



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Regeneração Tecidual em Traqueia após Implante da Membrana Amniótica

Lianna Ferrari Jorge

CURITIBA

2013

LIANNA FERRARI JORGE

**Regeneração Tecidual em Traqueia após
Implante da Membrana Amniótica**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para a qualificação ao título de Mestre.

Orientador: Dr. Luiz Cesar Guarita Souza

Curitiba

2013

Agradecimentos

A Deus, porque quando tudo pareceu escuro, pude sentir sua Mão em meu ombro e Sua suave voz: “Não temas, que Eu te ajudo.”

Aos Meus Pais, Jack e Léo(irmã e cunhado): Sempre comigo, mesmo de longe. Força!

Ao meu avô Jahir Ferrari (in memorian) e minha avó Ruth Ferrari: pessoas de inspiração eterna.

A grandes amigos que fiz durante esse projeto, sem os quais, não seria possível terminá-lo: Misael Gomes Barbosa, Álvaro Roberto G. Machado, Rafael Zotz, Seigo Nagashima, Ana Paula C. Matrins, Marina Louise V. de Azevedo, Dr. Julio César Francisco, Bruna Olandoski Erbano, Nicolle Amboni Schio, Bárbara Evelin Gonçalves Barboza, Prof. Dr. Lúcia Noronha.

Ao meu orientador: Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza, pelo estímulo do início, por não me deixar desistir e por tudo o que ele representará em minha vida.

"A embarcação dos sonhos meus também se faz ao mar;

Eu posso ver a praia além;

Irei em breve ali chegar"

Alfred Tennyson (1809-1892)

Sumário

	Pag
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	5
3 OBJETIVOS.....	7
3.1 Geral.....	8
3.2 Específicos.....	8
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
4.1. Defeitos traqueais e seus tratamentos.....	10
4.2 A membrana amniótica (MA).....	15
4.2.1 Histórico.....	15
4.2.2 Estrutura básica.....	16
4.2.3 Propriedades biológicas.....	17
4.2.4 Propriedades mecânicas.....	19
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1 Modelo Experimental.....	22
5.2 Preparo da Membrana Amniótica.....	26
5.2.1 Triagem das Membranas.....	26
5.2.2 Processo de descelularizaçãoda MA.....	28
5.2.3 Avaliação microbiológica das membranas.....	29

5.3	Eutanásia.....	30
5.4	Análise Histológica.....	31
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
7	RESULTADOS.....	35
7.1	Seguimento pós-operatório.....	36
7.2	Avaliação microbiológica das membranas.....	36
7.3	Processo de descelularizaçãoda MA.....	37
7.3.1	Análise Histológica.....	37
7.4	Medidas do Perímetro e Área da Traqueia.....	39
7.5	Análise Histológica.....	39
7.5.1	Análise Macroscópica.....	39
7.5.2	Análise dos resultados de Perímetro e Área.....	40
7.6	Análise Microscópica.....	43
7.7	Análise Imunohistoquímica.....	51
8	DISCUSSÃO.....	63
9	CONCLUSÕES.....	63
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

Lista de Figuras

		Pag.
Figura 1	Retângulo do defeito traqueal.....	25
Figura 2	Enxerto de membrana amniótica.....	25
Figura 3	Fixação da membrana amniótica no defeito traqueal, através de quatro pontos suturados nas extremidades do retângulo.....	25
Figura 4	Aspecto da ferida operatória após o término da cirurgia	26
Figura 5	Manobra digitiforme de separação do âmnion do córion (A). Lavagem da membrana para retirada dos resíduos de sangue e córion (B).....	27
Figura 6	Processo de descelularização sob agitação da membrana (A). Membrana descelularizada (B).....	28
Figura 7	(A) representa MA intacta. (B) MA descelularizada: Nota-se a ausência completa de células epiteliais, porém com destruição da estrutura colágena em algumas camadas (coloração HE, aumento na objetiva 10x).....	37
Figura 8	Membrana intacta A e B. Membrana descelularizada C e D. Microscopia de varredura. (Fig. C 300X/ Fig. D 10.000X- relacionado com a escala logo na porção inferior das figuras).....	38
Figura 9	Traqueia retirada após a eutanásia a dois cm da Carina Principal.....	37
Figura 10	Análise macroscópica do local da lesão da traquéia, onde foram realizadas as medidas da área e do perímetro, pelo programa IMAGE PRO-PLUS® 4.5.....	39
Figura 11	Perímetro no defeito dos grupos controle e MA.....	40
Figura 12	Área no defeito dos grupos controle e MA.....	41
Figura 13	Lâmina do grupo MA no local do defeito. HE (4x).....	42

Figura 14	Lâmina do grupo MA no local do defeito. HE (20x).....	44
Figura 15	Lâmina do grupo MA no local do defeito. Movat's (4x)	44
Figura 16	Lâmina do grupo MA no local do defeito. Movat's (20x)	45
Figura 17	Lâmina do grupo controle. HE (4x).....	45
Figura 18	Lâmina do grupo controle. Movat's (4x).....	45
Figuras 19 e 20	Lâmina corada com técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-aggrecan.....	47
Figuras 21 e 22	Lâmina corada com técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-aggrecan (grupo MA).....	47
Figuras 23 e 24	Lâmina corada com técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-aggrecan (grupo controle).....	48

Lista de Tabelas

	Pag.
Tabela 1 Variável: Perímetro no defeito (análise inter grupo).....	40
Tabela 2 Variável: área no defeito (análise inter grupo).....	41

RESUMO

Os defeitos traqueais extensos, nas situações onde não é possível a realização da anastomose término-terminal dos cotos proximal e distal de traqueia (tratamento cirúrgico), apresentam resultados ineficientes. A membrana amniótica (MA) tem sido usada como reparador tecidual em vários sistemas do organismo proporcionando uma regeneração tecidual. É uma proposta a ser explorada na regeneração de tecidos assim como no auxílio desses defeitos. **Objetivo:** analisar a capacidade de regeneração tecidual da traqueia após o implante de membrana amniótica em coelhos submetidos à traqueostomia e comparar o perímetro e a área das traquéias no local da traqueostomia, entre os grupos. **Método:** vinte coelhos machos da raça Nova Zelândia foram submetidos à traqueostomia e randomizados em dois grupos: controle(N=10) e MA(N=10). O grupo MA foi submetido ao implante da MA no local da traqueostomia e o grupo controle apenas foi realizado o fechamento da ferida operatória. A análise histológica foi realizada com coloração de hematoxilina-eosina (HE) e Movat's e imunohistoquímica com o anticorpo anti-aggrecan. **Resultados:** com relação à variável perímetro no local do defeito foi identificado que no grupo MA apresentava 2.07cm e o grupo controle 1.70cm, $p=0.006$. A área no grupo MA foi de 0.22cm^2 e a do grupo controle de 0.15cm^2 , $p=0.012$. A análise histológica foi identificada, no local na lesão traqueal, presença de tecido cartilaginoso imaturo e vasos sanguíneos no grupo MA e tecido epitelial pseudoestratificado em ambos os grupos. **Conclusão:** identificou-se uma regeneração de tecido cartilaginoso imaturo e de vasos sanguíneos no grupo

MA e um aumento do perímetro e da área no local da traqueostomia no grupo MA em relação ao grupo controle.

Palavras-Chave: membrana amniótica, enxertos, cirurgia de estenose de traqueia, regeneração tecidual.

ABSTRACT

Surgical treatments for tracheal defects, in situations where it is not possible the realization of termino-terminal anastomosis of proximal and distal stumps of the trachea, there are inefficient results. The amniotic membrane (MA) has been used as tissue repair in various systems of the body providing a tissue regeneration. **Objective:** to analyze the ability of tracheal tissue regeneration after implantation of amniotic membrane in rabbits undergoing tracheotomy and compare the perimeter and the area of the site of the tracheostomies, between the groups. **Methods:** Twenty New Zealand breed rabbits underwent tracheostomy and randomized into two groups: control (N=10) and MA (N=10). The MA group was submitted to the implant of MA at the site of tracheostomy and the control group was only held the wound closure. Histological analysis was performed with hematoxylin-eosin (HE) stain and Movat's and immunohistochemistry antibody anti-aggrecan. **Results:** The site of the perimeter defect was identified that the Group was 2.07cm MA and the control group 1.70 cm, $p=0.006$. The area in MA group was in between 0.22cm^2 and 0.15cm^2 control group, $p=0.012$. Histological analysis was identified at the site in tracheal injury, the presence of immature cartilage and blood vessels in the MA group and pseudostratified epithelial tissue in both groups. **Conclusion:** It was identified a immature cartilaginous tissue and regeneration of blood vessels in the MA group and an increase in the perimeter and the area at the site of tracheostomy in the MA group compared to the control group.

Key words: amniotic membrane, grafts, stenosis tracheal surgery, tissue regeneration.

1 INTRODUÇÃO

Desde o século XIX os defeitos traqueais têm sido alvo de estudos experimentais e clínicos, com o intuito de restabelecer a viabilidade da via aérea superior.⁽¹⁾

Os defeitos traqueais são decorrentes na grande maioria das vezes de problemas pós entubação, traumáticas, compressão por tumores, em algumas situações por alterações congênitas, tuberculose, blastomicose e idiopáticas.⁽²⁾

A aparente simplicidade da substituição traqueal encorajou estudos com a introdução de próteses similares a condutos tubulares, as quais se mostraram ineficazes. Atualmente, sabe-se que a traqueia pode ser diminuída em 50% do seu comprimento em adultos, aproximadamente 1/3 em crianças pequenas e ser submetida à anastomose primária término-terminal, sendo este o *padrão ouro* de tratamento.⁽¹⁾

Porém, nem todas as alterações traqueais possam ser corrigidas por este procedimento, principalmente quando o defeito é maior do que os valores discriminados acima. Além disso, os riscos de infecção, extrusão, obstrução, estenose e rejeição crônica permanecem os principais desafios na reparação e reconstrução traqueais.⁽¹⁾

Em consequência destes problemas têm-se utilizado uma série de materiais autólogos, heterólogos e biomateriais para a correção da estenose de traquéia, entretanto com resultados não satisfatórios, não sendo possível até o presente momento, de se criar um conduto de ar, bioabsorível, com a rigidez e a flexibilidade necessárias a esse órgão.⁽²⁾

A traqueia pode ser considerada como um grande e fino tubo de cartilagem reforçado que conecta a laringe aos brônquios principais. Como outros tecidos, o epitélio traqueal é altamente reativo as lesões, induzindo a proliferação de células subjacentes ao iniciar um processo de cicatrização de feridas. Nestas situações, não há nenhuma proliferação ou regeneração da cartilagem, quando esse processo não é interrompido a tempo, ou quando há formação de uma cicatriz importante, o lúmen será diminuído assim como a passagem de ar, ocasionando a estenose da traqueia⁽³⁾.

No adulto, as estenoses traqueiais pós intubação se originam em mais de 90% pela isquemia até a necrose da mucosa traqueal e a seguir, da cartilagem traqueal esmagada pelo balonete de alta pressão de uma cânula naso ou orotraqueal, ou de uma traqueosotomia. Já nas crianças, as quais 95% têm estenose subglótica, a estenose não depende do balonete, mas da isquemia e necrose produzida pela superfície externa do tubo na laringe, portanto estão relacionadas com diâmetro do tubo. Além da lesão isquêmica, há também uma resposta anormal do doente, produzindo uma maior quantidade de fibrose.⁽⁵⁾ Como já afirmou *Hermes C. Grillo*, a traqueia é um órgão de forma tubular com propriedades de rígidas em sua porção lateral e flexível na sua porção longitudinal. Portanto, todos os esforços para sua correção deveriam observar essa sua característica particular.⁽¹⁾

Durante esses anos de pesquisa, uma em particular mostrou uma possibilidade de que essa característica, citada acima, pudesse ser uma colaboradora quando empregados os métodos de reconstrução traqueal: Uma pesquisa que estudou a imunohistoquímica das traqueias de coelhos.

Coelhos não submetido a nenhum procedimento cirúrgico, ou endoscópico. Esse estudo aventou a possibilidade de uma proteoglicana : a aggrecana, associada ao colágeno II, fossem primariamente responsáveis pela ótima flexibilidade dos anéis traquéias. A Aggrecana, em especial, apresenta uma padrão de distribuição que pode ter um papel funcional importante. Por exemplo, regiões de periodicidade de aumento compressivo da sua integridade, intercalado com regiões de maior flexibilidade. Isso pode promover o esse balanço, já citado por *Hermes C. Grillo*, entre flexibilidade e rigidez.^(1,30)

Com esse intuito e com os resultados mostrados em outros órgãos do corpo de animais de de seres humanos também, o emprego da MA tem expandido para outras 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. A traqueia, ainda é um órgão onde as pesquisas e estudos estão no início mas já com algumas utilizações com MA semeadas com condrócitos e não com MA descelularizadas.^(3,4, 45)

2 JUSTIFICATIVA

Baseado no fato de que a cirurgia de reconstrução da traqueia apresenta várias complicações relacionadas aos procedimentos cirúrgicos, pós cirúrgicos e com enxertos além das dificuldades de auto-regeneração tecidual, será testada a hipótese de que a MA possa auxiliar no tratamento de lesões traqueais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a capacidade de regeneração tecidual da traqueia após o implante de membrana amniótica em coelhos submetidos à traqueostomia

3.2 Objetivos específicos

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

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Defeitos traqueais e seus tratamentos

As reconstruções traqueais têm o propósito de reorganizar e substituir partes do tecido traqueal usando técnicas de implante e transplante. As indicações para a reconstrução traqueal são numerosas: obstrução por tumores, trauma e estenoses congênitas ou pós entubações. A engenharia de tecidos tem tido crédito por ser uma técnica que pode promover soluções para defeitos traqueais.⁽⁵⁾

Estenose traqueal é uma condição potencialmente fatal. A traqueostomia e a entubação endotraqueal permanecem as causas mais comuns de estenose benigna, apesar das melhorias no projeto e gestão de tubos. Estenose pós traqueostomia é a mais freqüentemente encontrada devido ao desempenho anterior da traqueostomia em unidades de cuidados intensivos, enquanto a incidência de estenose pós entubação, diminuiu com a aplicação de alto volume e baixa pressão na ventilação mecânica. Em pacientes sintomáticos, a estenose traqueal benigna tem como padrão-ouro de tratamento a reconstrução cirúrgica término-terminal (freqüentemente realizada após broncoscopia intervencionista).⁽⁶⁾

Implante de *stent* e outras técnicas estão sendo testadas e indicadas nos pacientes com estreitamentos traqueais sintomáticos, onde há contra-indicação do procedimento cirúrgico, devido a razões locais ou gerais: estenoses longas, inflamação, condições respiratórias de difícil controle, insuficiência cardíacas ou problemas neurológicos.

Implante de *stents* da traquéia usando tubos em forma de “T” ou um

dos vários tipos de *stents* traqueais são as formas alternativas à reconstrução cirúrgica para estenose pós entubação.⁽⁶⁾

Em um estudo, realizado por *Charokopos N., Foroulis C. et col*, 11 pacientes com estenose traqueal pós entubação, foram submetidos a implante de *stents* metálicos auto-expansível (SEMS). Segundo os autores a aplicação da SEMS em estenoses traqueais pós entubação resultou em uma melhora imediata dos sintomas obstrutivos sem complicações peri-procedimentos 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 devem ser 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.⁽⁷⁾

Em um estudo utilizando um modelo experimental de estenose de traqueia, foi retirado um segmento circunferencial de 50 mm de comprimento da traqueia e um homoenxerto de aorta de 60 mm foi então implantado através de anastomoses proximais e distais com os cotos da traquéia. Neste mesmo experimento foi implantado um *stent* de 70 mm, dentro do homoenxerto, com o objetivo de dar suporte para 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, entretanto visibilizou-se um encurtamento deste enxerto à

anatomia patológica, o que pôde permitir a reconstrução término-terminal de grandes defeitos traqueais.⁽⁷⁾

Em outro estudo, utilizaram-se 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. Um defeito traqueal na parede anterior foi criado de 4mm de largura e 10mm de comprimento. Os implantes foram realizados e os resultados sugeriram que a gelatina revestida retardou a epitelização da traquéia por causa de sua fragilidade. Além disso, o copolímero bioabsorvível implantado induziu uma imunorreação com a migração de células inflamatórias para esses materiais implantados.⁽⁸⁾

Um estudo com o objetivo de testar se a matriz extracelular da traquéia do porco (HDTM: Hydrated xenogenic decellularized tracheal matrix–matriz traqueal xenogênica hidratada descelularizada) serviria como um enxerto foi realizado. Neste experimento utilizando-se cães, foram realizados os implantes de enxertos de 20mm a 30mm de comprimento que foram implantados nos defeitos criados nas traquéias. 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.⁽⁹⁾

Um outro estudo clínico foi realizado em pacientes com defeitos

traqueais de 12mm e 23mm de comprimento. Três destes pacientes 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 esternohióideo como uma camada receptora bem vascularizada e um enxerto de cartilagem auricular como tecido doador. Esta técnica foi utilizada porque a vascularização muscular permite uma sobrevida viável da prótese auricular, as características biomecânicas dos tecidos substituídos são semelhantes dos tecidos traqueais nativos, a epitelização regenerativa é produzida espontaneamente, e o material alogênico é evitado. Este 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 este 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.⁽¹⁰⁾

Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado a viabilidade de substituição traqueal por aortas alogênicas de silicone com *stent*. 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.⁽¹¹⁾

Em um outro estudo experimental dez coelhos adultos masculinos, *Nova Zelândia*, foram divididos aleatoriamente em dois grupos de cinco animais cada e submetidos a uma ressecção traqueal de três segmentos. Nos animais do grupo I, os coelhos foram submetidos à anastomose término-terminal. Os segmentos ressecados foram transplantados para os coelhos de grupo II. Os coelhos foram sacrificados no vigésimo dia de pós-operatório, e as traqueais foram removidas. O diâmetro lateral e ântero-posterior do lúmen foi medido 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, *Hsiehetet al* quando a área de secção transversal, após a reconstrução, é entre 75 a 100%, a estenose é chamada uma "muito boa estenose" e faz com que não existam sinais clínicos e sintomas. Esses estudos acima descritos sugerem a dificuldade de tratamento defeitos traqueais, principalmente no que se refere a regeneração tecidual. Enfatizam a dificuldade do tratamento dos defeitos traqueais, apesar de trabalhos bem elaborados.⁽¹²⁾

4.2 A membrana amniótica (MA)

4.2.1 Histórico

A MA começou a ser usada no início deste século, quando *Davis* em 1910, utilizou-a como material cirúrgico no transplante de pele.⁽¹³⁾ Posteriormente, *Sabella* em 1913, usou a MA para tratamento de pequenos defeitos de pele em humanos.⁽¹⁴⁾ Em 1940, *De Roth* descreveu o transplante de membrana amniótica pela primeira vez na reparação de simbléfaro e defeitos conjuntivais.⁽¹⁴⁾

Seis anos depois, *Sorby e Symons* relataram bons resultados do uso da membrana amniótica no tratamento de queimadura química aguda.⁽¹⁵⁾

4.2.2 Estrutura básica

A membrana fetal é composta por duas camadas principais: o córion, que é a camada externa da placenta, a qual entra em contato com as células maternas e a MA, que é a camada mais interna e que esta em contato íntimo com o feto, separados apenas pelo líquido amniótico.

Na espécie humana, a MA surge sete a oito dias após a concepção, sua espessura varia de 0,02mm a 0,5mm e não apresenta vascularização e nem suprimento sanguíneo direto.⁽¹⁶⁾

Histologicamente é uma membrana translúcida composta por cinco camadas do meio interno para o externo, assim descritas: o epitélio, que está em contato direto com o líquido amniótico, a membrana basal, a camada compacta, a camada fibroblástica e a camada esponjosa. Estes achados foram descritos por *John et eDua* 2004.^(16,17)

As células amnióticas possuem numerosos microvilos em sua face apical e processos celulares se estendendo na membrana basal, como podócitos. Estes processos celulares apresentam junções tipo hemidesmossomos, aderindo a membrana basal aos tonofilamentos. No citoplasma são encontradas muitas vesículas pinocitóticas, organelas em abundância, incluindo retículo endoplasmático e complexo de Golgi.⁽¹⁸⁾

Os núcleos celulares têm sua configuração irregular e indentações na membrana nuclear, com nucléolos sempre grandes e homogêneos, o que sugere atividade nucleolar. A ultra-estrutura do epitélio da membrana

amniótica tem muitas funções especializadas, entre elas destacam-se: como epitélio de revestimento, como atividade epitelial secretória e como intenso transportador transcelular e intercelular. A membrana basal é espessa, sendo uma das mais espessas encontradas nos tecidos humanos, composta por colágenos tipos I, III, IV, V e VII, elastina, fibronectina e várias outras integrinas. A membrana basal é conhecida por prevenção nas cicatrizações, e fibrose.⁽¹⁹⁾

4.2.3 Propriedades biológicas

A MA possui várias propriedades biológicas, como reduzir a quantidade bacteriana e promover a cura de feridas infectadas. Esta membrana faz parte de um importante grupo peptídico antimicrobiano, os β -defensins, que são expressos em superfícies de mucosas por células epiteliais e leucócitos, sendo parte integrante do sistema imunológico inato.⁽²⁰⁾

O seu efeito bactericida é atribuído à sua capacidade de aderência na superfície de feridas, proteção da lesão e redução da dor.⁽²¹⁾

O sistema imunológico inato tem evoluído para eliminar os microorganismos a partir da entrada nos tecidos, criando antígenos necessários para produzir uma resposta imune adaptativa. A ausência de leucócitos no âmnion permite a prática de halo-transplante, por não induzir

rejeição. A matriz estromal da membrana amniótica contém vários inibidores de protease, podendo debelar células inflamatórias e levando-as ao rápido processo de apoptose.

O efeito antimicrobiano do âmnion e do córion tem sido demonstrado contra grande número de bactérias, incluído *Streptococcus Hemolítico do grupo A*, *Stafilococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.⁽²²⁾

A MA quando preservada é considerada como um tecido inerte, com células inviáveis. A habilidade das membranas preservadas influenciarem na reparação da lesão dá-se através dos fatores de crescimento e citocinas, que podem estar limitados ou inexistentes. Outros estudos revelaram a presença de vários fatores de crescimento no epitélio da membrana, como fator de crescimento epidermal (EGF), fator transformador de crescimento (TGF), B1, B2, B3, fator de crescimento de ceratócitos (KGF), fator de crescimento fibroblástico (b-FGF) e fator de crescimento hepatócito (HGF), que atua facilitando a migração celular.⁽²³⁾

Bigbie et al. 1991 demonstraram a boa capacidade da membrana amniótica na supressão do tecido de granulação, além de implicar em menor exsudação nas feridas tratadas com essa membrana.⁽²⁴⁾

De acordo com *Solomon et al*, a MA suprime a expressão de células pró-inflamatórias potentes como as citocinas, IL-1 α e IL-1 β .⁽²⁵⁾ Outra propriedade única é a de não induzir a rejeição imunológica após o transplante, pelo fato de não expressar os antígenos de histocompatibilidade HLA-A, B ou DR, o que a torna excelente opção como enxerto, entretanto

esta informação é questionada por outros autores.^(26,27)

Especificamente, a membrana amniótica (MA) ganhou importância devido à sua capacidade para reduzir a inflamação em cicatrizes, reforçar cicatrização de feridas e servir como um arcabouço para proliferação e diferenciação celular, como resultado da sua propriedade antimicrobiana.⁽²⁸⁾

4.2.4 Propriedades mecânicas

A MA possui grande resistência mecânica, o que a torna um atraente biomaterial a ser utilizado em cirurgias. Esta membrana é capaz de suportar a carga de pressão do líquido amniótico e repetitivas cargas menores, como as de contrações de Braxton-Hicks, durante a gestação.

Na maioria das vezes ela é capaz de suportar cargas iguais ou próximas dos níveis fisiológicos, logo após o transplante, a fim de assegurar a sua estabilidade. Além disso, sinais mecânicos podem ser importantes mediadores de diferenciação para algumas células progenitoras, de forma que a MA cria um ambiente adequado em todo local do novo tecido transplantado, podendo aumentar a força do enxerto com altos níveis de rigidez para resistir ao estresse induzido durante o crescimento tecidual.

Outras propriedades biomecânicas da matriz amniótica, como a elasticidade, rigidez e viscoelasticidade, dependerão do tipo de colágeno, proteoglicanas e elastina presentes, que são propriedades importantes e que

na falta delas, pode haver hiperplasia da camada íntima e oclusão das artérias.⁽²⁹⁾

Com essas características já determinadas e provadas da MA, é que nosso estudo prossegue e persegue seus objetivos. Principalmente o de que podemos obter auxílio nessas lesões traqueias onde o tratamento por enxerto ou cirúrgico não foi eficaz até o momento.

5 MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram realizados seguindo as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi encaminhado ao Comitê de ética em pesquisa de animais (CEUA) e aprovado sob o número 640.

5.1 Modelo Experimental

Foram incluídos 20 coelhos brancos machos, da raça Nova Zelândia, com peso médio de 3,66 Kg, selecionados para o estudo no laboratório experimental de técnica operatória da PUCPR.

Os animais foram randomizados por sorteio e divididos em dois grupos:

- Controle (n=10): submetidos à traqueostomia somente
- Membrana Amniótica (n=10): submetidos à traqueostomia e posteriormente ao implante de MA no local da traqueostomia

Os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e foram pré-anestesiados com xilasina (1,0mg kg), ketamina (20 mg kg) e maleato de acepromazina 1% (0,05mg kg⁻¹), por via intramuscular (IM) e receberam antibiótico profilático, sulfato de gentamicina (5mg kg⁻¹) via intravenosa, 30 minutos antes do início da intervenção.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal horizontal. Em seguida, foi cateterizada veia na orelha com dispositivo de polietileno de calibre n° 20 (Angiocath, Becton e Dickinson,) e instalada monitorização de

eletrocardiografia em duas derivações. Logo após a monitorização, seguiu-se a desnitrogenização com oxigênio a 100% e indução anestésica realizada com propofol em dose de 5 mg.kg⁻¹.

A cirurgia teve início com antissepsia da região cervical com PVPI tópico, colocação de campos estéreis, anestesia local com lidocaína 2%, sem vasoconstritor, na região cervical.

Foram realizadas cervicotomias medianas (longitudinais), após dissecação da traqueia, preservando sua porção lateral, responsável pela vascularização. Foi realizada uma traqueostomia na porção anterior da traqueia com ressecção de um retângulo de 10mm de largura por 20mm de comprimento (Figura 1).

Imediatamente após, os animais do grupo MA foram submetidos ao implante de uma porção da membrana amniótica 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 (Figuras 2 e 3). Após o término da sutura, os músculos pré traqueias foram aproximados por sutura contínua com fio de algodão número 0 agulhado (Figura 4).

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 utilizando-se anti-inflamatório não esteroide, (caprofen) Sterile Injectable Solution 5-9 mg/mL

Pfizer Animal Health,(Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine - FDA CVM, 2009).

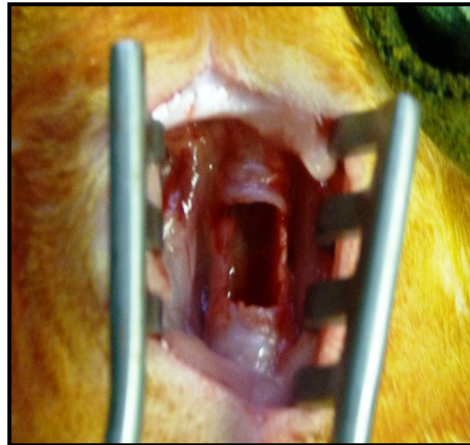


Figura 1: Retângulo do defeito traqueal



Figura 2: Enxerto de membrana amniótica

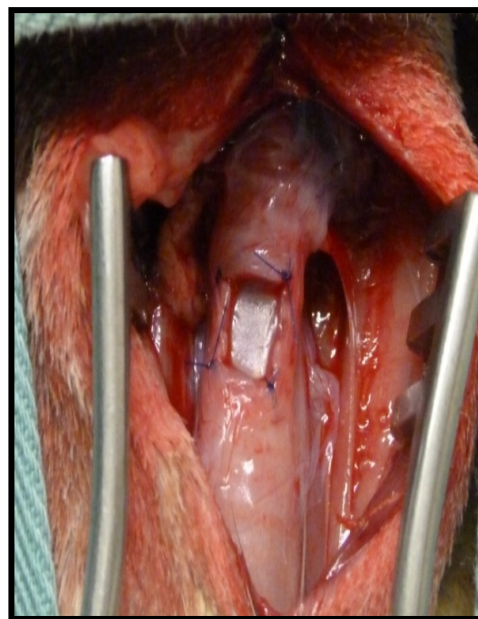


Figura 3: Fixação da membrana amniótica no defeito traqueal, através de quatro pontos suturados nas extremidades do retângulo



Figura 4: Aspecto da ferida operatória após o término da cirurgia

5.2 Preparo da Membrana Amniótica

5.2.1 Triagem das Membranas

As membranas amnióticas foram provenientes de doações voluntárias de gestantes a termo e que preencheram os seguintes critérios de inclusão:

- idade entre 20 – 30 anos
- sem antecedentes de co-morbidades
- sem história de intercorrências clínicas durante a gestação terem sido submetidas a cesariana com fetos normais
- exames sorológicos negativos para HIV, Vírus da hepatite B e C e sífilis.

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 (Millipore, Bedford, MA, EUA) com a face epitelial para cima (Figuras 5 A/B). Transportou-se o material para o laboratório e, a partir deste instante, todo manuseio ocorreu dentro da proteção do fluxo laminar. Removido os resíduos remanescentes, as membranas foram condicionadas em solução tampão fosfato contendo solução de dióxido de cloro (ClO_2) estabilizado em solução aquosa (8%) na concentração de 100 ppm, e mantidas sob agitação em temperatura ambiente por 20 minutos. Transcorrido este intervalo, efetuou-se a troca da solução por outra de solução tampão PBS 7,2. Posteriormente as membranas foram colocadas em papel filtro, com a porção epitelial voltada para cima e recortadas em fragmentos de aproximadamente 100mmx100mm, seguido de coleta de amostras para análises microbiológicas.

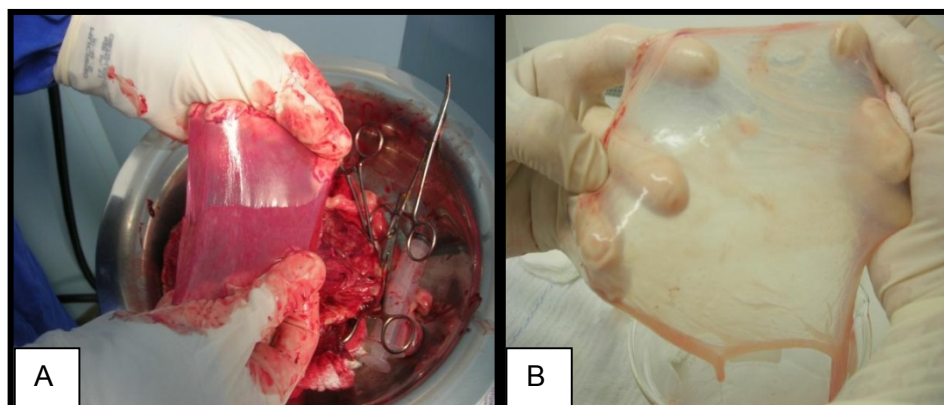
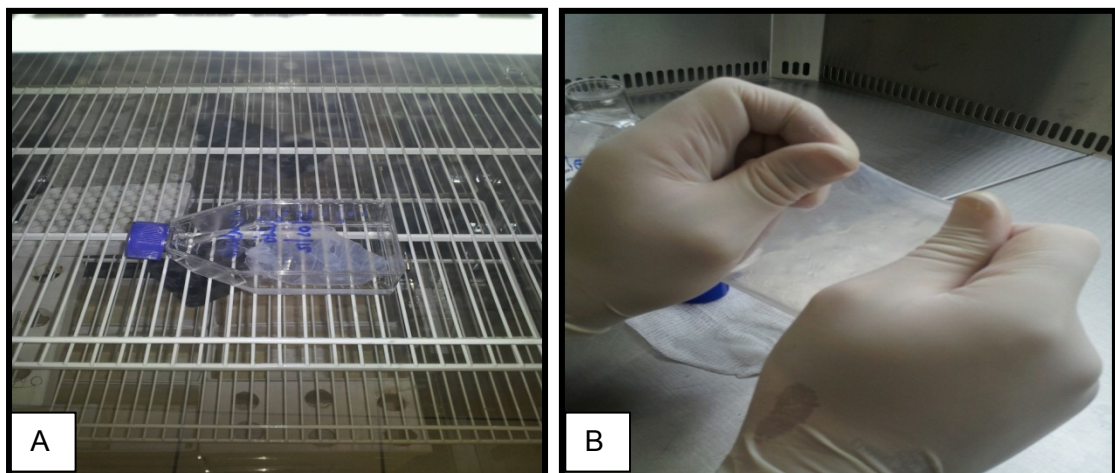


Figura 5: Manobra digitiforme de separação do âmnio do córion (A). Lavagem da membrana para retirada dos resíduos de sangue e córion (B)

5.2.2 Processo de descélularização da membrana amniótica

Todo o processo de descélularização foi realizado em uma em cabine de segurança biológica classe II BioSAFE (Veco®) e com técnica asséptica. Os fragmentos de membrana foram retiradas do meio (PBS) tampão fosfato pH 7.2 (Gibbco) e tratados com solução de SDS (dodecil sulfato de sódio, Calbiochem, Beeston, UK) a 0,01% e SD (desoxicolato de sódio, Calbiochem, Beeston, UK) a 0,01% por 24 horas a 37° C, com auxílio de agitador mecânico (Mesa agitadora 109M, Nova Ética Ltda). Em seguida foram conservadas em PBS a 4°C.(Figuras 6 A/B)

A efetividade do processo de descélularização pôde ser comprovada por amostragem em análise histológica com coloração HE (Hematoxilina e eosina) e MEV (microscopia de varredura).



Figuras 6: Processo de descélularização sob agitação da membrana (A). Membrana descélularizada (B).

Análise de microscópio eletrônico de varredura (MEV)

As membranas foram lavadas três vezes com PBS, fixadas em 2 paraformaldeído, glutaraldeído 2,5 em um tampão de fosfato 0,1M por 15 minutos e sentiu-se novamente por vezes em água destilada. Desidratação foi realizada em uma série de soluções de álcool etílico em concentrações crescentes (50, 70, 90 e duas vezes em 100), com um tratamento de desidratação de 5 minutos em cada solução. As amostras desidratadas foram mantidas durante à noite na estufa em vácuo à 25° C, depois de cada vez elas eram revestido em um suporte com ouro e examinados com A JEOL 6360LV SEM, Japão, operação de Tóquio, no Japão em 30 kV tensão de aceleração. O experimento foi repetido quatro vezes e respectivas fotografias foram tiradas cinco vezes.

5.2.3 Avaliação microbiológica das membranas

As membranas foram preparadas no Hospital Pequeno Príncipe de Curitiba-PR (Brasil), Instituto Pelé.

Em um total de 12 amostras, dois fragmentos de cada amostra foram tratados com antibiótico contendo 1000U/ml de penicilina, 20µg/ml de estreptomicina e 2,5 µg/ml de anfotericina B e outro com dióxido de cloro estabilizado 100 ppm. Posteriormente estes fragmentos foram inoculados em 2 ml de BHI e 4 ml de tioglicolato, em diferentes tempos.

Todo procedimento foi realizado com material estéril. Após a colocação em meio de cultivo líquido, as amostras foram incubadas em estufa a 37°C por até sete dias. Quando observado crescimento de microrganismos, as soluções foram replicadas em placas de ágar sangue e Sabouraud para cultivo dos microrganismos. Caso não houvesse crescimento as soluções eram desprezadas após sete dias. Métodos habituais de laboratório foram utilizados para identificação das colônias de microrganismos aeróbios e anaeróbios.

5.3 Eutanásia

Após sessenta dias, foram realizadas as eutanásias dos animais com dose letal de fentobarbital (100mg/kg/peso).

5.4 Análise Histológica

Após a eutanásia dos animais, foram dissecadas as traqueias e as mesmas retiradas até dois centímetros da Carina Principal, para análise histopatológica pós-implante.

Os fragmentos das traqueias foram preservados em frascos contendo formol 10% durante 72 horas. Após este período as traqueias foram clivadas em partes iguais. Foi realizada a desidratação dos cortes, sendo estes submetidos a banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90%, três banhos em álcool 100% no (Leica modelo TP1020), durante uma hora. Logo após foi impregnada parafina líquida nos cortes através de dois banhos a 65°C no mesmo aparelho. Os fragmentos foram emblocados em parafina e após o resfriamento foram cortados no micrótomo (Leica modelo RM2145) com espessura de 5µm. Os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados com solução de hematoxilina-eosina (HE) e Movat's. A Colocação em Movat's mostra a cartilagem em azul e a neocartilagem azul mais claro. Além disso, foram realizadas fotos macro das lâminas para que fosse possível analisar também o perímetro e a área das luzes das traqueias.

Através do programa *IMAGE PRO-PLUS*® 4.5, mídia Cybernetics, foi realizada, pelo mesmo avaliador, três vezes de modo manual, das fotos em "macro", a medida a luz traqueal dos dois grupos, e a partir dessas três medidas, foi realizada uma média, a qual foi utilizada como padrão e aplicada à análise estatística.

Realizaram-se as medidas dos perímetros e das áreas das imagens das lâminas tiradas em “macro”.

Todas as fotos continham a mesma régua ao lado, de forma que foi possível identificar o perímetro e área da luz das traqueias e, por uma escala numérica, proporcionalmente transformar esta medida em centímetros.

Foi realizada também análise por imunohistoquímica, com o seguinte anticorpo: Anti-AggreganARGxx mouse monoclonal (BC-3) (ab3773) – Abcam Inc. *Kendall Square Suite B2304, Cambridge, MA02139-1517 USA*. A titulação utilizada foi de 1:200.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos das medidas do perímetro e da área da luz traqueal, nas traquéias submetidas ao defeito, foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões.

Para a comparação entre os grupos (análise inter grupo) em relação ao perímetro e a área foi considerado o teste *t de Student* para amostras independentes. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

7 RESULTADOS

7.1 Seguimento pós-operatório

Os dois grupos foram mantidos por sessenta dias após os procedimentos cirúrgicos no Biotério da PUCPR, antes do sacrifício.

Nos animais do grupo MA houve apenas um óbito, por insuficiência respiratória apresentando sinais clínicos evidentes de estridor, taquipnéia, e baixa perfusão tecidual no pós-operatório imediato. Dois animais do grupo MA apresentaram abscesso encapsulado no local da cirurgia. Estes abscessos envolviam os planos musculares pré-traqueais e foram removidas no dia do sacrifício, antes da remoção da peça cirúrgica.

Nos animais do grupo controle identificaram-se dois óbitos pelos mesmos motivos acima descritos, relacionados à insuficiência respiratória.

7.2 Avaliação microbiológica das membranas

Do total de doze amostras de MA colhidas seis apresentaram crescimento bacteriano. A bactéria mais prevalente foi o *Staphylococcus coagulase negativo*, seguido pelo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Enterobacter sp.* E *Neisseria sp.*

As amostras contaminadas foram excluídas do estudo.

7.3 Processo de descelularização da Membrana Amniótica

7.3.1 Análise histológica

Foi realizada a análise da MA ao microscópio óptico, onde foi visibilizado que a MA apresentava-se intacta (Figura 7A) e após o processo de descelularização com ausência de células epiteliais e destruição da estrutura colágena em algumas camadas (Figura 7B).

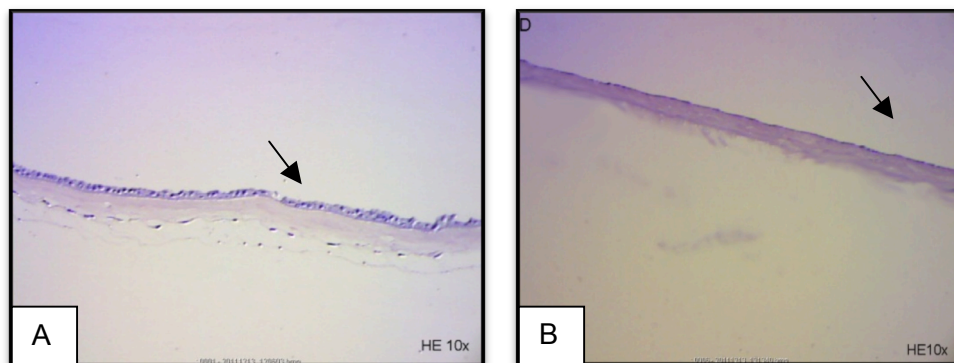


Figura 7: (A) representa MA intacta. (B) MA descelularizada: Nota-se a ausência completa de células epiteliais, porém com destruição da estrutura colágena em algumas camadas (coloração HE, aumento na objetiva 10x).

A análise por microscópio de varredura identificou-se a membrana amniótica antes a após o processo de descelularização (Figuras 8 A/B/C/D)

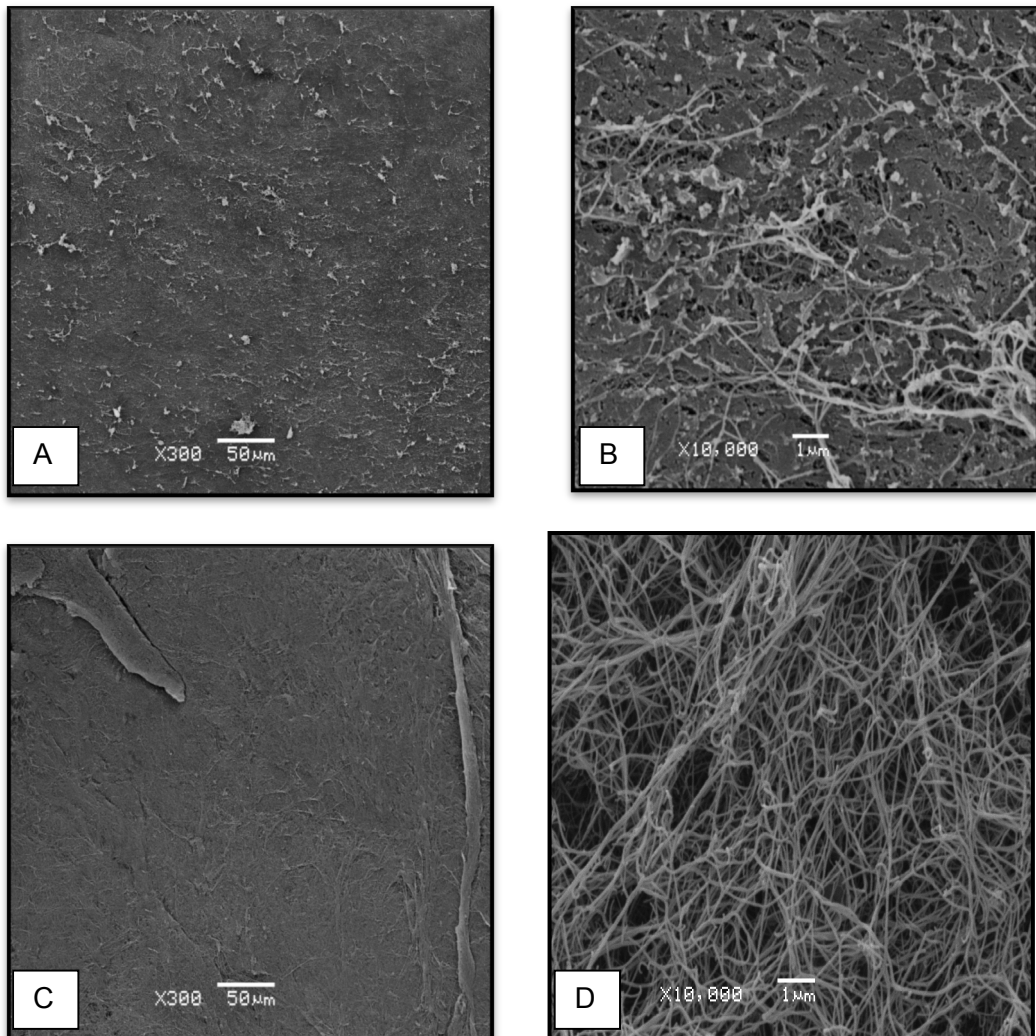


Figura 8: Membrana intacta A e B. Membrana descelularizada C e D. Microscopia de varredura. (Fig. C 300X/ Fig. D 10.000X-relacionado com a escala logo na porção inferior das figuras)

7.4 Medidas do Perímetro e Área da Traqueia

Todas as traqueias foram retiradas desde a laringe até dois centímetros da Carina Principal da árvore brônquica, como pode ser observado na Figura 9.



Figura 9: Traqueia retirada após a eutanásia a dois centímetros da Carina Principal

7.5 Análise Histológica

7.5.1 Análise Macroscópica

Foram realizadas as medidas das traqueias, como segue abaixo (Figura 10).

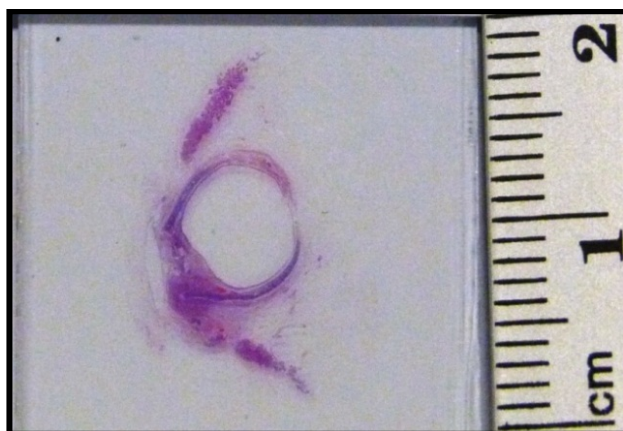


Figura 10: Análise macroscópica do local da lesão da traquéia, onde foram realizadas as medidas da área e do perímetro, pelo programa IMAGE PRO-PLUS® 4.5.

7.5.2 Análise dos resultados de Perímetro e Área

Para cada uma das medidas da luz das traqueias avaliadas (perímetro e área) foram feitas as comparações entre os grupos controle e MA no local da lesão traqueal. Os resultados são apresentados nas Tabelas 1 e 2 e nas Figuras 11 e 12.

Tabela 1. Variável: Perímetro no defeito (análise inter grupo)

Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Controle	8	1,70	1,70	1,34	2,00	0,23	
Membrana	9	2,07	1,98	1,81	2,52	0,25	0,006

*Teste t de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$

Os resultados indicam que existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à média do perímetro. Considerando-se os resultados obtidos pode-se afirmar que, em média, o perímetro do defeito no grupo controle é 18% menor do que este perímetro no grupo MA.

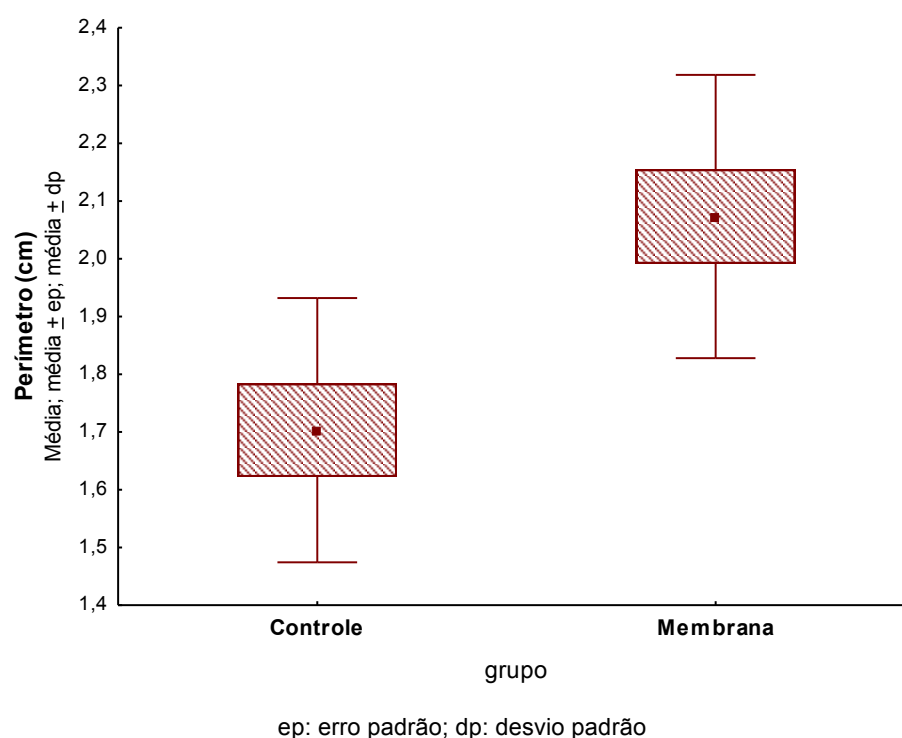


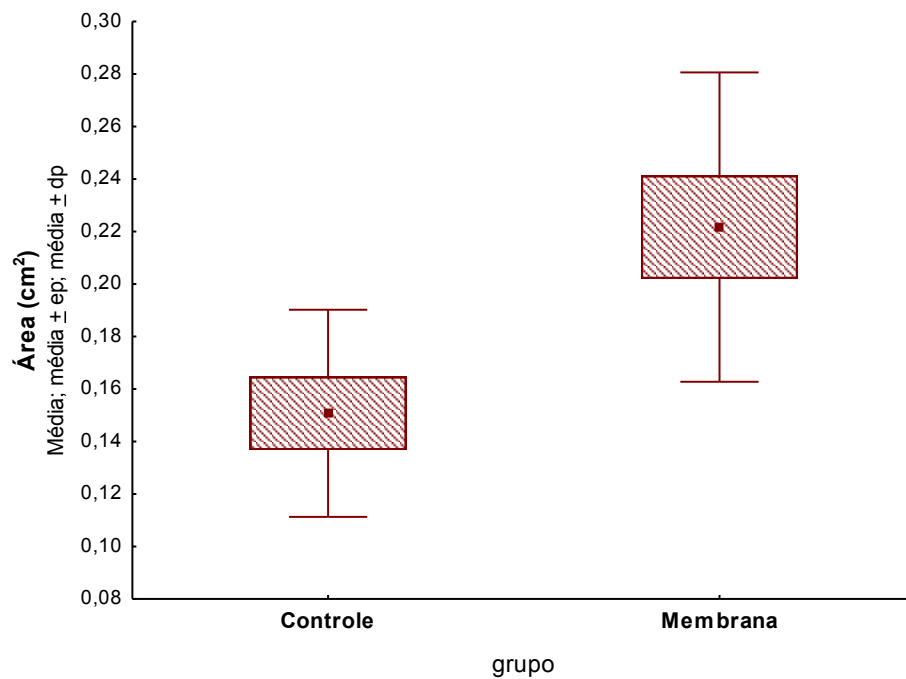
Figura 11: Perímetro no defeito dos grupos controle e MA

Tabela 2. Variável: área no defeito (análise inter grupo)

Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Controle	8	0,15	0,15	0,09	0,20	0,04	
Membrana	9	0,22	0,20	0,17	0,35	0,06	0,012

*Teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$

Em relação à área no defeito, foi identificada diferença significativa entre os grupos. Em média, a área do defeito no grupo controle é 32% menor do que a área do defeito no grupo MA.



ep: erro padrão; dp: desvio padrão

Figura 12. Área no defeito dos grupos controle e MA

7.6 Análise Microscópica

Foram realizadas as análises com Hematoxilina-Eosina (HE) e Movat's.

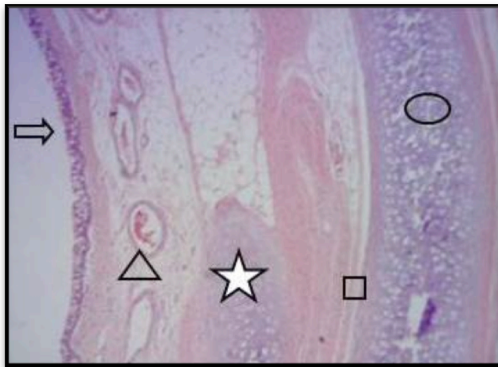


Figura 13

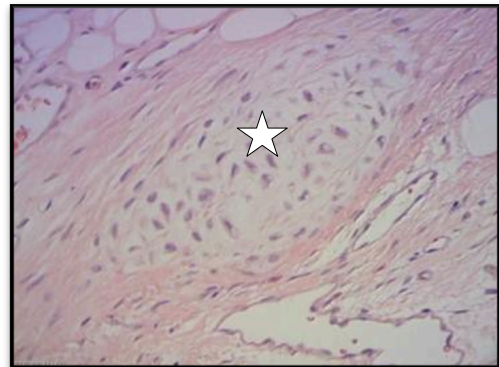


Figura 14

Figura 13: Lâmina do grupo MA no local do defeito. HE (4x), onde se identifica:

- ○ : Tecido cartilaginoso maduro
- ⇒ : Tecido epitelial pseudoestratificado ciliado
- □ : Tecido conjuntivo
- △ : Vasos sanguíneos
- ☆ : Tecido cartilaginoso Imaturo (ilhas)

Figura 14: Lâmina do grupo MA no local do defeito. (HE) (20x), onde identifica:

- ☆ : Tecido cartilaginoso Imaturo (ilha)

Através das imagens das lâminas acima, pode-se perceber que em sessenta dias já aparece a epitelização do tecido endotraqueal. Essas lâminas mostram áreas do defeito criado, onde o enxerto com MA foi fixado. Pode-se perceber a presença de tecido cartilaginoso imaturo, o que posteriormente não será possível de ser visto nas lâminas do grupo controle. A neovascularização também é evidente nas lâminas do grupo submetido ao enxerto.

O tecido conjuntivo é mais abundante e não totalmente organizado, visto que a eutanásia foi feita após sessenta dias. Talvez essa modelação possa ocorrer de forma diferente dessa que se apresentada, embora não seja significativamente importante neste estudo. No maior aumento, é possível ter uma clara visão de uma “ilha” de cartilagem imatura, onde os núcleos celulares são mais alongados do que na cartilagem madura, não tem uma coloração tão exuberante como na cartilagem madura na coloração por HE.

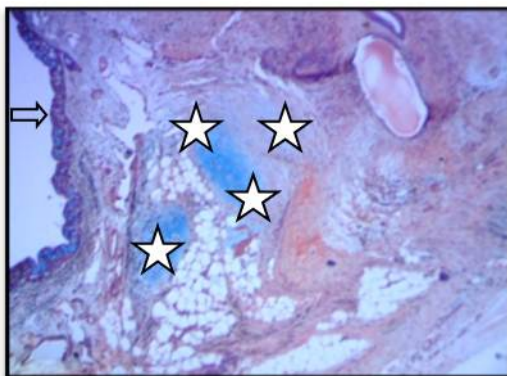


Figura 15

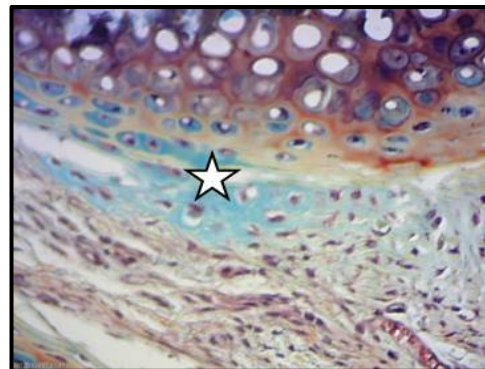


Figura 16

Figura 15: Lâmina do grupo MA no local do defeito. Movat's (4x)

- ☆ : Tecido Cartilaginoso imaturo
- ⇨ : Tecido Epitelial pseudoestratificadociliado
-

Figura 16: Lâmina do grupo MA no local do defeito. Movat's (20x)

As figuras 15 e 16, também são imagens microscópicas, do grupo MA. Essas lâminas submetidas a coloração de Movat's, onde o tecido cartilaginoso se apresenta na coloração azul, como pode-se observar nas imagens acima. Na Figura 15, onde se tem um visão panorâmica do local do defeito, ratifica-se a presença de tecido epitelial pseudoestratificado ciliado, assim observou-se também na coloração HE. Essa coloração também foi utilizada no grupo controle e o contraste fica claro pelas imagens.



Figura 17

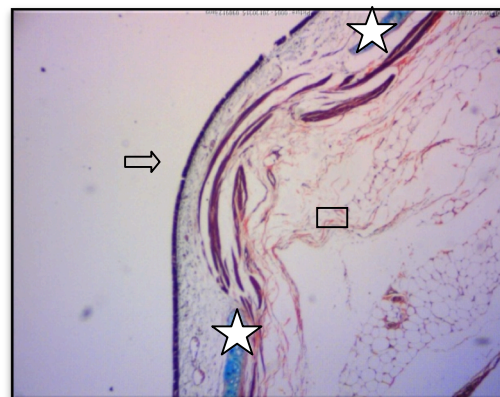


Figura 18

Figura 17: Lâmina do grupo controle. HE (4x)

Figura 18: Lâmina do grupo controle. Movat's (4x)

- ☆ : Tecido cartilaginoso imaturo
- ⇨ : Tecido epitelial pseudoestratificado ciliado
- □ : Tecido conjuntivo
- ✓ Nota-se que não há vasos sanguíneos nas lâminas do grupo controle

Nessas duas lâminas acima, são especificadas características do grupo controle, ou seja, onde só feita a traqueostomia e o fechamento dos músculos pré traqueais e pele.

A primeira imagem (figura 17) está corada em HE. Mostra um detalhe importante, há nas bordas do defeito pequena quantidade de tecido cartilaginoso imaturo. Mostra uma tentativa do organismo em fechar o defeito e repará-lo da forma como o era anteriormente ao trauma, embora isso não seja visto completamente. A cicatrização nas suas diferentes fases, “fecha” o defeito com fibrose / tecido conjuntivo, o mais rápido possível: o que pudemos perceber nesses sessenta dias em todas as lâminas. A epitelização endotraqueal já se mostra completa com tecido pseudoestratificado ciliado.

7.7 Análise Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi realizada com o anticorpo anti-agreccana e os cortes histológicos seguem abaixo:

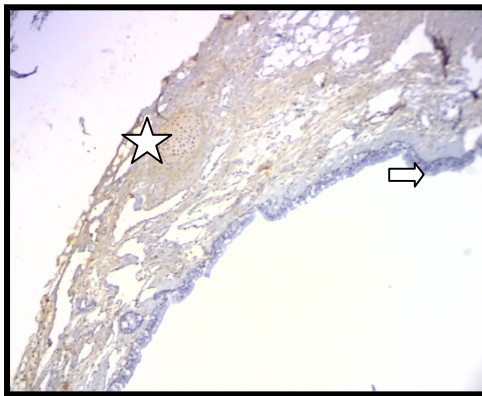


Figura 19

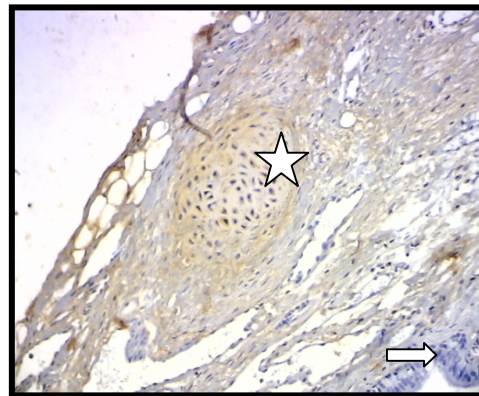


Figura 20

Figura 19 e 20: Lâmina corada com técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-aggrecan (grupo MA)

Com o intuito de comprovar a presença de tecido cartilaginoso, realizamos testes de imunohistoquímica para anticorpo anti-aggrecana, comprovando a presença de ilhas de cartilagem e a presença de completa epitelização da luz traqueal com tecido epitelial pseudoestratificado ciliado.

Fig. 20 (4x) e Fig. 21 (20x)

- ☆ : Ilha de Cartilagem imatura
- ⇨ : Tecido Epitelial pseudo estratificado ciliado

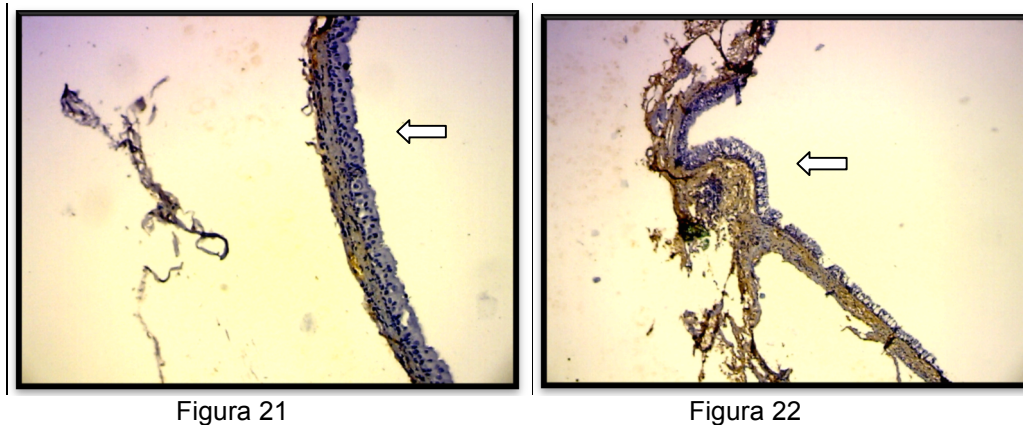


Figura 21 e 22: Lâmina corada com técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-aggrecan (grupo controle)

- como não há cartilagem , há apenas tecidos conjuntivo e de cicatrização.

A fixação dessas lâminas e sua coloração foi um processo de difícil execução, pois, havia pouca quantidade de cartilagem e essa não se podia fixar facilmente, se descolava da lâmina, deixando um aspecto bem pouco organizado. Na primeira imagem (figura 21), ainda consegue-se evidenciar a presença de tecido epitelial pseudoestratificado ciliado, já na segunda imagem (figura 22), não é possível observar muito, mas é evidente a ausência de tecido cartilaginoso imaturo ou neovascularização, já que essas lâminas são provenientes das traqueias do grupo controle, onde não houve enxerto de MA.

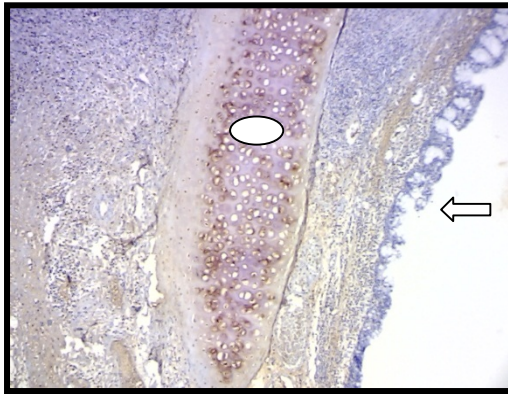


Figura 23

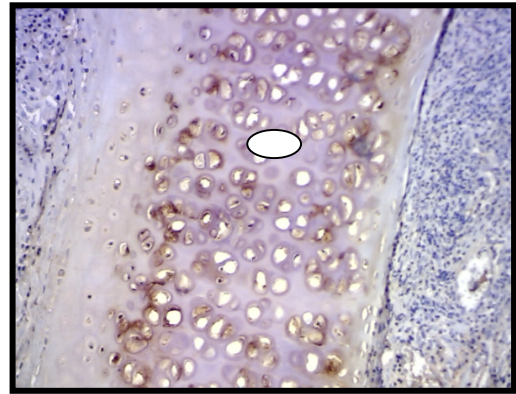


Figura 24

Figura 23 e 24: Lâmina corada com técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-aggrecan (mostra o padrão em colunas do anticorpo anti-aggrecan)

Fig. 22 (4x) e Fig. 23 (10x).

- ○ : cartilagem hialina – padrão característico do aggrecan
- ⇨ : tecido epitelial pseudoestratificado ciliado

Foi utilizado o anticorpo anti-aggrecana, como comprovação da imunohistoquímica pelo seu padrão na cartilagem hialina da traqueia. Ela exibe, quando corada pela imunohistoquímica, um efeito onde há muita aggrecana e outros locais onde não há essa mesma quantidade. Também, dentro do corpo traqueal da cartilagem observou-se um efeito listrado onde havia áreas exibindo uma forte coloração onde havia aggrecana. Isto foi observado ao longo de todas as seções da cartilagem traqueal, em fatias de

múltiplos e de todas as espécies animais observadas. Havia também algumas aggrecanas na coloração dos tecidos circundantes fora do anel de cartilagem.

8 DISCUSSÃO

Um problema cada vez mais freqüente identificado no sistema respiratório são as estenoses das vias aéreas superiores com um significativo aumento da morbimortalidade, sendo uma questão desafiadora, principalmente devido à complexidade relacionada as suas causas.

A membrana amniótica tem se mostrado um excelente curativo biológico e seu uso na medicina regenerativa vem aumentando, na medida em que aumenta o uso de biomateriais como curativos em tecidos lesionados ou doentes, devido a sua citoarquitetura e suas características regenerativas como: efeito antiadesivo, antibacteriano, proteção de feridas, redução da dor e reepitelização por facilitar a adesão e migração das células epiteliais basais, prevenir a apoptose e restaurar o fenótipo epitelial.⁽⁴⁾

A MA tem sido utilizada como curativo na reconstrução da superfície ocular substituindo o tecido conjuntival nas doenças cicatriciais da córnea e conjuntiva. O seu emprego tem se estendido a outras áreas da medicina como na reparação de queimaduras de pele, onfalocele e na prevenção de adesão tecidual em cirurgias da cabeça, abdome, pélvis, vagina e laringe.⁽⁴⁾

Existem diversas formas de tratamento de estenose de traquéia, porém nenhuma delas atinge um resultado suficientemente satisfatório, o tratamento cirúrgico, embora sendo o tratamento de escolha para a estenose de traqueia ainda não assegura eficácia satisfatória. Existe a possibilidade de reestenose, presença de infecção, deiscência de sutura e nesse caso o óbito pode ser em minutos.

Ainda existem complicações não relacionadas com a cirurgia propriamente dita, da traqueia: **1. Cardiogênicas:** muitas das estenoses

traqueais se originam no pós operatório de uma cirurgia cardíaca, geralmente, uma revascularização miocárdica e por isso os doentes podem ter várias alterações cardíacas. **2. Neurogênicas:** Muitos doentes, principalmente os jovens, tem seqüelas do trauma cranioencefálico que podem se acentuar durante a cirurgia traqueal se ocorrer hipotensão arterial ou hipóxia grave. No intuito de obter técnicas ou fatores que propiciem uma redução na incidência de estenoses traqueais, utilizando diferentes tipos de *stents* ou órteses.^(5,31,32)

Com isso, os métodos de engenharia tecidual estão ganhando importância na criação e confecção de novas próteses traqueais. O conceito da engenharia tecidual é baseado na ressemeadura “*in vitro*” de estruturas biológicas ou artificiais com células autólogas.⁽³³⁾

Por isso, uso da MA como matriz extracelular descelularizada neste estudo teve como objetivo não apenas servir para que as células, como os condrócitos dos próprios animais, colonizassem esta membrana, mas também testar a sua capacidade em evitar a estenose de traqueia.

A membrana amniótica descelularizada atua como arcabouço, membrana basal que suporta o crescimento do epitélio e facilita a migração de condrócitos. Sua camada basal possui colágeno tipo IV, laminina-1, laminina-5 e fibronectina, que desempenham papel importante na adesão celular que promovem diferenciação e previne a apoptose epitelial.⁽³⁴⁾

Muito tem sido pesquisado no intuito de se encontrar uma estratégia que crie uma prótese biocompatível e resistente em longo prazo.

Evidências anteriores apontam que a descelularização em biomateriais torna o tecido menos antigênico, induzindo menor resposta inflamatória e menor degeneração tecidual.⁽³⁵⁾

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.⁽³⁶⁾

Embora não haja consenso na literatura, preferimos pela completa remoção das células epiteliais devido ao fato de muitos autores indicarem bons resultados com culturas celulares em membranas descelularizadas em comparação com aquelas sobre epitélio íntegro ou parcialmente removido.

Tudorache I et al. em 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% e 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.

Neste trabalho utilizamos as duas primeiras substâncias juntas, porém em menor concentração, e obtivemos satisfatória descelularização das membranas amnióticas e sem interação com o processo químico de descontaminação demonstrada pela análise de microscopia eletrônica.

Relatos na literatura atual 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 seu implante.⁽³⁵⁾

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, S.Y. 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, TGFb1, bFGF e EGF, permaneçam presentes no tecido descelularizado.⁽³⁷⁾

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.⁽³⁸⁾

Em seus estudos, *Remlinger et col* utilizaram uma matriz extracelular hidratada xenogênica descelularizada (HDTM) de cartilagem com o objetivo de tratar defeitos traqueais em modelo experimental em cachorros. Os

autores sugeriram que a HDTM pode proporcionar força suficiente para sustentar as pressões do ciclo respiratório após o implante e também estimular o desenvolvimento do epitélio de cartilagem madura. Entretanto, a degradação do tecido cartilaginoso implantado sem uma adequada substituição derivada da cartilagem hospedeira, identificada nos achados da anatomia patológica, sugere que uma população de células mesenquimais provavelmente seria necessária para promover a neoformação de cartilagem.⁽³⁹⁾

Outros estudos propõem formas de tratar os defeitos traqueais sem indicação de correção cirúrgica pela técnica clássica, por meio da substituição de um segmento traqueal por materiais que imitam a forma tubular da traquéia. *Tsukada et al* utilizaram ovelhas na substituição de defeito traqueal de oito centímetros de comprimento utilizando segmentos de aorta da mesma espécie de animais. Além desse enxerto, foi utilizado um *stent* com dez centímetros de comprimento de silicone, para prevenir o colapso da via aérea. Os resultados após três meses de seguimento visibilizaram traqueíte severa, linfadenite, pneumonia e necrose do enxerto, sugerindo a falência do tratamento proposto.

Este mesmo estudo sugeriu utilizar a aorta semeada com condrócitos para a correção do defeito, entretanto a evolução e a tendência no momento é utilizar matrizes descelularizadas para que essas complicações não ocorram e que também não seja necessário instituir imunossupressão, o que poderia desencadear um processo com maior risco de infecção.⁽⁴⁰⁾

Neste trabalho, onde se implantaram membranas amnióticas descelularizadas com o intuito de substituto do defeito traqueal não foi utilizada a imunossupressão nos animais, corroborando com a sugestão dos autores anteriores, onde não foram identificadas complicações relacionadas à infecção no local do implante. Ainda observamos que, onde se implantaram membranas amnióticas descelularizadas quimicamente e descontaminadas com dióxido de cloro sobre a traqueia, observou-se após sessenta dias uma moderada infiltração de neutrófilos e discreta invasão de macrófagos e vasos neoformados.

Habitualmente após um implante tecidual, independente do local, ocorre sempre uma reação inflamatória tipo “reação de corpo estranho”. Essa inflamação pode ser boa num primeiro momento, pois deflagra a cicatrização da lesão, mas pode também levar à falência do implante. Reação de corpo estranho estimula liberação de células gigantes e macrófagos que produzem citocinas e atraem fibroblastos gerando fibroses.⁽⁴¹⁾ Em nosso estudo a superfície do lúmen traqueal na área da cirurgia apresentou-se, macroscopicamente, com aspecto uniforme analisado por morfometria, com uma estrutura delgada encobrendo a área de enxertia, sugerindo migração do epitélio por toda a superfície do retalho. Esse fato foi confirmado pela microscopia, revelando o aparecimento de células com características morfológicas semelhantes à condrócitos com formação de ilhas de cartilagem neoformada e surgimento de novos vasos sanguíneos, avaliados pelos exames de microscopia óptica coradas em HE,

Movat's e confirmadas pela imunohistoquímica, compatível com os resultados observados por (Baiguera, Birchallet *et al.* 2010).⁽⁴²⁾

Jin *et col* em 2007, ao utilizarem a membrana cultivada com condrócitos humanos para recuperação da cartilagem articular também observaram alta celularidade sobre a matriz com características morfológicas semelhantes a condrócitos com aumento no espessamento da membrana basal.⁽⁴³⁾

Apesar de o nosso estudo ter sido realizado com membrana amniótica descelularizada não cultivada com células, encontramos vasos neoformados na região transplantada demonstrando mais uma vantagem deste biomaterial. Este dado talvez tenha ocorrido pelo fato que já ter sido relatado que a MA descelularizada permaneça com os fatores angiogênicos, bem como a preservação de proteoglicanas, uma das principais componentes da matriz extracelular, que contribui para as características mecânicas do tecido através da atração de água, mas também se pensa ser um reservatório de vários fatores de crescimento, por vezes, quando estes não são facilmente produzidos e liberados pelas células residentes.^(35;44)

Em nosso estudo, pelo fato de terem sido identificados novos tecidos cartilagosos após o implante da membrana amniótica sobre a traquéia, acreditamos que as células do animal receptor migraram para o enxerto, colonizaram-no e iniciaram a síntese de matriz extracelular, regenerando a estrutura do tecido lesado. Esta suposição esta baseada em um estudo de *Olender et al*, que infere que a revitalização de tecidos ou seja, a semeadura de células nesses tecidos desvitalizados, mas afirma que

não é fundamental que o tecido seja semeado para que haja regeneração tecidual.⁽⁴⁵⁾

Embora os animais deste estudo tenham sido submetidos ao implante da MA nas lesões da traqueia e mantidos por sessenta dias de pós operatório, não é possível afirmar se o processo de regeneração tecidual e a aderência da MA junto á traqueostomia possa apresentar resultados diferentes caso os animais tivessem sido acompanhados por um tempo mais prolongado. Mas grande parte da literatura sobre implantes em traqueias de coelhos tem tomado por base sessenta dias e o mesmo número de amostragem de animais^(9;38)

Além dos resultados de regeneração celular, nosso estudo demonstrou que não houve estenose significativamente importante no local do enxerto, quando comparados com os coelhos do grupo controle. Tal fato pode ser explicado porque a membrana amniótica descelularizada apresenta baixo potencial de rejeição e outras características anteriormente citadas, fortalecendo áreas mais frágeis onde ocorre reabsorção cartilaginosa por tecido conjuntivo denso sem diminuição da luz traqueal.

Em um estudo proposto por *Dua et al*, também utilizando coelhos, o defeito foi realizado na parede anterior da traqueia em três anéis e 120° do diâmetro. Um grupo de quatro coelhos recebeu como enxerto submucosa intestinal porcina (SIS), outro grupo de quatro coelhos, recebeu enxerto de SIS submetido ao transplante de uma camada de células mesenquimais (SIS +MSC) e o outro grupo de coelhos era o controle. Doze semanas após os grupos SIS e controle mostraram áreas de fibrose densa na área

peritraqueal e protusão de tecido fibrótico no lúmen traqueal, ou seja, houve estenose. Nos animais do grupo SIS + MSC visibilizou-se menos infiltrado inflamatório, menos granulomas, entretanto com regeneração do epitélio pseudoestratificado colunar, sugerindo uma regeneração tecidual.⁽⁴⁶⁾

Foi utilizado o anticorpo anti-aggrecana, como comprovação da imunohistoquímica pelo seu padrão na cartilagem hialina da traqueia. Ela exibe, quando corada pela imunohistoquímica, um efeito onde há muita aggrecana e outros locais onde não há essa mesma quantidade. O que já havia sido comprovado em outro estudo, ratificou-se nesse nosso estudo: Também, dentro do corpo traqueal da cartilagem observou-se um efeito listrado onde havia áreas exibindo uma forte coloração onde havia aggrecana. Isto foi observado ao longo de todas as seções da cartilagem traqueal, em fatias de múltiplos e de todas as espécies animais observadas. Havia também algumas aggrecanas na coloração dos tecidos circundantes fora do anel de cartilagem.

Sabendo que a anastome término-terminal, quando possível de ser realizada, é o melhor tratamento nas estenoses de traqueia, com a engenharia de tecidos há um novo horizonte se abrindo através de vários estudos. Talvez a cirurgia pudesse ser realizada em dois tempos onde houvesse já neocartilagem capaz de ser utilizada para reconstrução do órgão. Outra possibilidade seria não utilizar o máximo de ressecção traqueal já estabelecido e citado, utilizando a membrana amniótica e todas as suas propriedades e neste caso não submeter a sutura dos cotos a uma tensão

demasiada e se fosse necessário uma segunda intervenção, que houvesse também neocartilagem para reconstrução da traquéia.

Outra questão a ser discutida seria o porquê a área onde foi feito o implante, nas lâminas e nas medidas de perímetro e área foram maiores que as do grupo controle. Uma implicação seria que a regeneração celular, aliada ao processo inflamatório que é inerente a qualquer procedimento cirúrgico. Pode ter havido tração da porção posterior da traqueia que é membranosa e bem flexível, já que em todas as lâminas, não há presença de redução da luz traqueal por granulomas ou fibrose.

Em resumo, a engenharia de tecidos tem mostrado novas oportunidades de tratamento das patologias traqueais e recriação de padrões mais próximos dos nativos.

Quanto aos processos de descelularização para a membrana amniótica bem como diversos tipos de biomateriais. Todos têm suas vantagens e desvantagens que podem levar ao sucesso ou à falência do implante.

Pelos trabalhos apresentados na literatura, a presença de fatores de crescimento se mantém mesmo após a descelularização do tecido. A partir dos resultados obtidos quando esse método é empregado, implica-se essa conclusão. Não havia possibilidade de crescimento de novos tecidos se o implante fosse um tecido inerte, sem nada a oferecer, apenas como um “tampa orifício”.

Portanto, muitas pesquisas serão ainda necessárias para se desvendar todo o potencial de uso da membrana amniótica na reconstrução

traqueal, mas podemos prever que ela possa ter importantes aplicações clínicas.

9 CONCLUSÕES

Baseados nos dados acima descritos identificou-se que houve:

- Presença de tecido cartilaginoso imaturo e de vasos sanguíneos na região onde foi previamente implantada a MA, sugerindo uma regeneração tecidual.
- Não houve estenose traqueal significativa do grupo submetido ao implante da MA em relação ao grupo controle.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grillo HC. Tracheal replacement: A critical review. *Ann Thorac Surg* 2002;73 (6):1995-2004; by de The Society of Thoracic Surgeons
2. Musah S, Chen J, Hoyle GW *Respir Res.* 2012 Nov 22;13(1):107
3. Okumus A, Cizmeci O, Kuvat SV, Kabakas F, Aslanov A, Yaprak B, et al. Comparison of different methods of circumferential tracheal reconstruction: an experimental study. *Kulak burun bogaz ihtisas dergisi: KBB = Journal of ear, nose, and throat.* 2007;17(3):158-66.
4. Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*1995 Sep;14(5):473-84.
5. Roberto Saad Junior, Walter Roriz de Carvalho, Manoel Ximenes Netto, Vicente Forte: Livro: *Cirurgia Torácica Geral*, 2 ed. rev. e ampl. - São Paulo: Editora Atheneu, 2011, pg163
6. Kashiwa K, Kobayashi S, Tono H, Nohara T, Honda T, Sakurai S. Reconstruction of the cervical trachea using a prefabricated corticoperiosteal flap from the femur. *Annals of plastic surgery.* 2009;62(6):633-6.
7. Yukihiro Tatekawa, MD, Yoshito Ikada, PhD., Hiroaki Komuro, MD, and Michio Kaneko, MD. *Journal of Surgical Research* 160, 114-121 (2010)
8. Hisashi Tsukada,MD, Sidhu Gangadharan, MD, Robert Garland, MD,RTT, Felix Herth, MD, Malcolm DeCamp, MD, and Armin Ernst, MD Harvard School. *Ann Thorac Surg* 2010;90:1793-8) by de The Society of Thoracic Surgeons
9. Remlinger NT, Czajka CA, Juhas ME, Vorp DA, Stolz DB, Badylak SF, Gilbert S, Gilbert TW. *Biomaterials.* 2010 May;31(13):3520-6. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.067. Epub 2010 Feb 7.

10. Guerrissi JO, Guerrissi JA, Miranda MG J Craniofac Surg. 2009 May;20(3):868-71. doi: 10.1097/SCS.0b013e3181a86e91.
11. Wurtz A, Hysi I, Zawadzki C, Soenen V, Hubert T, Banfi C, Jashari R, Copin MC. Eur J Cardiothorac Surg. 2012 Mar;41(3):663-8. doi: 10.1093/ejcts/ezr012. Epub 2011 Oct 18
12. Muharrem ÇAKMAK1, Akın Eraslan BALCI a1, Bengü ÇOBANOĞLU2, Mehmet Oğuzhan ÖZYURTKAN Fırat Tıp Dergisi 2010;15(4): 168-172
13. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. Johns Hopkins Med J1910;15:307.
14. Roth AD. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. Arch Ophthalmol1940;23:522-5.
15. Sorsby A, Symons hm. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye: (Burns of the second degree). Br J Ophthalmol1946 Jun;30(6):337-45.
16. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. Br J Ophthalmol1999 Jun;83(6):748-52.
17. John T. Human amniotic membrane transplantation: past, present, and future. Ophthalmol Clin North Am2003 Mar;16(1):43-65, vi.
18. Sachs BP, Stern CM. Activity and characterization of a low molecular fraction present in human amniotic fluid with broad spectrum antibacterial activity. Br J Obstet Gynaecol1979 Feb;86(2):81-6.
19. Kim JC, Tseng SC. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. Korean J Ophthalmol1995 Jun;9(1):32-46.
20. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal

epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol*2001 Apr;85(4):444-9.

21. Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun*1998 Sep;66(9):4222-8.
22. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta*1991 May-Jun;12(3):285-8.
23. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*2004 Jan-Feb;49(1):51-77.
24. Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res*2008 May;63(5):492-6.
25. Bigbie RB, Schumacher J, Swaim SF, Purohit RC, Wright JC. Effects of amnion and live yeast cell derivative on second-intention healing in horses. *Am J Vet Res*1991 Aug;52(8):1376-82.
26. Hopper RA, Woodhouse K, Semple JL. Acellularization of human placenta with preservation of the basement membrane: a potential matrix for tissue engineering. *Ann Plast Surg*2003 Dec;51(6):598-602.
27. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, et al. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials* 2008 Nov 17.
28. Kim JC, Tseng SC. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol*1995 Jun;9(1):32-46.

29. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials* Jan;31(2):216-25.
30. Richard D. Wemer, Michael Detamore, Robert A. Weatherly. Immunohistochemical characterization of the rabbit tracheal cartilages. *J. Biomedical Science and Engineering*, 2010, 3, 1006-1012.
31. Wanamaker JR, Eliachar I. An overview of treatment options for lower airway obstruction. *Otolaryngol Clin North Am* 1995;28:751-69.
32. Brichet A, Verkindre C, Dupont J, Carlier ML, Darras J, Wurtz A, et al. Multidisciplinary approach to management of postintubation tracheal stenoses. *Eur Respir J* 1999;13:888-93.
33. Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, Kirsch L, Hurschler C, Hilfiker A, et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2007; vol 16 n 5; 567-573.
34. Mamede, A. C., M. J. Carvalho, A. M. Abrantes, M. Laranjo, C. J. Maia and M. F. Botelho (2012). "Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications." *Cell Tissue Res* 349(2): 447-458.
35. Costa JNL, Pomerantzeff PMA, Braile DM, Ramirez VA, Goisses G, Stolf NAG. Comparação entre o pericárdio bovino descelularizado e o pericárdio bovino tradicional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2005; 20; 14-22.
36. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regenerations (Kim E.M. Benders, P. René van Weeren, Stephen F, Badylak, Daniel B. F. Saris, Wouter J.A. Dhert, and Jos Malda). *Trends in Biotechnology*, March 2013, vol.31. No3.
37. Chun, S.Y. et al. (2007) Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix. *Biomaterials* 28, 4251–4256

38. Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009 Jun;17(6):561-77.
39. Nathaniel T. Remlinger, Caitlin A. Czajka, Mark E. Juhas, David A. Vorp, Donna B Stolz, Stephen F. Badylak, Sebastien Gilbert, Thomas W. Gilbert. Hydrated xenogenic decellularized tracheal matrix as scaffold for tracheal reconstruction. *Biomaterials* 31 (2010) 3520-3526
40. Hisashi Tsukada MD, PhD , Armin Ernst MD, Sidhu Gangadharan, MD, Simon Ashiku, MD, Robert Garland, RTT, Diana Litmanovich, MD and Malcolm De Camp, MD *Ann Thorac Surg* 2010;89:253-8
41. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *European Cells and Materials.* 2008; 15: 88-99.
42. Baiguera, S., M. A. Birchall and P. Macchiarini (2010). "Tissue-engineered tracheal transplantation." *Transplantation* 89(5): 485-491.
43. Jin CZ, Park SR, Choi BH et al (2007) Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Eng* 13:693–702
44. Chun, S.Y. et al. (2007) Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix. *Biomaterials* 28, 4251–4256
45. E. Olender, I Uhrynowska-Tyszkiewicz, A Kaminski. Revitalization of Biostatic Tissue Allografts: New Perspectives in Tissue. *Transplant Proc.* 2011 Oct;43(8):3137-41. doi: 10.1016/j.transproceed.2011.08.069.
46. Xiao Fei Du, Seong Kwon, Jae-Jun Song, Chang Gun Cho, Seok- Won Park. Tracheal reconstruction by mesenchymal stem cells with small intestine submucosa in rabbits. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 76 (2012) 345-351.