 2005.

RAMOS, C. M. G. et al. Regeneração miocárdica após implante de submucosa intestinal suína no ventrículo esquerdo. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 29, n. 2, p. 202-213, 2014.

REMLINGER, N. T. et al. Hydrated xenogeneic decellularized tracheal matrix as a scaffold for tracheal reconstruction. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3520-3526, 2010.

RICH, J. T.; GULLANE, P. J. Current concepts in tracheal reconstruction. **Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 20, n. 4, p. 246–253, 2012.

SAAD-JUNIOR, R. et al. Lesões traqueais benignas adquiridas e congênitas. In: SAAD-JUNIOR, R. et al. **Cirurgia Torácica Geral**. ed. 2. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

SENIOR, K. Intestinal collagen shows promise as a small-vessel graft. **Lancet**, v. 354, n. 9189, p. 1533, 1999.

SHIELDS, T. W.; LOCICERO III, J.; PONN, R. B. Management of Nonneoplastic diseases of the trachea. In: SHIELDS, T. W.; LOCICERO III, J.; PONN, R. B. **General Thoracic Surgery**. ed. 5. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

TATEKAWA, Y. et al. Experimental repair of tracheal defect using a bioabsorbable copolymer. **J. Surg. Res.**, v. 160, n. 1, p. 114-121, 2010.

TSUKADA, H. et al. Tracheal replacement with a bioabsorbable scaffold in sheep. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 90, n. 6, p. 1793–1797, 2010.

TSUKADA, H. et al. Tracheal replacement with a silicone-stented, fresh aortic allograft in sheep. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 89, n. 1, p. 253-258, 2010.

TUDORACHE, I. et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. **J. Heart Valve Dis.**, v. 16, n. 5, p. 567-573, 2007.

UGARTE, D. A. et al. Surgisis patch tracheoplasty in a rodent model for tracheal stenosis. **J. Surg. Res.**, v. 112, n. 1, p. 65-69, 2003.

VECCHIA, L. D. et al. Evaluation of Small Intestine Submucosa and Acellular Dermis as Diaphragmatic Prostheses. **J. Ped. Surg.**, v. 34, n. 1, p. 167-171, 1999.

VOYTIK-HARBIN, S. L. et al. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. **J. Cell Biochem.**, v. 67, n. 4, p. 478-491, 1997.

WURTZ, A. et al. Tracheal reconstruction with a composite graft: fascial flap-wrapped allogenic aorta with external cartilage-ring support. **Interac. Cardiovasc. Thorac. Surg.**, v. 16, n. 1, p. 37–43, 2013.

WURTZ, A. et al. Construction of a tube-shaped tracheal substitute using fascial flap-wrapped revascularized allogenic aorta. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.**, v. 41, n. 3, p. 663-668, 2012.

ZHANG, L. et al. SIS with tissue-cultured allogenic cartilages patch tracheoplasty in a rabbit model for tracheal defect. **Acta OtoLaryngol.**, v. 127, n. 6, p. 631–636, 2007.