

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BIOCOMPATIBILIDADE DE IMPLANTE DE CO-POLIAMIDA
ASSOCIADA À ELASTÔMERO TERMOPLÁSTICO (PCTPE)
CUSTOMIZADO POR IMPRESSORA TRIDIMENSIONAL EM
ANASTOMOSE TRAQUEAL DE COELHO (*Oryctolagus
cuniculus*)**

**Laise Michi Yamashiro
Médica Veterinária**

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BIOCOMPATIBILIDADE DE IMPLANTE DE CO-
POLIAMIDA ASSOCIADA À ELASTÔMERO
TERMOPLÁSTICO (PCTPE) CUSTOMIZADO POR
IMPRESSORA TRIDIMENSIONAL EM ANASTOMOSE
TRAQUEAL DE COELHO (*oryctolagus cuniculus*)**

Laise Michi Yamashiro

Orientador: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Lima de Andrade

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Cirurgia Veterinária.**

2019

Y19b Yamashiro, Laise Michi
Biocompatibilidade de implante de co-poliâmida associada à elastômero termoplástico (pctpe) customizado por impressora tridimensional em anastomose traqueal de coelho (*oryctolagus cuniculus*) / Laise Michi
Yamashiro. -- Jaboticabal, 2019
69 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Paola Castro Moraes
Coorientadora: Alexandre Lima Andrade

1. Materiais biomédicos. 2. Impressão tridimensional. 3. Traquéia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: BIOCOMPATIBILIDADE DE IMPLANTE DE CO-POLIAMIDA ASSOCIADA A ELASTÔMERO TERMOPLÁSTICO (PCTPE) CUSTOMIZADO POR IMPRESSORA TRIDIMENSIONAL EM ANASTOMOSE TRAQUEAL DE COELHO (*Oryctolagus cuniculus*)

AUTORA: LAISE MICHY YAMASHIRO
ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES
COORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / Unesp - Jaboticabal


Prof. Dr. SILVIO HENRIQUE DE FREITAS
Departamento de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais-FZEA/USP / Pirassununga/SP


Prof. Dr. BRUNO WATANABE MINTO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 25 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Laise Michi Yamashiro, nasceu em São Paulo-SP, aos 15 de janeiro de 1991. Cursou graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Campus Araçatuba, de março de 2010 a dezembro de 2014. Realizou Residência em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP- Campus de Araçatuba de março de 2015 a fevereiro de 2017. Em março de 2017, ingressou no programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, curso de mestrado, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, sob orientação da Professora Doutora Paola Castro Moraes.

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

José Saramago

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Kazuya Yamashiro e Silmara A. Yamashiro, à minha irmã Larisse M. Yamashiro e a todos os animais, sem os quais, não seria possível a realização desse trabalho.



Fonte: arquivo pessoal

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente a Deus, Meu Pai, que me abençoou com essa vida, sempre iluminando meu caminho e me dando sabedoria e discernimento para chegar até aqui.

Aos meus pais, razões da minha vida, Kazuya Yamashiro e Silmara Aparecida Vascon Yamashiro, por me apoiarem infinitamente em todos os momentos e possibilitarem a realização dos meus objetivos.

À minha irmã, Larisse Miki Yamashiro, por completar minha vida e estar sempre comigo.

Aos meus avós, Isamo Yamashiro, Chieco Yamashiro, Neusa Campos Vascon, e familiares, que sempre torceram por mim.

A Fernanda Paes pelos conselhos tanto profissionais, como pessoais, por me mostrar que a pós-graduação é feita para mentes curiosas, engenhosas e ao mesmo tempo humildes. Te admiro muito. Sou grata por ter compartilhado essa etapa da vida com você. Obrigada por estar ao meu lado.

Aos meus animais, Grince e Charlote, que proporcionam mais alegria e leveza à minha vida.

À Profa. Paola Castro Moraes, pela oportunidade de me receber como orientada em sua equipe e desenvolver em mim qualidades e habilidades muito além das profissionais. Sou grata por todo o companheirismo, amizade e paciência, por sempre confiar nas minhas ideias e propósitos e incentivar cada passo dado. Obrigada por direcionar nossos projetos com tanta vontade, pelas correções e ensinamentos.

Ao Prof. Alexandre Lima Andrade, por ter apoiado a minha decisão de ir buscar novo conhecimento na Unesp de Jaboticabal e por compartilhar sua inteligência criativa. Foi através dos seus projetos com biomateriais na Unesp de Araçatuba que surgiu a ideia desse trabalho.

Ao doutorando Thiago André Salvitti de Sá Rocha, que através da sua enorme sabedoria sobre impressão em três dimensões, acreditou nos meus propósitos e confeccionou com maestria o implante utilizado. Fico muito feliz por ter trabalhado contigo e ter dividido o seu conhecimento comigo.

Aos membros do Serviço de Cirurgia de Tecidos Moles da Unesp de Jaboticabal, residentes e pós-graduandos, principalmente Juliana Ribeiro e Gabriel Montanhim e ao Cleber Ido que estiveram presentes em etapas cruciais do projeto, sempre dispostos e levando mais alegria para esses momentos.

Ao Fernando Fernandes, grande amigo, que aceitou com muito entusiasmo participar do projeto. Obrigada por dividir o seu conhecimento com seriedade e singeleza.

A minhas amigas e companheiras de apartamento Mayara Baller e Tamyris Beluque que fizeram a minha passagem por Jaboticabal ser muito feliz, pelas conversas em frente à televisão, por toda a ajuda e pela parceria, nossa despedida é momentânea e nos veremos em breve. E ao cachorrinho John que trouxe muita felicidade para a nossa casa.

Aos meus amigos de Araçatuba que convivem comigo até os dias de hoje, Adriana Lima Kandrotas, Tairini Cruz, Thainá Landim de Barros, Juliana Massunari, Ana Carolina Martinez Albuquerque, Renata Haddad Pinho, Jessica Motta, Carlos Eduardo de Siqueira e Bruno Ribas, pelo apoio, por cada conversa e por sempre compartilharem momentos felizes.

Obrigada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp Jaboticabal pela oportunidade de aprendizado, ensino e pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

Página

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE APÊNDICES	xi
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Anatomia	13
2.2 Incidência e Etiologia.....	14
2.3 Reconstrução Traqueal.....	16
2.4 Impressão em 3 dimensões na Área Médica	17
3. OBJETIVO.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Aspectos Éticos	19
4.2 Modelo Experimental	19
4.3 Prótese em 3D.....	20
4.4 Protocolo Anestésico	23
23	
4.5 Procedimento Cirúrgico	24
4.6 Avaliação Pós-Operatória	27
4.7 Avaliação Clínico Cirúrgica e Eutanásia.....	27
4.8 Avaliação Macroscópica	27
4.9 Análise Histopatológica.....	28
4.9.1 Critério para avaliação da biocompatibilidade da prótese	29
4.10 Análise Estatística	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1 Avaliação Clínico-cirúrgica.....	30
5.2 Avaliação Macroscópica	30
5.3 Análise Histopatológica.....	35

6.	DISCUSSÃO	42
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	49
8.	CONCLUSÕES	49
9.	REFERÊNCIAS.....	50
10.	APÊNDICES.....	58

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



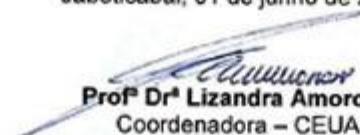
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise da biocompatibilidade de implante de co-poliâmida associada à elastômero termoplástico (PCTPE) confeccionado por impressora tridimensional em traqueia de coelho (*Oryctolagus cuniculus*)", protocolo nº 007989/17, sob a responsabilidade do Prof^º. Dr^º. Paola Castro Moraes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 01 de junho de 2017.

Vigência do Projeto	03/07/2017 a 20/09/2017
Espécie / Linhagem	Coelhos Nova Zelândia Branco
Nº de animais	20
Peso / Idade	± 3 Kg / 3 Meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central UNESP Botucatu

Jaboticabal, 01 de junho de 2017.


Prof^º Dr^º Lizandra Amoroso
 Coordenadora – CEUA

BIOCOMPATIBILIDADE DE IMPLANTE DE CO-POLIAMIDA ASSOCIADA À ELASTÔMERO TERMOPLÁSTICO (PCTPE) CUSTOMIZADO POR IMPRESSORA TRIDIMENSIONAL EM TRAQUEIA DE COELHO (*Oryctolagus cuniculus*)

RESUMO - O escopo do presente trabalho visa a análise da reparação tecidual traqueal, viabilidade e biocompatibilidade de implante manufaturado tridimensionalmente por método de modelagem por fusão e deposição de copoliâmida associado a elastômero termoplástico aplicado por técnica de anastomose, em coelhos. Quinze animais foram divididos em três grupos homogêneos, referentes aos momentos das eutanásias programadas: sete, 15 e 30 dias. Sinais de caráter clínico e cirúrgico foram observados diariamente durante o tempo de sobrevivência de cada grupo, indicando ausência de sinais respiratórios e complicações com a técnica de implantação. Avaliações macroscópicas foram realizadas, para verificar o comportamento tecidual perante a inserção do biomaterial por inspeção direta, assim como análise histopatológica em coloração hematoxilina-eosina para investigação das reações celulares locais. Os resultados dos estudos citados à cima foram aplicados ao teste Exato de Fisher, sob significância de 5% ($p < 0,05$). Não houve deformidade traqueal, deiscência de sutura e luxação da prótese em nenhum animal do projeto. Processo inflamatório de padrão misto foi notado em todos os tempos explorados de forma decrescente, presença de crescimento tecidual sob implante conforme a reparação do organismo frente a prótese ocorreu de forma progressiva e houve escassez de células gigantes, comprovando ausência de reação tipo corpo estranho, revelando boa aceitação do implante e do material proposto na reparação de tecido traqueal. Dessa forma, conclui-se que a prótese traqueal biomimética oferece facilidade de fabricação, características estruturais adequadas, não tóxica, favorecendo a função anatômica e ótima integração biológica.

Palavras-chave: biomaterial, impressão 3D, prótese traqueal, reparação tecidual

BIOCOMPATIBILITY OF CO-POLYAMIDE IMPLANT ASSOCIATED WITH THERMOPLASTIC ELASTOMER (PCTPE) CUSTOMIZED BY THREE-DIMENSIONAL PRESSURIZER IN RABBIT TRACEY (*Oryctolagus cuniculus*)

ABSTRACT - The scope of the present work aims at the analysis of the tracheal tissue repair, viability and biocompatibility of a three-dimensional manufactured implant by fusion molding and co-polyamide deposition associated with thermoplastic elastomer applied by anastomosis technique in rabbits. Fifteen animals were divided into three homogeneous groups, related to the euthanasia moments programmed: seven, 15 and 30 days. Signs of clinical and surgical character were observed daily during the survival time of each group, indicating absence of respiratory signs and complications with the implantation technique. Macroscopic evaluations were performed to verify the tissue behavior before insertion of the biomaterial by direct inspection, as well as histopathological analysis in hematoxylin-eosin staining to investigate the local cellular reactions. The results of the above-mentioned studies were applied to Fisher's exact test, in a significance of 5% ($p < 0.05$). There was no tracheal deformity, suture dehiscence, and dislocation of the prosthesis in any animal of the project. Inflammatory process of mixed pattern was observed at all times explored decreasingly, presence of tissue growth under implant as the repair of the organism before the prosthesis occurred progressively and there was a shortage of giant cells, proving absence of foreign body type reaction, revealing good acceptance of the implant and of the proposed material in the repair of tracheal tissue. Thus, it is concluded that the biomimetic tracheal prosthesis offers ease of manufacture, adequate structural characteristics, non-toxic, favoring the anatomical function and optimal biological integration.

Keywords: 3D printing, biomaterial, tissue repair, trachea implant

LISTA DE ABREVIATURAS

3D	Três dimensões
7d	Sete dias
15d	Quinze dias
30d	Trinta dias
ASTM	American Society for Testing and Material
CAD	Computer-aided design
CD	Craniocaudal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CR	Cranial
ETC	Estenose Traqueal Congênita
FMD	Fused Deposition Modeling
GP	Grupo Prótese
HE	Hematoxilina-Eosina
IM	Intramuscular
kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N	Número
PCTPE	Co-Poliamida Associado à Elastômero Termoplástico
PLGA	Polí Ácido Láctico-co-Glicólico
STL	Stereolithography Format
TC	Tomografia Computadorizada
UNESP	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
≥	Maior e igual

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Dados do estudo estatístico da avaliação macroscópica referente ao processo de biocompatibilidade das próteses traqueais impressas em impressora 3D utilizadas em coelhos dos grupos de sete, 15 e 30 dias. Jaboticabal, 2018.	31
Tabela 2. Dados do estudo estatístico da avaliação microscópica referente ao processo de biocompatibilidade das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos dos grupos de sete, 15 e 30 dias. Jaboticabal, 2018.	39

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	<p>Prótese projetada em programa computacional de prototipagem tridimensional Solidworks 2016. Comprimento = 15 mm, diâmetro de circunferência cranial 4 mm, diâmetro de circunferência caudal 5 mm, espessura da parede = 0,5 mm. A análise da espessura da parede é marcada por tons alaranjados, sendo sempre do mesmo tom como demonstrado pela projeção digital, por possuir uniformidade constante da parede = 0,5 mm, sem deformações. Fonte: Arquivo pessoal.</p> <p>.....</p>	21
Figura 2.	<p>Prótese no ato de impressão em três dimensões pelo método de modelagem por fusão e deposição em impressora da marca Prusa modelo I3. (B) Imagem fotográfica das próteses traqueais confeccionada em impressora em três dimensões com nylon associado a elastômero termoplástico. Fonte: Arquivo pessoal.</p> <p>.....</p>	22
Figura 3.	<p>Sequência de imagens fotográficas de implantação da prótese traqueal confeccionada em impressora 3d, em coelhos. (A) Exposição e isolamento do órgão através da aplicação de fio de reparo cranial (CR) e caudal (CD) ao local da incisão (B). Ressecção total em 360 graus da traqueia na altura do 5º anel traqueal até o anel 8º gerando o defeito. (C) Implante de PCTPE manufaturado por impressora 3D ajustado para ser suturado no interior da borda cranial da traqueia de coelho. (D) Sutura simples separada armada em borda cranial da traqueia de coelho. Fonte: Arquivo pessoal.</p> <p>.....</p>	25
Figura 4.	<p>Prótese traqueal de PCTPE confeccionada em impressora 3D implantada em traqueia de coelho. Padrão de sutura ponto simples separado em quatro pontos cardeais nas extremidades da prótese e borda cranial (CR) e caudal (CD) traqueal, utilizando nylon 3-0 agulhado. Fonte: Arquivo pessoal.</p>	26

- Figura 5.** (A) Preparo de retalho do músculo esternohioideo. (B) Retalho do músculo esternohioideo acomodado sobre a junção traqueia/prótese em segmento cranial (CR) e caudal (CD). Fonte: Arquivo pessoal. 26
- Figura 6.** Momento imediato pós eutanásia do grupo de sete dias. (A) Exposição de traqueia cervical, no local da implantação, para observar reações como deiscência da sutura, aderência e reações sugestivas de infecção ou tipo corpo estranho. Tais achados foram graduados. Notar ausência de deiscência de sutura e aderência tecidual discreta. (B) Peça cirúrgica – Traqueia de coelho com prótese de PCTPE confeccionada em impressora 3D. Observar ausência de recobrimento tecidual. Fonte: Arquivo pessoal. 33
- Figura 7.** Momento imediato pós eutanásia do grupo de 15 dias. (A) Exposição de traqueia cervical, local da implantação, para observar reações como deiscência da sutura, aderência e reações sugestivas de infecção ou tipo corpo estranho. Tais achados foram graduados. Notar ausência de deiscência de sutura e aderência tecidual moderada. (B) Peça cirúrgica – Traqueia de coelho com prótese de PCTPE confeccionada em impressora 3D. Observar recobrimento tecidual moderado. Fonte: Arquivo pessoal. 34
- Figura 8.** Momento imediato pós eutanásia do grupo de 30 dias. (A) Exposição de traqueia cervical, local da implantação, para observar reações como deiscência da sutura, aderência e reações sugestivas de infecção ou tipo corpo estranho. Tais achados foram graduados. Notar ausência de deiscência de sutura e aderência tecidual moderada. (B) Peça cirúrgica – Traqueia de coelho com prótese de PCTPE confeccionada em impressora 3D. Observar recobrimento tecidual importante. Fonte: Arquivo pessoal. 35

- Figura 9.** Fotomicrografia do segmento distal de interface entre prótese e traqueia de coelho – grupo de sete dias, coradas com hematoxilina e eosina (HE). Corte histológico mostra da direita para a esquerda, camada adventícia com congestão acentuada (setas brancas, submucosa com infiltrado inflamatório difuso moderado e edema (asterisco), e mucosa com ausência de epitélio ciliado. Conteúdo intraluminal discreto constituído por restos celulares e hemácias (seta preta). Objetiva 10 X. Fonte: Arquivo pessoal. 36
- Figura 10.** Fotomicrografias de traqueia de coelho – grupo de 15 dias, coradas com hematoxilina e eosina (HE). (A) Segmento proximal da região de interface entre prótese e traqueia. Corte histológico revela mucosa (seta preta) com destruição das células do epitélio ciliado, apresentando arrasamento celular, acompanhando intenso infiltrado inflamatório associado a edema importante e congestão moderada difusa (asterisco) da camada submucosa. Objetiva 20x. (B) Segmento proximal da região de prótese. Observa-se proliferação de tecido conjuntivo fibroso organizado (asterisco vermelho), com formação de pequenos vasos, apresentando infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear discreto a moderado. Objetiva 20x. Fonte: Arquivo pessoal. 37
- Figura 11.** Fotomicrografias de traqueia de coelho – grupo de 30 dias, coradas com hematoxilina e eosina (HE). (A) Segmento distal da região de prótese. Corte histológico evidenciando espaço ocupado pela prótese (asterisco azul). Nota-se à esquerda da prótese, conteúdo intraluminal constituído por restos celulares, células inflamatórias e hemácias. À direita da prótese, presença de tecido conjuntivo recobrando a prótese. (Objetiva 4x) (B) Segmento distal da região de interface entre prótese e traqueia. Notar área de cartilagem (asterisco amarelo), a direita, infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear acentuado, congestão e edema acentuado difuso em camada submucosa. Observa-se a alta celularidade do tecido associado a congestão marcada, caracterizada pela dilatação de vasos preenchidos por hemácias (seta preta). Objetiva 10x. Fonte: Arquivo pessoal. 38

LISTA DE APÊNDICES

	Página
Apêndice 1. Critérios da avaliação macroscópica das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos do grupo de sete dias. Jaboticabal, 2018.	58
Apêndice 2. Critérios da avaliação macroscópica das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos do grupo de 15 dias. Jaboticabal, 2018.	58
Apêndice 3. Critérios da avaliação macroscópica das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos do grupo de 15 dias. Jaboticabal, 2018.	59
Apêndice 4. Critérios da análise histopatológica das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos do grupo de sete dias. Jaboticabal, 2018.	59
Apêndice 5. Critérios da análise histopatológica das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos do grupo de 15 dias. Jaboticabal, 2018.	60
Apêndice 6. Critérios da análise histopatológica das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos do grupo de 30 dias. Jaboticabal, 2018.	60

1. INTRODUÇÃO

Os defeitos traqueais têm sido alvo de estudos experimentais e clínicos desde o século XIX, com o propósito de restabelecer a viabilidade da via aérea superior (Grillo, 2002). As injúrias traqueais, na maioria das vezes, são consequências de problemas após intubação, traumas, compressão por tumores e, em algumas situações, por alterações congênitas, tuberculose, blastomicose ou ainda idiopáticas (Musah et al., 2012).

Doenças obstrutivas congênitas em cães como estenose, colapso e hipoplasia traqueal são descritas por Slatter (1985). A hipoplasia da traqueia é condição frequente em cães com a Síndrome do Braquicefálico, presente em 39% dos casos estudados por Fasanella et al. (2010) e 53,9% no estudo elaborado por Riecks et al. (2007). A estenose inflamatória traqueal e a malácia são consequências de trauma e isquemia da mucosa respiratória, produzida pelo tubo endotraqueal ou tubo de traqueostomia. O resultado dessa agressão é inflamação e fibrose, que pode ser grave e comprometer toda a parede traqueal, levando não apenas à diminuição do lúmen das vias aéreas, mas também à perda de seu suporte cartilaginoso e colapso traqueal, resultando em malácia (Courey, 1995; Grillo et al., 1995).

A iniciativa por pesquisas de substituição traqueal promoveu a utilização de próteses equivalentes a condutos tubulares, as quais provaram ser ineficazes. A traqueia pode ser encurtada em 50% do seu comprimento em humanos adultos, e cerca de 1/3 em crianças pequenas sendo submetida à anastomose primária término-terminal, tornando este o padrão ouro de tratamento. Contudo, não se pode generalizar que todas as moléstias traqueais possam ser corrigidas por essa técnica, principalmente quando o defeito é maior do que os valores relatados acima, sendo os principais desafios na reconstrução traqueal os riscos de infecção, extrusão, obstrução, estenose e rejeição crônica (Grillo, 2002). Em decorrência a esses obstáculos, o emprego de materiais autólogos, heterólogos ou sintéticos são utilizados para a correção de defeitos traqueais. No entanto, as respostas não são satisfatórias e, portanto, ainda não fora encontrado até o presente momento, um conduto de ar

2 Impressora 3d - rerap - prusa i3 - multivisi comércio e importação eireli – Uberlândia - MG

3 Taulman nylon bridge 3d printing filament - Bridge - USA

com a flexibilidade e rigidez necessárias para a substituição deste órgão (Musah et al., 2012).

A impressão em três dimensões (3D) é campo promissor que já está emergindo como ferramenta crítica para o cirurgião de cabeça e pescoço, além da otorrinolaringologia pediátrica. Tem potencial para fornecer modelos médicos rápidos e personalizados para auxílio no planejamento cirúrgico. A tecnologia da impressão em três dimensões surgiu como importante adjunto para uma variedade de aplicações craniofaciais (Kaye et al., 2016).

As preocupações com a reconstrução da traqueia são crescentes nos últimos anos. Esta informação é facilmente identificada ao se analisarem as publicações no Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com a pesquisa da palavra chave *tracheal prosthesis*. Durante o período de 2010 a 2017, 912 publicações foram indexadas no Pubmed sobre o tema.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia

A traqueia dos mamíferos se estende da cartilagem cricoide da laringe até a carina, porção de bifurcação em brônquios principais direito e esquerdo. Anteriormente, é composta de anéis cartilagosos em forma de ferradura, formando dois terços de sua circunferência e, posteriormente, por uma porção membranosa conectando os anéis. (Laroia et al., 2010).

Em seres humanos adultos, a traqueia dispõe de 12 a 15 cm de comprimento, e seu diâmetro varia entre seis a oito mm, conforme a idade e o sexo, variando de 16 a 20 anéis cartilagosos (Gardner et al., 1963; Junqueira e Carneiro, 2008). A traqueia canina confere de 15 a 22 cm de comprimento e seu lúmen tem entre 16 a 25 mm. Sob extensão, a traqueia do cão pode chegar a 30 cm. Há cerca de 32 a 47 anéis traqueais, o dobro do encontrado no homem. No coelho, a extensão traqueal varia de 12 a 18 cm (Fergusson et al., 1950).

2 Impressora 3d - rerap - prusa i3 - multivisi comércio e importação eireli – Uberlândia - MG

3 Taulman nylon bridge 3d printing filament - Bridge - USA

A mobilidade é possível devido à cartilagem ser formada por anéis individuais conectados por ligamentos fibroelásticos, ao invés de uma lâmina contínua. A traqueia apresenta uma parte cervical e uma torácica. O segmento cervical alonga-se da laringe à primeira costela, e a traqueia torácica comporta a porção da primeira costela até a carina. A camada mucosa é composta de epitélio colunar ciliado pseudo-estratificado, com células caliciformes; as glândulas tubulares secretoras de muco situam-se na submucosa. As células ciliadas do epitélio fazem parte do sistema de transporte mucociliar, propelindo o muco e os debris inspirados em direção à faringe. Do mesmo modo que outros tecidos do organismo, a traqueia dispõem de limitações para responder a uma agressão (Grandage e Richardson, 1998; Ettinger et al., 2004; Fingland, 2005).

2.2 Incidência e Etiologia

A traqueia pode sofrer agressões de caráter contuso (lesões por esmagamento ou estrangulamento) e penetrantes (Pereira et al., 2011). Lacerações traumáticas na traqueia não são corriqueiras em animais de companhia, mas podem advir de resultados de atropelamentos, feridas por mordeduras no pescoço, acidentes com projéteis de arma de fogo, iatrogênica no lavado traqueal, da superinsuflação de *cuffs* de tubos endotraqueais, associação com trauma torácico, punção de veia jugular durante ou após procedimentos cirúrgicos envolvendo a traqueia (Kirpenstejin e Haar, 2006).

Na clínica de pequenos animais não há dados epidemiológicos sobre a incidência de injúrias traqueais e tipos de traumas associados, porém, na medicina humana, os ferimentos penetrantes de traqueia dispõem maior incidência. Aproximadamente 21% dos pacientes que sofreram trauma de via aérea superior não sobrevivem às primeiras duas horas de internação hospitalar (Pereira et al., 2011). As variações clínicas podem ocorrer após horas e/ou dias nos cães e gatos após o trauma traqueal, sendo as mais presentes taquipneia, dispneia e enfisema subcutâneo, podendo ou não estar presente pneumotórax ou pneumomediastino (Scott et al., 2006).

2 Impressora 3d - rerap - prusa i3 - multivisi comércio e importação eireli – Uberlândia - MG

3 Taulman nylon bridge 3d printing filament - Bridge - USA

Outra condição incomum porém, com alta taxa de mortalidade, principalmente em neonatos, é a estenose traqueal congênita (ETC). Tratamentos cirúrgicos e não cirúrgicos estão disponíveis (Tsang et al., 1989; Filler et al., 1995; Elliott et al., 1996; Maeda et al., 2001; One et al., 2004; Vondrys et al., 2011).

A estenose traqueal pós-intubação provocada pela traqueostomia ou intubação de longo prazo é situação relativamente frequente (Sarper et al., 2005). Embora sua incidência tenha diminuído devido à melhoria nos procedimentos de terapia intensiva, continua a ser problemática incômoda. A taxa de estenose traqueal associada a intubação prolongada varia entre 0,6% e 21% (Grillo et al., 1995; Sarper et al., 2005). A estenose traqueal pós-intubação ocorre devido à hiper-insuflação do tubo endotraqueal ou do manguito da traqueostomia, causando necrose isquêmica devido à pressão na traqueia (Liu et al., 2015).

A traqueomalácia é mais uma doença traqueal grave. Surge a partir de múltiplas fraturas dos anéis traqueais, com potencial de provocar movimento paradoxal no local da lesão. Na inspiração, o segmento instável colapsa causando obstrução. Na expiração, de maneira inversa, ocorre protrusão externa (Shaw et al., 1961; Amauchi et al., 1983; Baumgartner et al., 1990). A traqueomalácia é caracterizada por deficiência congênita ou adquirida de suporte da cartilagem traqueal e pode resultar em colapso das vias aéreas, dificuldades respiratórias, eventos agudos com risco de morte. A incidência estimada de traqueomalácia congênita é de 1 em 2100 humanos recém-nascidos (Boogaard et al., 2005).

A hipoplasia traqueal, condição congênita predominantemente em cães de raças braquicefálicas, é um componente da síndrome da via aérea obstrutiva braquicéfala e relatada como sendo mais comum em Bulldogues ingleses (Suter et al., 1972; Harvey e Fink, 1982; Suter et al., 1984; Coyne et al., 1992). Caracteriza-se pela luz traqueal marcadamente reduzida ao longo da traqueia (Suter et al., 1972; Stadler et al., 2011). As cartilagens traqueais são pequenas e rígidas e suas extremidades livres são próximas ou se sobrepõem, com encurtamento da membrana elástica dorsal e do músculo traqueal (Zook e Hathaway, 1966; Suter et al., 1972; Harvey; Fink, 1982; Suter et al., 1984; Reed e Evans, 2009; Clarke et al., 2011).

2.3 Reconstrução Traqueal

Toda vez que a anatomia da traqueia permitir, deve-se tentar reconstruí-la com seu próprio tecido. A dissecação cuidadosa do tecido conjuntivo e fásia cervical interna, frequentemente promovem adequada mobilização traqueal, sendo o suficiente para seu reparo primário. O reparo termino-terminal dos segmentos é a melhor técnica instituída. A reconstrução direta permite a continuidade da camada mucosa com seu aparelho ciliar, que é fundamental para a mobilização do muco e eliminação de corpos estranhos (Moghissi, 1975; Nelson et al., 1983; Massone, 2003).

Desde a primeira ressecção traqueal bem-sucedida com anastomose das bordas traqueais realizada no final do século XIX (Grillo, 2002), grande variedade de métodos cirúrgicos e técnicas de reconstrução traqueal estão sendo desenvolvidas, dependendo da gravidade e da causa da doença traqueal. Anastomose de ponta a ponta é preferida na reconstrução de defeitos traqueais inferiores a 50 ou 60 mm em seres humanos (Neville et al., 1990).

No entanto, lesões de larga extensão exigem terapias eficientes (Martinod et al., 2005; Macchiarini et al., 2008; Jungebluth et al., 2009), e para tal há vários procedimentos operatórios, promovendo custos elevados para o sistema de saúde (Yamashita et al., 2007; Baiguera et al., 2010). Dessa forma, não existe terapia ideal para o tratamento de danos traqueais extensos (Martinod et al., 2013; Gonfiotti et al., 2014).

A traqueia não se trata de um órgão oco apenas, é na verdade órgão bastante complexo capaz de realizar diversas funções (Delaere et al., 2001; Van Raemdonck, 2014) tais como, ventilação, umidificação aquecimento e limpeza das vias aéreas (Haykal et al., 2014). Um substituto traqueal deve ser capaz de realizar todas essas funções, apresentando aspectos estruturais, morfológicos e mecânicos específicos (Baiguera et al., 2010).

Assim, o surgimento de próteses sofisticadas para o aparelho respiratório vem incentivando muitos estudos na área (Webakey et al., 1962; Worman et al., 1964). Vários substitutos para a reconstrução da traqueia foram elaborados, incluindo o uso de tecido autólogo, autoenxertos, aloenxertos, materiais protéticos, engenharia

2 Impressora 3d - rerap - prusa i3 - multivisi comércio e importação eireli – Uberlândia - MG

3 Taulman nylon bridge 3d printing filament - Bridge - USA

tecidual, ou a combinação dessas abordagens (Delaere et al., 2001; Fuchs et al., 2011).

Os enxertos à base de colágeno tipo *patch* são utilizados com frequência para o tratamento de defeitos traqueais parciais. Os enxertos autólogos de tecido, tais como a cartilagem costal e o pericárdio, têm sido empregados para substituição parcial com sucesso. Contudo, estes enxertos autólogos apresentam várias desvantagens como a dificuldade de projetar, morbidade do sítio doador, propriedades biomecânicas impróprias, vulnerabilidade à infecção e reabsorção após a enxertia. Próteses sintéticas de silicone, teflon e polietileno também foram utilizadas em cirurgias reconstrutivas traqueais, no entanto, eles não possuem as estruturas macro e microanatômicas dos arcabouços naturais (Haykal et al., 2014).

Polímeros biodegradáveis têm sido amplamente utilizados para reconstrução traqueal. Contudo, é controverso que as próteses implantadas no tecido traqueal possam assegurar propriedades biomecânicas adequadas no reparo funcional durante o processo de remodelação. Além disso, a discrepância entre a degradação da prótese e a formação da neoepitelização pode ser uma consideração importante, sendo essa uma complicação (Park et al., 2012; Chua et al., 2013; Kojima e Vacanti, 2014).

Apesar do intenso empenho clínico, ainda não há na literatura um substituto traqueal que supra as seguintes características: rigidez lateral, flexibilidade longitudinal, hermeticidade, biocompatibilidade, integração tecidual, não-imunogênico, não tóxico, não carcinogênico, resistente à colonização bacteriana, sem necessidade de imunossupressão, de fácil implantação e promotor da reepitelização (Baiguera et al., 2010; Haag et al., 2013; Haykal et al., 2014).

2.4 Impressão em 3 dimensões na Área Médica

A impressão tridimensional é o processo para arquitetar objetos sólidos baseado em um formato de modelo digital. Pode ser personalizado, de acordo com as características anatômicas e patológicas do paciente. Dessa forma, tem sido amplamente utilizado em muitos campos médicos, como a simulação de

2 Impressora 3d - rerap - prusa i3 - multivisi comércio e importação eireli – Uberlândia - MG

3 Taulman nylon bridge 3d printing filament - Bridge - USA

procedimentos (Bustamante et al., 2014), transplante de fígado (Zein et al., 2013), e cirurgias torácicas (Akiba et al., 2013; Nakada et al., 2014).

Também conhecida como modelagem por fusão e deposição ou *fused deposition modeling* (FMD), o objeto é criado por meio da deposição de sucessivas camadas de material fundido à medida que a máquina de impressão lê os dados do desenho computadorizado ou *computer-aided design* (CAD) (Cummins, 2010; Rengire et al., 2010). Cada camada é equivalente à seção transversal do modelo CAD, que são fusionadas para criar a forma final. Kodama (1981) descreveu pela primeira vez esse processo, quando elaborou métodos de fabricação para criar modelo de plástico 3D.

Desde então, o processo tem amadurecido e muitas impressoras diferentes e sofisticadas estão sendo utilizadas atualmente (Bird, 2012). Sendo assim, a aplicação da impressora 3D está presente em diversos campos, incluindo aeroespacial, engenharia, produtos de consumo, artes, indústria alimentar, educação, fabricação e medicina (Murphy e Atala, 2014). Vantagens da impressão em 3D incluem a customização, produção local, confecção de formas complexas, capacidade de criar objetos singulares e pouco desperdício de matéria prima (Bird, 2012).

A impressão 3D tem sido reconhecida pelo seu potencial na modelagem cirúrgica. Os cirurgiões podem fabricar um modelo 3D impresso e este objeto pode ser utilizado para educar o paciente, planejar a abordagem cirúrgica e atuar como guia cirúrgico durante o procedimento. Modelos médicos impressos em 3D estão sendo usados para aplicações cardíacas, ortopédicas, dentárias e craniofaciais (Goldstein et al, 2015). Tecnologia de impressão 3D também está sendo usada atualmente para o planejamento cirúrgico para reconstrução craniofacial pediátrica e adulta (Choi e Kim, 2015).

3. OBJETIVO

Objetivou-se com o presente estudo a construção de modelo de traqueia para implante, utilizando técnicas de impressão em três dimensões por modelagem de

2 Impressora 3d - reprop - prusa i3 - multivisi comércio e importação eireli – Uberlândia - MG

3 Taulman nylon bridge 3d printing filament - Bridge - USA

fusão e deposição, para aplicação em anastomose, além de analisar a viabilidade e biocompatibilidade do uso de prótese confeccionada em co-poliamida associado ao elastômero termoplástico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O projeto foi realizado nas dependências da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal – UNESP. A avaliação clínica e os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Hospital Veterinário (HV) “Governador Laudo Natel”.

O presente estudo foi realizado respeitando-se os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Unesp – Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº 007989-17)

4.2 Modelo Experimental

Foram utilizados 15 coelhos fêmeas da linhagem Nova Zelândia Branco (*Oryctolagus cuniculus*), com peso vivo variando entre 3,0 kg a 3,5 kg, fisicamente hígidos, provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista (UNESP – Câmpus Botucatu), acondicionados em gaiolas individuais com dimensões de 55 x 55 x 55 cm e suspensas a 80 cm do chão. A temperatura ambiente foi mantida em torno de 23°C com ciclos de luz variando entre 12-14h. Foi fornecido ração para coelhos padrão comercial¹, água à vontade, e mantidos sob cuidados técnicos especializados.

² Impressora 3d - rerap - prusa i3 - multivisi comércio e importação eireli – Uberlândia - MG

³ Taulman nylon bridge 3d printing filament - Bridge - USA

Nestas condições permaneceram por dois meses, período considerado como de adaptação ao ambiente e manejo para ganho de peso antes de iniciar a fase experimental. Foram randomizados por sorteio e distribuídos em três grupos, referentes aos momentos das eutanásias programadas de sete, 15 e 30 dias.

Foi criado defeito de 0,5 cm a partir da ressecção de três anéis cartilagosos, na altura do 5º ao 8º espaço entre os anéis traqueais, para implantação da prótese confeccionada

4.3 Prótese em 3D

As próteses foram projetadas em programa computacional de prototipagem tridimensional Solidworks 2016 (Figura 1). Posteriormente o arquivo foi convertido em formato STL (stereolithography format) e impresso no método de modelagem por fusão e deposição em impressora da marca Prusa modelo I3². O material utilizado para a confecção das próteses foi o nylon associado a elastômero termoplástico (Taulman PCPTE)³. As dimensões foram baseadas na média das mensurações prévia da porção média traqueal de cadáveres de coelhos, com as seguintes dimensões: comprimento = 15 mm, diâmetro de circunferência cranial 4 mm, diâmetro de circunferência caudal 5 mm, espessura da parede = 0,5 mm.

Os protótipos foram embalados em papel grau cirúrgico e auto clavadas em ciclo rápido em 121 °C por 15 minutos. A Figura 2 ilustra as próteses confeccionadas em impressora 3D.

2 Impressora 3d - reprop - prusa i3 - multivisi comércio e importação eireli – Uberlândia - MG

3 Taulman nylon bridge 3d printing filament - Bridge - USA

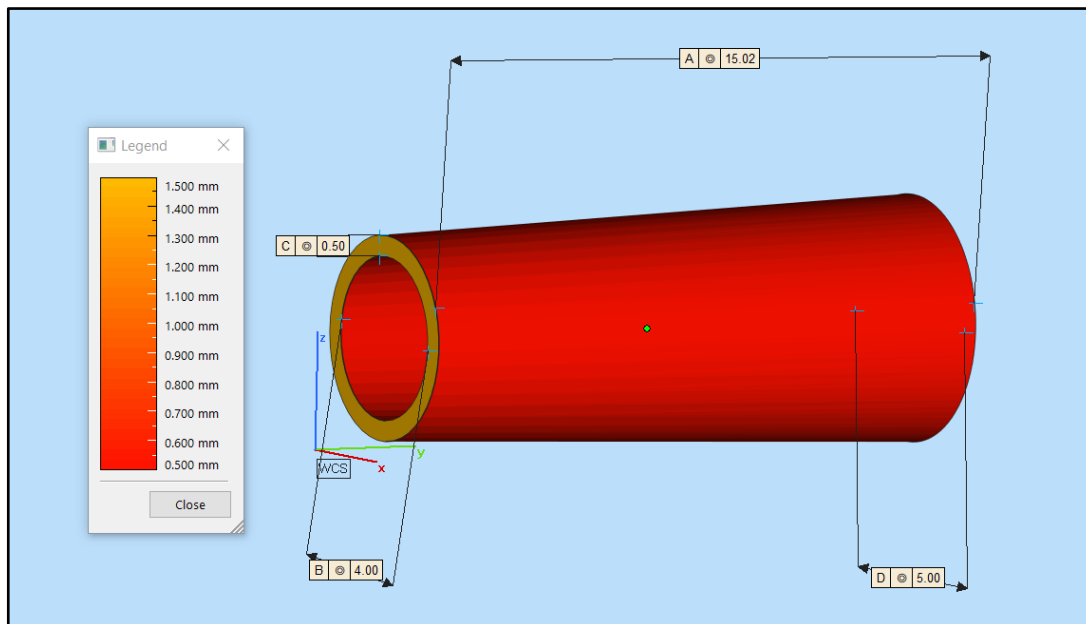


Figura 1 - Prótese projetada em programa computacional de prototipagem 3D Solidworks 2016. Comprimento = 15 mm, diâmetro de circunferência cranial 4 mm, diâmetro de circunferência caudal 5 mm, espessura da parede = 0,5 mm. A análise da espessura da parede é marcada por tons alaranjados, sendo sempre do mesmo tom como demonstrado pela projeção digital, por possuir uniformidade constante da parede = 0,5 mm, sem deformações. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 2 - (A) Prótese no ato de impressão em 3D pelo método de modelagem por fusão e deposição em impressora da marca Prusa modelo I3. (B) Imagem fotográfica das próteses traqueais confeccionada em impressora em três dimensões com nylon associado a elastômero termoplástico. Fonte: Arquivo pessoal.

4.4 Protocolo Anestésico

Os animais foram preparados um dia antes do procedimento cirúrgico, com tricotomia ampla da porção cervical ventral. Não houve necessidade de jejum prévio devido ao alto metabolismo da espécie, além de não fazerem êmese (Flecknell, 2009).

O protocolo anestésico constituiu-se em medicação pré-anestésica utilizando Cloridrato de Clorpromazina⁴, na dose de 0,5 mg/kg, e Morfina⁵, na dose de 0,5 mg/kg, diluídos na mesma seringa, por via intramuscular (IM). Em seguida foi realizada tricotomia ampla da região das orelhas para o acesso venoso. A indução anestésica foi conduzida com o uso de propofol⁶, na dose de 10mg/kg, seguida de intubação orotraqueal com sonda de Magill⁷ de 2,5 mm de diâmetro sem *cuff*, conectada ao aparelho de anestesia para fornecimento fluxo total de 1 L/min de oxigênio a 100% por meio de circuito anestésico avalvular⁸. Foi instituída anestesia geral inalatória com isoflurano⁹, na dose de 3%, diluído em 100% oxigênio.

4 Cloridrato de clorprometazina - cristália prod. Quím. Farm. Ltda. São paulo - SP

5 Morfina - cristália prod. Quím. Farm. Ltda. São paulo - SP

6 Propofol - cristália prod. Quím. Farm. Ltda. São paulo - SP

7 Sonda Endotraqueal desc. S/bl (2,5mm) – Solidor – SP

8 Aparelho de anestesia Nikkei K-Takaoka. São Paulo – SP.

9 Isoforine - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. São Paulo – SP.

4.5 Procedimento Cirúrgico

Após treinamento prévio da técnica de aplicação da prótese, os animais do experimento foram submetidos ao procedimento cirúrgico, sempre realizado pela mesma cirurgiã, auxiliar e equipe.

Após antissepsia prévia e definitiva da região cervical ventral com clorexidine degermante e alcoólico com posterior colocação de campos estéreis, foi realizada incisão longitudinal da pele desde a cricoide até o manúbrio, com posterior divulsão da camada subcutânea e músculos esternoioídeos, ao longo de suas linhas médias, afastando-os lateralmente com auxílio de afastadores de Farabeuf. Dissecção do tecido conjuntivo da traqueia com pinça hemostática Halstead, preservando as porções laterais, responsáveis pela vascularização e nervos laringeos recorrentes. Exposição e isolamento do órgão por meio da aplicação de fio de reparo cranial e caudal ao local da incisão com fio de nylon 3-0 (Figura 3A). Utilizando lamina de bisturi número 11, foi realizada ressecção total em 360 graus da traqueia na altura do 5º espaço de cartilagem interanelar até o 8º espaço de cartilagem interanelar, ou seja, defeito criado pela remoção de 3 anéis traqueais, com aproximadamente 0,5 cm (Figura 3B).

A sonda endotraqueal foi tracionada cranialmente, e a remoção de coágulos de sangue e secreções do lúmen foi efetuada. O implante de PCTPE manufaturado por impressora 3D foi adaptado para obter 0,7 cm de comprimento e ajustado no interior do lúmen dos segmentos por técnica de anastomose (Figura 3C/3D), fixado e suturado com quatro pontos cardeais de reparo nas extremidades da prótese, utilizando nylon 3-0¹⁰ agulhado (Figura 4). Após o término da sutura, foi realizado retalho do músculo esternohioideo, que se acomodou sobre a junção traqueia/prótese (Figura 5), para auxiliar o recobrimento tecidual e evitar escape de ar, o músculo esternotireoideo foi aproximado por sutura contínua com fio de nylon 3-0 agulhado. A pele foi suturada em padrão simples separado com fio de nylon 3-0.

10 Fio nylon 0-0 – 45 cm agulha 3/8 cortante – Procare - SP

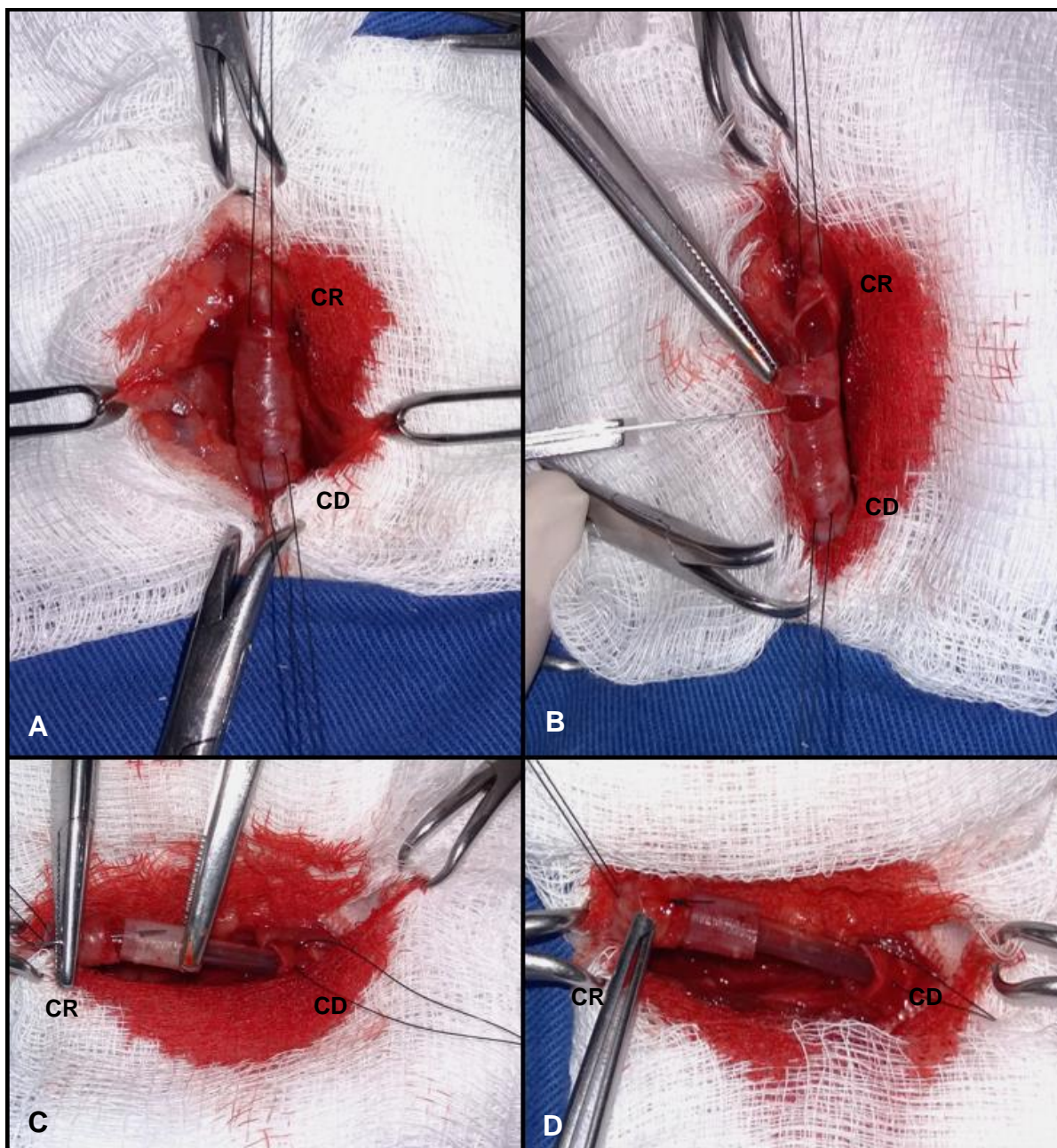


Figura 3 - Sequência de imagens fotográficas de implantação da prótese traqueal confeccionada em impressora 3D, em coelhos. (A) Exposição e isolamento do órgão através da aplicação de fio de reparo cranial (CR) e caudal (CD) ao local da incisão (B). Ressecção total em 360 graus da traqueia na altura do 5º anel traqueal até o anel 8º gerando o defeito. (C) Implante de PCTPE manufaturado por impressora 3D ajustado para ser suturado no interior da borda cranial da traqueia de coelho. (D) Sutura simples separada armada em borda cranial da traqueia de coelho. Fonte: Arquivo pessoal.

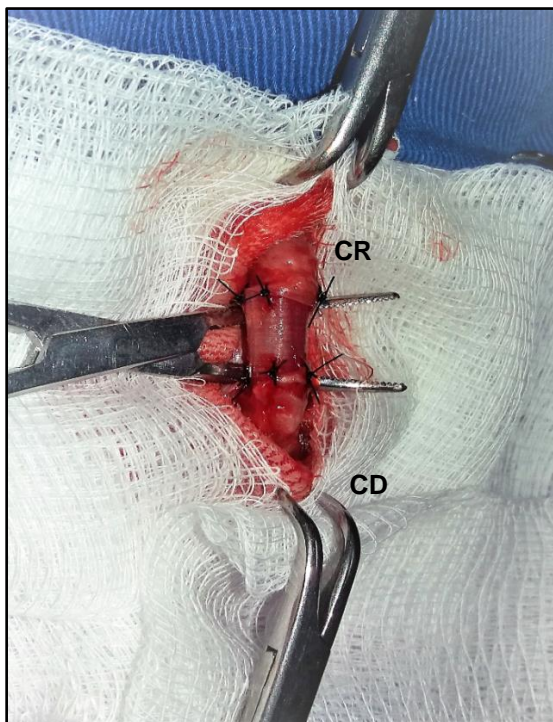


Figura 4 - Prótese traqueal de PCTPE confeccionada em impressora 3D implantada em traqueia de coelho. Padrão de sutura ponto simples separado em quatro pontos cardeais nas extremidades da prótese e borda cranial (CR) e caudal (CD) traqueal, utilizando nylon 3-0 agulhado. Fonte: Arquivo pessoal.

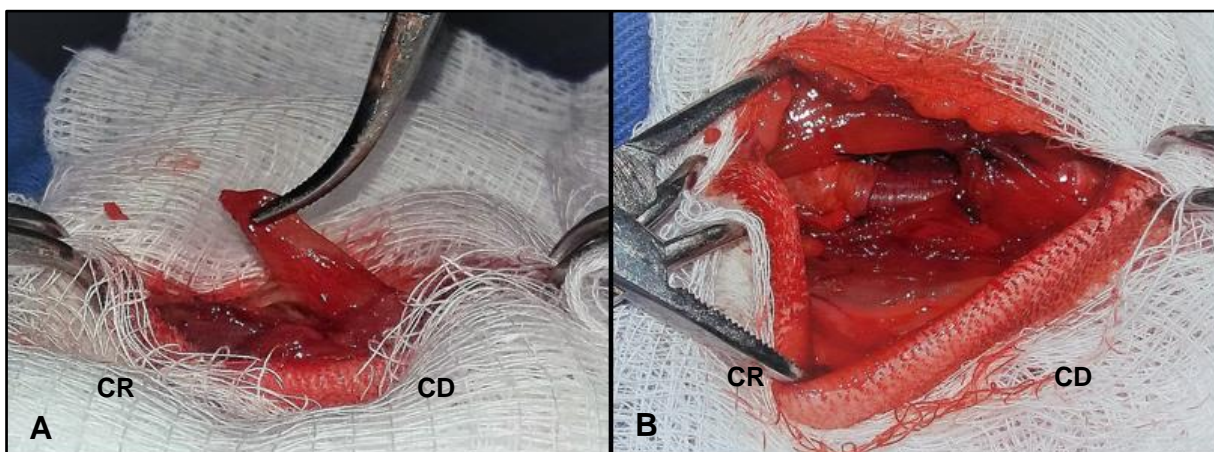


Figura 5 - (A) Preparo de retalho do músculo esternohioideo. (B) Retalho do músculo esternohioideo acomodado sobre a junção traqueia/prótese em segmento cranial (CR) e caudal (CD). Fonte: Arquivo pessoal.

4.6 Avaliação Pós-Operatória

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos intubados por 10 minutos para redução da porcentagem de anestésico inalatório de forma gradual. Houve avaliação da recuperação anestésica por meio da oximetria de pulso, e quando extubavam e apresentavam oximetria $\geq 98\%$, os animais eram destinados às suas respectivas gaiolas. A alimentação e fornecimento de água seguiu a rotina instituída na fase de adaptação e oferecidas logo após o despertar anestésico. Como protocolo terapêutico pós-operatório foi instituída terapia antimicrobiana com enrofloxacina¹¹ na dose de 5 mg/kg por via subcutânea, a cada 12 horas por sete dias e como protocolo de analgesia, cloridrato de tramadol¹² na dose de 4 mg/kg, por via subcutânea, a cada 12 horas, durante cinco dias.

4.7 Avaliação Clínico Cirúrgica e Eutanásia

Os animais foram observados diariamente para avaliação de padrão respiratório relacionado a possíveis complicações: dispneia, cianose, ruídos respiratórios, tosse, e quaisquer alterações atribuídas ao procedimento cirúrgico: edema, hematoma, enfisema subcutâneo e presença de secreção local, bem como alterações comportamentais referentes a dor. Foram submetidos à eutanásia programada para cada grupo (7, 15 e 30 dias), com a administração por via endovenosa de propofol (dose-resposta) e, ao certificar-se da ausência de reflexos corneal e pupilar, foi realizada a aplicação de 20 mL de cloreto de potássio por via endovenosa para a indução de assistolia.

4.8 Avaliação Macroscópica

Após a eutanásia, o local do defeito traqueal foi acessado cirurgicamente e avaliado macroscopicamente, por intermédio de inspeção direta. Foram observadas reações como deiscência da sutura, aderência e reações sugestivas de inflamação ou

11 Enrofloxacino 2,5% injetável – Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda. –SP

12 Cloridrato de tramadol 50mg injetável – União Química – SP

tipo corpo estranho. Tais achados foram graduados em (-) ausente; (+) discreto; (++) moderado; (+++) intenso.

4.9 Análise Histopatológica

Após a eutanásia dos animais, as traqueias foram dissecadas e retiradas até dois centímetros da carina, para análise histopatológica pós-implante. Os fragmentos das traqueias foram preservados em frascos contendo formol 10% no mínimo por 72 horas e encaminhados para estudo para o Laboratório de Patologia da Universidade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP.

Os segmentos fixados foram recortados com lâmina de bisturi, com o cuidado de se conservar todas as camadas de tecido. A desidratação desses segmentos foi efetuada em bateria de álcool e xilol. Após diafanização no xilol, os segmentos foram incluídos à vácuo em parafina e em seguida recortados com uso de micrótomo (Leica modelo RM2145) com espessura de 5 µm. Os cortes, após reidratação em bateria de xilol e álcool, foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e avaliados para verificação do comportamento cicatricial, rejeição, processo inflamatório e proliferação granulomatosa.

Foi analisada a incorporação da prótese traqueal à traqueia dos animais por meio das evidências de rejeição e deiscência e a reparação, com especial atenção às alterações relacionadas com absorção do enxerto, substituição por fibrose, presença de necrose na região da anastomose, rejeição, crescimento de tecido ósseo ou cartilaginoso, granulomas, estenoses, metaplasia óssea, fibroplasia, crescimento de epitélio interno, infecção, proliferação de colágeno, neoformação vascular, proliferação de colágeno e presença de microfístulas.

11 Enrofloxacino 2,5% injetável – Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda. –SP

12 Cloridrato de tramadol 50mg injetável – União Química – SP

4.9.1 Critério para avaliação da biocompatibilidade da prótese

Na avaliação da biocompatibilidade atribuiu-se o grau de aceitação a prótese baseando se nos parâmetros:

Inflamação: avaliação do grau de infiltrado inflamatório e localização deste.

Tipo de resposta: discriminação por quais células inflamatórias o infiltrado é composto.

Necrose: identificação da presença ou não de necrose (restos celulares ou destruição tecidual) e avaliação do grau de acometimento e localização.

Congestão e edema: identificação da presença de congestão vascular e edema celular ou intersticial, a localização, bem como avaliação do grau de acometimento e grau de hemorragia.

Fibrose: Identificação da presença de tecido conjuntivo, a localização e graduação.

Crescimento ou conteúdo luminal: identificação dos possíveis componentes, quando presentes, na luz do órgão ou prótese, quer seja devido ao crescimento tecidual, conteúdo inflamatório ou necrótico.

Presença de bactérias: Avaliação de elementos bacterianos nos cortes histológicos e quantificação microbiana em:

(-) = Ausente, (+) = Discreto, (++) = Moderado, (+++) = Acentuado

4.10 Análise Estatística

Os dados, referentes a avaliação macroscópica como, escore de reação a sutura, aderência e reações sugestivas de infecção ou tipo corpo estranho e dados correspondentes a análise histopatológica como a graduação de inflamação, necrose e fibrose para pequenas amostras foram analisados pelo teste Exato de Fisher. Todas as análises foram realizadas sob significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação Clínico-cirúrgica

Os animais foram examinados diariamente até o momento da eutanásia e não foram observadas quaisquer alterações que pudessem ser atribuídas aos implantes, tais como alterações respiratórias (taquipneia, dispneia, cianose, ruídos respiratórios e tosse), enfisema subcutâneo, hematoma, edema, secreção, variação comportamental: apatia, anorexia ou agressividade, pescoço rígido, esticado e/ou elevado.

5.2 Avaliação Macroscópica

Os critérios do estudo macroscópico foram examinados individualmente, para cada amostra, nos grupos de sete, 15 e 30 dias como apresentados sequencialmente nos Apêndices 1, 2 e 3. Os dados estatísticos correspondentes à avaliação macroscópica estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados do estudo estatístico da valiação macroscópica referente ao processo de biocompatibilidade das próteses traqueais impressas em impressora 3D utilizadas em coelhos dos grupos de sete, 15 e 30 dias. Jaboticabal, 2018.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DA AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA					
CRITÉRIOS	GRADUAÇÃO	7 dias n (%)	15 dias n (%)	30 dias n (%)	P-valor
ADERÊNCIA *	Discreto (+)	5 (100%)	-	-	<0,001
	Moderado (++)	-	5 (100%)	5 (100%)	
SINAIS DE INFLAMAÇÃO *	Ausente	2 (40%)	5 (100%)	5 (100%)	0,022
	Discreto (+)	2 (40%)	-	-	
	Moderado (++)	1 (20%)	-	-	
GRANULOMA *	Ausente	2 (40%)	3 (60%)	3 (60%)	0,022
	Discreto (+)	1 (20%)	2 (40%)	2 (40%)	
	Moderado (++)	1 (20%)	-	-	
	Acentuado (+++)	1 (20%)	-	-	
DEISCÊNCIA DE SUTURA	Ausente	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	-
DEFORMIDADE TRAQUEAL	Ausente	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	-
RECOBRIMENTO TECIDUAL *	Ausente	3 (60%)	-	-	<0,001
	Discreto (+)	2 (40%)	-	-	
	Moderado (++)	-	5 (100%)	-	
	Acentuado (+++)	-	-	5 (100%)	

* Nível de significância ($p < 0,05$), Discreto = (+), Moderado = (++) , Acentuado = (+++)

Foi observada diferença significativa entre os diferentes grupos nas variáveis aderência, sinais de inflamação, granuloma e recobrimento tecidual.

As variáveis deiscência de sutura e deformidade traqueal não apresentaram diferenças entre os grupos, estando ausente em todos os animais dos três grupos.

Quando comparados os grupos nos valores referentes à aderência, foi verificado que o grupo de sete dias foi diferente dos outros grupos, com aderência discreta em 100% dos animais, à medida que nos grupos de 15 e 30 dias a aderência apresentou-se de forma moderada em todos os animais, com significância ($p < 0,001$).

Ao analisarmos os dados dos grupos em relação a sinais de inflamação, também se observa variação significativa entre as distribuições dos animais do grupo de sete dias, pois não houve sinais de inflamação em dois animais: $n=2$ (40%), grau discreto em dois animais: $n=2$ (40%) e apenas um animal com graduação moderada: $n=1$ (20%). Ao passo que não foi verificado sinais de inflamação em nenhum animal dos grupos de 15 e 30 dias, com significância ($p=0,022$).

A correlação entre os grupos correspondente à formação de granuloma expressa variação entre as distribuições dos animais do grupo de sete dias, uma vez que não houve formação de granuloma em dois animais: n=2 (40%), e formação de granulação em um animal de grau discreto: n=1 (20%), moderado: n=1 (20%) e acentuado: n=1 (20%). A distribuição dessa alteração nos animais do grupo de 15 e 30 dias revelaram ausência de formação de granuloma em três animais: n=3 (60%) e formação discreta em dois animais: n=2 (40%), com significância ($p=0,022$).

A comparação entre os coelhos no grupo de sete dias perante ao recobrimento tecidual mostra variação entre as distribuições, visto que houve recobrimento tecidual em três animais: n=3 (60%), e recobrimento em dois animais de grau discreto: n=2 (40%). A disposição dessa alteração nos animais do grupo de 15 e 30 dias exibiram recobrimento tecidual moderado e acentuado em todos os animais respectivamente, com significância ($p<0,001$).

Foi registrado por meio de imagens fotográficas a dissecação da traqueia em tempo real de cada eutanásia, programada para sete dias (Figura 6), 15 dias (Figura 7) e 30 dias (Figura 8), para verificação e graduação dos critérios explorados.

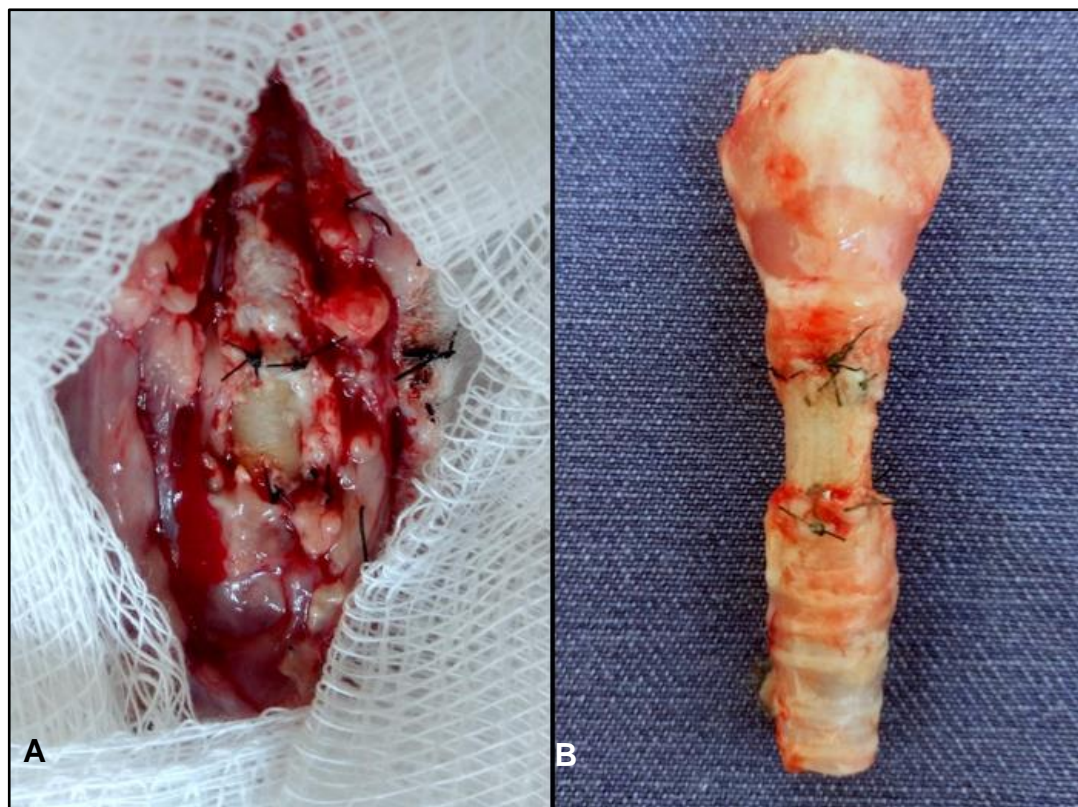


Figura 6 - Momento imediato pós eutanásia do grupo de sete dias. (A) Exposição de traqueia cervical, no local da implantação, para observar reações como deiscência da sutura, aderência e reações sugestivas de infecção ou tipo corpo estranho. Tais achados foram graduados. Notar ausência de deiscência de sutura e aderência tecidual discreta. (B) Peça cirúrgica – Traqueia de coelho com prótese de PCTPE confeccionada em impressora 3D. Observar ausência de recobrimento tecidual. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 7 - Momento imediato pós eutanásia do grupo de 15 dias. (A) Exposição de traqueia cervical, local da implantação, para observar reações como deiscência da sutura, aderência e reações sugestivas de infecção ou tipo corpo estranho. Tais achados foram graduados. Notar ausência de deiscência de sutura e aderência tecidual moderada. (B) Peça cirúrgica – Traqueia de coelho com prótese de PCTPE confeccionada em impressora 3D. Observar recobrimento tecidual moderado. Fonte: Arquivo pessoal.

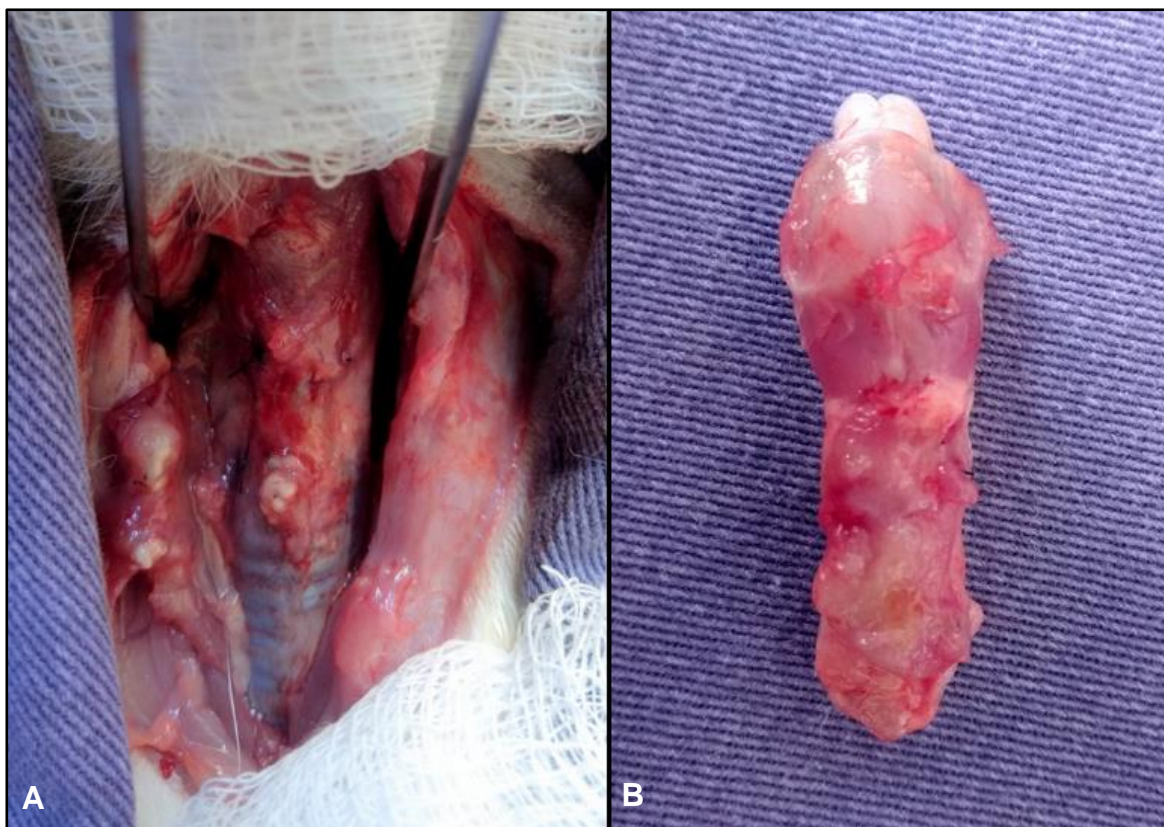


Figura 8 - Momento imediato pós eutanásia do grupo de 30 dias. (A) Exposição de traqueia cervical, local da implantação, para observar reações como deiscência da sutura, aderência e reações sugestivas de infecção ou tipo corpo estranho. Tais achados foram graduados. Notar ausência de deiscência de sutura e aderência tecidual moderada. (B) Peça cirúrgica – Traqueia de coelho com prótese de PCTPE confeccionada em impressora 3D. Observar recobrimento tecidual importante. Fonte: Arquivo pessoal.

5.3 Análise Histopatológica

As imagens do estudo histopatológico, exibem a reação do tecido traqueal frente a implantação da prótese de (PCTPE) em cada grupo: 7, 15 e 30 dias, em relação aos conceitos analisados (Figura 9, 10 e 11).

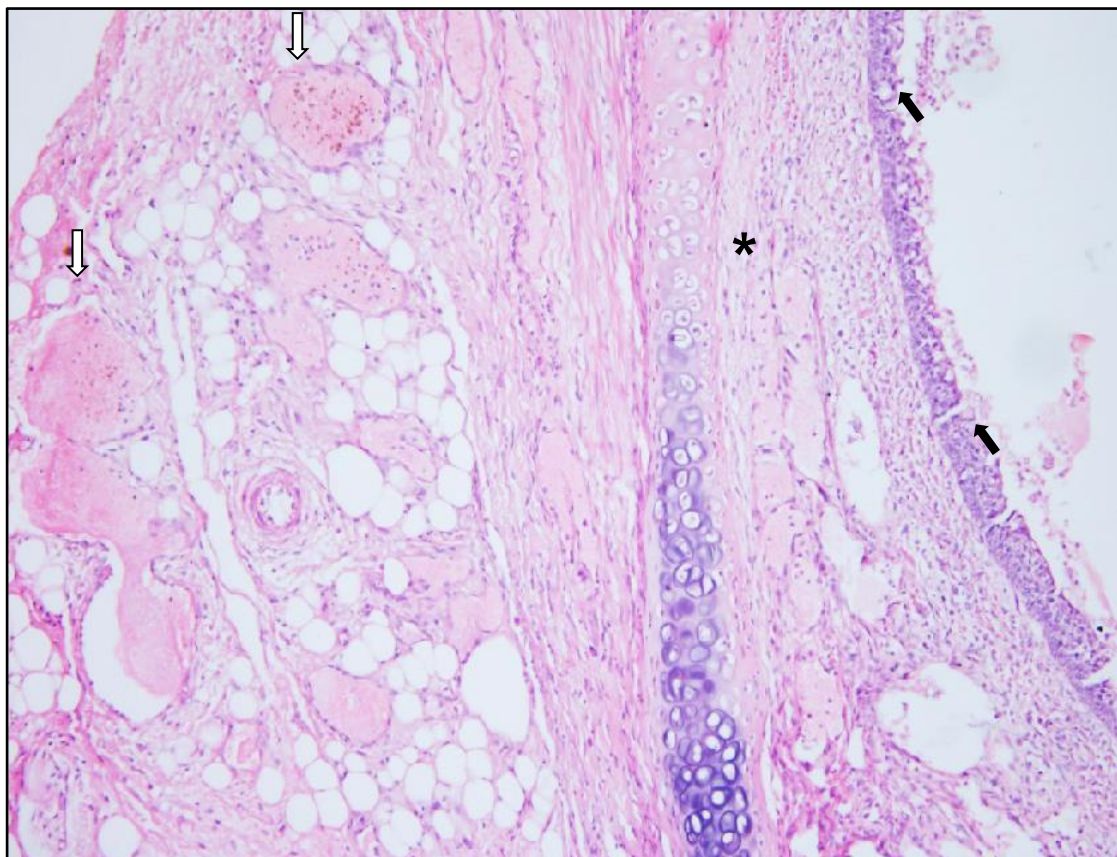


Figura 9 - Fotomicrografia do segmento distal de interface entre prótese e traqueia de coelho – grupo de sete dias, coradas com hematoxilina e eosina (HE). Corte histológico mostra da direita para a esquerda, camada adventícia com congestão acentuada (setas brancas), submucosa com infiltrado inflamatório difuso moderado e edema (asterisco), e mucosa com ausência de epitélio ciliado. Conteúdo intraluminal discreto constituído por restos celulares e hemácias (seta preta). Objetiva 10 X. Fonte: Arquivo pessoal.

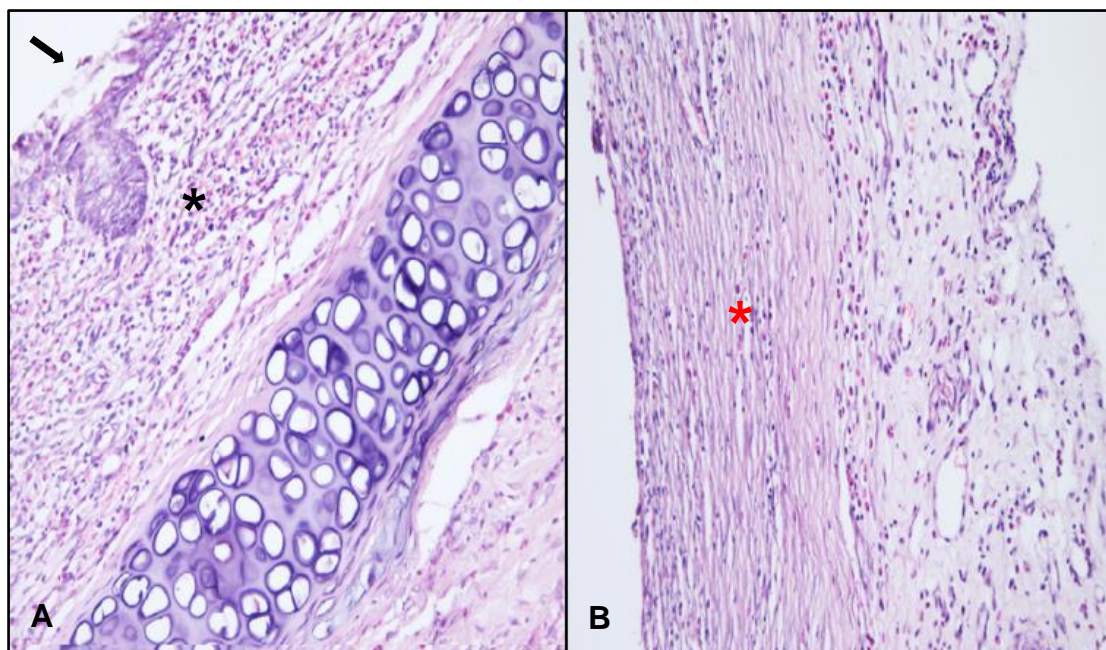


Figura 10 - Fotomicrografias de traqueia de coelho – grupo de 15 dias, coradas com hematoxilina e eosina (HE). (A) Segmento proximal da região de interface entre prótese e traqueia. Corte histológico revela mucosa (seta preta) com destruição das células do epitélio ciliado, apresentando arrasamento celular, acompanhando intenso infiltrado inflamatório associado a edema importante e congestão moderada difusa (asterisco) da camada submucosa. Objetiva 20x. (B) Segmento proximal da região de prótese. Observa-se proliferação de tecido conjuntivo fibroso organizado (asterisco vermelho), com formação de pequenos vasos, apresentando infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear discreto a moderado. Objetiva 20x. Fonte: Arquivo pessoal.

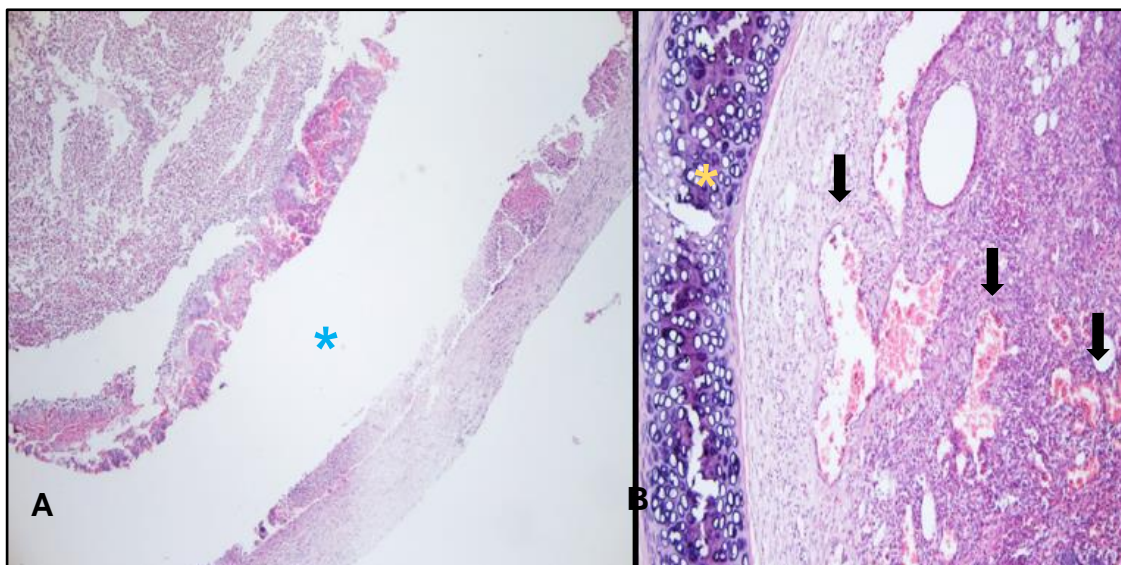


Figura 11 - Fotomicrografias de traqueia de coelho – grupo de 30 dias, coradas com hematoxilina e eosina (HE). (A) Segmento distal da região de prótese. Corte histológico evidenciando espaço ocupado pela prótese (asterisco azul). Nota-se à esquerda da prótese, conteúdo intraluminal constituído por restos celulares, células inflamatórias e hemácias. À direita da prótese, presença de tecido conjuntivo recobrendo a prótese. (Objetiva 4x) (B) Segmento distal da região de interface entre prótese e traqueia. Notar área de cartilagem (asterisco amarelo), a direita, infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear acentuado, congestão e edema acentuado difuso em camada submucosa. Observa-se a alta celularidade do tecido associado a congestão marcada, caracterizada pela dilatação de vasos preenchidos por hemácias (seta preta). Objetiva 10x. Fonte: Arquivo pessoal.

Os critérios do estudo histopatológico foram graduados individualmente, para cada amostra, nos grupos de sete, 15 e 30 dias como apresentados sequencialmente nos Apêndices 4, 5 e 6. Os dados estatísticos correspondentes à análise histopatológica estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados do estudo estatístico da avaliação microscópica referente ao processo de biocompatibilidade das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos dos grupos de sete, 15 e 30 dias. Jaboticabal, 2018.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA					
CRITÉRIOS	GRADUAÇÃO	7 dias n (%)	15 dias n (%)	30 dias n (%)	P-valor
GRAU DE INFLAMAÇÃO *	Discreto(+)	-	-	1 (20%)	0,0067
	Moderado (++)	-	1 (20%)	3 (20,0%)	
	Acentuado (+++)	5 (100%)	4 (80%)	1 (20%)	
INFILTRADO POLIMORFONUCLEAR *	Discreto(+)	-	-	1 (20%)	0,0067
	Moderado (++)	-	1 (20%)	3 (60%)	
	Acentuado (+++)	5 (100%)	4 (80%)	1 (20%)	
INFILTRADO MONONUCLEAR *	Moderado (++)	-	1 (20%)	4 (80%)	0,0083
	Acentuado (+++)	5 (100%)	4 (80%)	1 (20%)	
INFILTRADO DE CÉLULAS GIGANTES	Ausente	3 (60%)	5 (100%)	5 (100%)	0,0952
	Discreto(+)	2 (40%)	-	-	
CONGESTÃO VASCULAR TRAQUEAL	Discreto(+)	1 (20%)	1 (20%)	-	0,0533
	Moderado (++)	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)	
	Acentuado (+++)	3 (60%)	3 (60%)	3 (60%)	
EDEMA CELULAR OU INTERSTICIAL TRAQUEAL	Discreto(+)	1 (20%)	1 (20%)	-	0,0533
	Moderado (++)	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)	
	Acentuado (+++)	3 (60%)	3 (60%)	3 (60%)	
HEMORRAGIA TRAQUEAL *	Ausente	4 (80%)	2 (40%)	4 (80%)	0,025
	Discreto(+)	1 (20%)	1 (20%)	-	
	Moderado (++)	-	2 (40%)	1 (20%)	
FIBROSE EM REGIÃO TRAQUEAL	Ausente	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	-
FIBROSE EM REGIÃO DE PRÓTESE E ANASTOMOSE *	Ausente	5 (100%)	1 (20%)	-	<0,001
	Discreto(+)	-	1 (20%)	1 (20%)	
	Moderado (++)	-	2 (40%)	2 (40%)	
	Acentuado (+++)	-	1 (20%)	2 (40%)	
ESTENOSE INTRALUMINAL	Ausente	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	-
	Ausente	5 (100%)	-	-	
PROLIFERAÇÃO TECIDUAL TRAQUEAL (EXTERNO) *	Moderado (++)	-	5 (100%)	-	<0,001
	Acentuado (+++)	-	-	5 (100%)	
	Ausente	3 (60%)	5 (100%)	5 (100%)	
PROLIFERAÇÃO TECIDUAL TRAQUEAL (INTERNO)	Discreto(+)	2 (40%)	-	-	0,0952

* Nível de significância ($p < 0,05$), Discreto = (+), Moderado = (++) , Acentuado = (+++)

As variáveis da análise histopatológica foram consideradas significativas, com exceção dos valores de infiltrado de células gigantes, congestão vascular traqueal, edema celular ou intersticial traqueal e proliferação tecidual traqueal interno. Os dados para esses quatro critérios citados não manifestaram diferença estatística ($p > 0,05$). Os parâmetros fibrose em região traqueal e estenose intraluminal, igualmente não demonstraram diferença estatística, devido à falta de alteração de distribuição, permanecendo ausente em todos os animais dos três grupos, sete, 15 e 30 dias.

Os três grupos foram comparados referente ao parâmetro de infiltrado de células gigantes, apresentando inconstância dentre as distribuições das amostras. No

grupo de sete dias, não houve presença de células gigantes em três animais: n=3 (60%) e dois animais apresentaram presença discreta: n=2 (40%), à medida que nos grupos de 15 e 30 dias foi ausente a presença de células gigantes em todos os animais, com ausência de significância ($p=0,0952$).

Nos dados correspondente à congestão vascular traqueal, notou-se alteração entre as distribuições dos três grupos, pois os grupos de sete e 15 dias exibiram congestão em um animal de forma discreta: n=1 (20%), um animal de forma moderada: n=1 (20%) e três animais de forma acentuada: n=3 (60%). Enquanto no grupo de 30 dias, a presença de congestão vascular traqueal foi constatada em dois animais de graduação moderada: n=2 (40%) e em três animais de grau acentuado: n=3 (60%), com ausência de significância ($p=0,0533$).

A comparação referente à edema celular ou intersticial traqueal, indicou oscilação entre as distribuições dos três grupos, já que os grupos de sete e 15 dias revelaram edema em um animal de grau discreto: n=1 (20%), um animal de grau moderado: n=1 (20%) e três animais de graduação acentuada: n=3 (60%). E, no grupo de 30 dias, foi observado em dois animais de forma moderada: n=2 (40%) e em três animais de forma acentuada: n=3 (60%), com ausência de significância ($p=0,0533$).

Também houve diferença entre os dados que se referem à proliferação tecidual traqueal interna. O grupo de sete dias retratou ausência de proliferação tecidual em 3 três animais: n=3 (60%) e proliferação de forma discreta em 2 animais: n=2 (40%). À medida que, nos grupos de 15 e 30 dias, não houveram proliferação tecidual traqueal interna em nenhum animal, com ausência de significância ($p=0,0952$).

Foi possível observar variação significativa na análise de grau de inflamação, em que no grupo de sete dias todos os animais demonstraram inflamação acentuada, à proporção que, no grupo de 15 dias houve um animal com inflamação moderada: n=1 (20%) e quatro animais com inflamação de grau acentuado: n=4 (80%). Assim como, o grupo de 30 dias apresentou um animal com inflamação de forma discreta: n=1 (20%), três animais de forma moderada: n=3 (60%) e um animal de forma acentuada: n=1 (20%), com significância de ($p=0,0067$).

A partir do critério infiltrado polimorfonuclear, foi possível observar que ocorreu variação significativa, pois houve infiltração de grau acentuado nos cinco animais do grupo de sete dias. No grupo de 15 dias houve um animal com infiltrado de graduação

moderada: n=1 (20%) e quatro animais com infiltração de forma acentuada: n=4 (80%). Ao passo que, no grupo de 30 dias observou-se um animal com infiltrado de forma discreta: n=1 (20%), três animais de forma moderada: n=3 (60%) e um animal de forma acentuada: n=1 (20%), com significância de ($p=0,0067$).

Houve variação significativa igualmente na avaliação de infiltrado mononuclear, dado que o grupo de sete dias apresentou esse tipo de infiltrado de forma acentuada em todos os animais. O grupo de 15 dias apontou um animal com infiltrado mononuclear de grau moderado: n=1 (20%) e quatro animais com graduação acentuada: n= 4 (80%). Enquanto o grupo de 30 dias mostrou quatro animais com esse infiltrado de forma moderada: n=4 (80%) e apenas um animal de forma acentuada: n=1 (20%), com significância de ($p=0,0083$).

Quando se compara o grau de hemorragia traqueal entre os três grupos, é notável variação significativa, em razão de que o grupo de sete dias possuía quatro animais com ausência de hemorragia: n=4 (80%) e um animal com hemorragia de grau discreto: n=1 (20%). Já no grupo de 15 dias, não houve hemorragia traqueal em dois animais: n=2 (40%), um animal com presença discreta de tal fator: n=1 (20%), e dois animais com grau moderado: n=2 (40%). E, no grupo de 30 dias a ausência de hemorragia foi notável em quatro animais: n=4 (80%) e houve presença discreta do critério estudado em um animal: n=1 (20%), com significância de ($p=0,0250$).

Ao analisarmos os dados dos grupos em relação a fibrose em região de prótese e anastomose, observou-se variação significativa entre as distribuições, visto que, no grupo de sete dias não houve fibrose em nenhum dos cinco animais. Foi evidenciado no grupo de 15 dias, um animal com ausência de fibrose: n=1 (20%), um animal com crescimento discreto de fibrose: n=1 (20%), dois animais que apresentaram fibrose de forma moderada: n=2 (40%) e um animal exibiu tal fator de forma acentuada: n=1 (20%). Bem como no grupo de 30 dias um animal manifestou grau discreto de fibrose: n=1 (20), dois animais apresentaram grau moderado: n=2 (40) e, em dois animais, houve grau acentuado desse mesmo critério: n=2 (40%), com significância de ($p<0,001$).

Ademais, o estudo da proliferação tecidual traqueal externo se apresenta igualmente aos itens anteriores, com variação significativa entre as distribuições, pois, no grupo de sete dias não ocorreu esse tipo de proliferação em nenhum dos animais.

No grupo de 15 dias houve graduação moderada desse elemento nos cinco animais. E no grupo de 30 dias a proliferação tecidual traqueal externa esteve presente em todos os animais, com significância de ($p < 0,001$).

6. DISCUSSÃO

Há mais de quarenta anos os transplantes traqueais são estudados e pesquisados, porém ainda sem sucesso (Macchiarini et al., 2008). Defeitos traqueais extensos são desafio na prática cirúrgica em razão das dificuldades para o tratamento, não existindo para tanto terapia padrão (Shaari et al., 1998; Montovani e Nakajima, 2003; Wu et al., 2007; Macchiarini et al., 2008).

Ressecção de anéis traqueais não é isenta de riscos (Montovani e Nakajima, 2003). A principal opção de tratamento é o reparo primário termino-terminal, quando ocorrem grandes lesões tanto benignas como malignas, porém, nem sempre são viáveis (Macchiarini et al., 2008; Jungebluth et al., 2009). Essa abordagem é possível nas situações de lesões menores do que 50% (6,0 cm) do comprimento da traqueia de um adulto e 30% da traqueia de criança (Baiguera et al., 2010; Haag et al., 2013; Haykal et al., 2014).

No entanto, a maioria das afecções desse órgão acomete largas extensões, impossibilitando a reconstrução cirúrgica, por não haver tecido adjacente suficiente para a realização das traqueoplastias, como acontece em deformidades congênitas, estenoses e tumores (Conconi et al., 2005; Martinod et al., 2005; Jungebluth et al., 2009; Baiguera et al., 2010).

Esse estudo teve como objetivo propor a possibilidade da construção de substituto traqueal que apresentasse as propriedades anatômicas e biocompatíveis similares à traqueia nativa, por meio da confecção de prótese de co-poliâmida associada a elastômero termoplástico, por meio de impressão em três dimensões pelo método de modelagem por fusão de deposição aplicada por técnica de anastomose em traqueia de coelhos.

A seleção do modelo animal depende do objetivo da pesquisa (Hallers et al., 2004). Não existe na literatura nenhum estudo experimental referente ao modelo animal ideal para aplicação de prótese total traqueal. Entretanto, há vários trabalhos

que utilizam coelhos para as pesquisas dessa área (Hallers et al., 2004). A escolha do coelho foi baseada em dois aspectos principais. Primeiramente pela fácil disponibilidade deste animal em biotério parceiro à instituição, segundo pelo calibre da via aérea que é maior quando comparada com ratos, outro animal disponível à pesquisa. Optou-se assim, pelo animal de maior porte.

A bioprintificação de tecidos e órgãos ainda está em desenvolvimento. Contudo, muitos estudos já provam o conceito. Pesquisadores utilizam impressoras 3D para criar menisco de joelho, válvula cardíaca, disco espinhal, outros tipos de cartilagens, ossos e orelha artificial (Bartlet, 2013; Mertz, 2013; Gross et al., 2014). Cui et al. (2012) aplicaram a tecnologia da impressão em três dimensões para construir cartilagem articular humana. Uma pesquisa realizada na Universidade de Michigan utilizou impressora 3D e imagens de TC das vias aéreas de um paciente que permitiu fabricar um arcabouço traqueal biorreabsorvível e precisamente modelada sendo implantada cirurgicamente em um bebê com traqueobroncomalácia. O paciente se recuperou e a reabsorção total da prótese supostamente ocorreria dentro de três anos (Bartlet, 2013).

As aplicações médicas para tal processo estão se expandindo rapidamente e espera-se que revolucionem a responsabilidade com a saúde (Schubert et al., 2014). As amplas categorias da impressão em 3D podem ser classificadas como fabricação de tecidos e órgãos; criação de próteses customizadas, implantes e modelos anatômicos e pesquisa farmacêutica sobre as formas de dosagem e distribuição de medicamentos (Klein et al., 2013). A grande vantagem da produção em 3D é a liberdade de elaborar produtos e equipamentos sob medida (Banks, 2013). Implantes customizados, acessórios e ferramentas cirúrgicas, podem ter impacto positivo em relação ao tempo cirúrgico, tempo de recuperação do paciente e do sucesso tanto da cirurgia como do implante (Mertz, 2013).

Materiais de polímeros artificiais não reabsorvíveis ou reabsorvíveis, materiais poliméricos semi-naturais ou derivados e materiais naturais ou nativos, como enxertos e transplantes, são muito utilizados na substituição e reconstrução de tecidos moles, pertencendo aos elastômeros o uso predominante em aplicações que requerem adesão aos tecido moles (Peppas e Langer, 1994). Implantes de poliésteres (PET), fluoropolímeros (PTFE), polipropileno (PP), poliuretanos (PU) e silicones, já são bem

estabelecidos no meio médico, por serem correspondentes à materiais inertes e biocompatíveis. Novos biomateriais considerados na literatura são geralmente uma modificação dessas estruturas básicas (Pinchuk, 1995).

O material para a confecção da prótese em impressora 3D adotado nesse trabalho foi de co-poliâmida associada à elastômero termoplástico (PCTPE). A co-poliâmida é sabidamente biocompatível, caracteriza-se pela elasticidade devido a sua resistência mecânica e produz baixa reatividade tecidual (Hendler, 2000). Apresentam propriedades atóxicas (Hollingsworth, 2010), mínima reação inflamatória (Souza, 2001) e podem ser empregados em quase todos os tipos de tecidos, inclusive em anastomoses gastrointestinais e biliares (Marques, 2005).

Elastômeros termoplásticos (TPE) são uma classe de materiais que combinam as propriedades da borrachas e do plásticos. As fases plásticas elastoméricas e plásticas amorfas ou cristalinas se separam em nanoescala, criando uma estrutura de rede fisicamente reticulada. À temperatura ambiente, os TPEs se comportam como borracha reticulada, contudo, podem ser fundidos em temperaturas mais altas como plástico e serem processados a partir de métodos convencionais. São caracterizados por alto alongamento na ruptura, alta flexibilidade e baixa deformação permanente na carga estática e dinâmica. São materiais muito versáteis que são usados no corpo há mais de 20 anos (Pinchuk, 1995).

A ideia da associação da co-poliâmida com o elastômero termoplástico acarreta benefícios para o protótipo, visto que, propõem alternativa de material com menor capacidade de reação ao organismo frente a processos inflamatórios, pois implantes de co-poliâmida apresentam alta rigidez e resistência mecânica (Piatti e Rodrigues, 2005) o que poderia causar atrito importante, favorecendo formação de granuloma.

A curva de aprendizado para a aplicação da prótese foi rápida, em virtude da técnica cirúrgica não ser trabalhosa porém, minuciosa e para que a cirurgia fosse bem sucedida alguns pontos foram considerados. Foram realizados de forma prévia cinco procedimentos cirúrgicos pilotos, para desenvolvimento da habilidade da cirurgiã, avaliação anestésica e comportamento pós-operatório. Foi notada a importância da limpeza com gazes e com pinça hemostática Halstead do segmento caudal da traqueia para remoção de coágulos pois, mesmo que pequeno, o coágulo bloqueava a translocação de ar e causava importantíssimo prejuízo ventilatório, não permitindo

aporte de oxigênio. Outra colocação, é a necessidade de redução gradual de taxa anestésica ao termino do procedimento cirúrgico, para prevenir apneia nos coelhos, e risco de óbito.

Com relação à avaliação clínica diária, todos os animais do experimento apresentaram estabilidade pós-operatória e resposta favorável a técnica cirúrgica e a prótese aplicada. Não foram constatados transtornos respiratórios, complicações no local de implantação e alterações comportamentais relacionadas a dor. Jung et al. (2016), aplicaram prótese de poliuretano impressa em 3D para reconstrução parcial da traqueia em 29 coelhos e, não apontaram complicações graves até os pontos de tempo designados.

O trabalho de Shi et al. (2005) propôs a confecção de três próteses traqueais cujo esqueleto básico é formado por malha tubular de polipropileno (PP) associado à fibra de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). Os protótipos foram implantados em 16 cães. Alterações como formação de abscessos, deiscência de anastomose ou luxação protética não foram evidenciadas em nenhum dos cães do projeto quando fora realizada inspeção macroscópica direta no momento da eutanásia. Em todos os cães que viveram por mais de dois meses após a operação, a prótese traqueal foi completamente incorporada à traqueia receptora por tecido conjuntivo fibroso. Assim como ocorre no presente estudo, em que foi notado ausência de deiscência da sutura, aderência e reações sugestivas de inflamação, tipo corpo estranho e deformidade traqueal. Da mesma maneira foi observado crescimento tecidual sob a área externa da prótese de forma gradual a resposta do organismo frente a reparação tecidual do segmento operado.

Para desenvolver a prótese traqueal de reconstrução total biomimética, atentou-se principalmente para: interação biológica, funcionalidade anatômica e fabricação. O entendimento de biocompatibilidade dá-se pela interação entre o material a ser implantado e o ambiente biológico receptor. A falha de um biomaterial em oferecer biocompatibilidade geralmente acontece por rompimento das propriedades do material ou por resposta biológica insatisfatória. O principal aspecto da biocompatibilidade é a resposta tecidual local. A resposta do processo cicatricial é um fenômeno dinâmico, no qual as células interagem para reparar o tecido danificado. Muitas células estão envolvidas neste processo reparador, incluindo macrófagos e

leucócitos polimorfonucleares. A observação da distribuição e contagem dessas células podem ser usadas na descrição da reação inflamatória (Vince et al, 1991).

A análise histopatológica em coloração hematoxilina-eosina (HE) foi escolhida para tal finalidade, porque fornece informações qualitativas e quantitativas gerais da resposta tecidual. É o método mais utilizado para avaliação de biocompatibilidade, em estudos experimentais (Högset e Bredberg, 1986; Bonzon et al, 1995; Schwager e Geyer, 1998; Meijer et al, 2002; Hoffman et al, 2003; Trabandt et al, 2004; Spiegel e Kessler, 2005; Weber et al, 2006).

A integração biológica entre o enxerto manufacturado implantado e o tecido hospedeiro adjacente é fundamental para promover reparação tecidual. A aderência tecidual identificada macroscopicamente a partir dos 15 dias e a formação de granuloma foram mais evidentes nos cinco animais do grupo de sete dias, em diferentes graus, mas não prejudicaram em nada o recobrimento tecidual conjuntivo fibroso que foi visto em face externa à prótese e área em região de anastomose de forma significativa 15 dias após implante e de forma importante em 30 dias, em razão da realização do flap do musculo esternohioideo proposta pela técnica cirúrgica, que permitiu aporte vascular e formação de tecido conjuntivo, além de viabilizar vedação, pois impede a translocação de ar para a área externa da traqueia.

No interior da luz traqueal e da prótese não foi observado o mesmo comportamento, visto que o tecido traqueal não apresenta suporte vascular eficiente e não tem capacidade para desenvolver produção celular satisfatória. A cartilagem que sofre trauma não se regenera bem, à exceção de crianças (Wu et al., 2007; Junqueira e Carneiro, 2008). Células do pericôndrio invadem a área lesionada e dão origem a tecido cartilaginoso que reparar o defeito, mas quando a área é extensa, ou mesmo, algumas vezes, em lesões pequenas, o pericôndrio, em vez de formar tecido cartilaginoso novo, gera cicatriz de tecido conjuntivo denso (Junqueira e Carneiro, 2008).

Foi constatado presença de resposta inflamatória mista, ou seja, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear em todas as amostras dos três grupos. Com ressalva de que, observa-se existência de forma acentuada de infiltrado polimorfonuclear em todos os animais do grupo de sete dias e em quatro animais no grupo de 15 dias, a medida que no grupo de 30 dias apenas uma amostra apresentou

tal padrão inflamatório de graduação acentuada. Da mesma forma sucede o infiltrado inflamatório mononuclear, visto que houve manifestação dessa categoria celular nos cinco animais do grupo de sete dias e em quatro animais no grupo de 15 dias, a proporção de que no grupo de 30 dias um animal obteve esse tipo de infiltrado de forma intensa.

A inflamação é a principal reação do organismo vivo à presença de corpo estranho. Consiste estruturalmente em exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas, edema, migração de leucócitos e principalmente neutrófilos, nas primeiras horas ou dias do processo agudo. Esta reação tornar-se-á crônica, com o passar dos dias, surgem os linfócitos e macrófagos e há proliferação de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo (Robbins et al., 1994). Segundo Bonzon et al. (1995), a biocompatibilidade dos enxertos revelam nos primeiros oito dias edema ao redor do tecido e reação inflamatória próximo do implante. Ocorre maior concentração de células inflamatórias, em sua maioria linfócitos e neutrófilos, na interface entre o implante e o tecido conjuntivo. Após 15 dias, há a proliferação de alguns capilares no tecido conjuntivo e no local de implantação. Não são observadas células gigantes multinucleadas de corpo estranho ou formação de cápsula fibrosa. Alguns macrófagos podem estar presentes. Após de três semanas percebe-se menor resposta inflamatória e o início da resposta fibroblástica. Com 30 dias, quase não é perceptível resposta inflamatória e o tecido conjuntivo está parcialmente organizado.

Esses dados condizem com a reação inflamatória analisadas em todos os grupos, pois houve estimulação de inflamação e incentivo de reparo tecidual tanto nas camadas da traqueia como na interface da prótese, essa última colocação mais evidente no grupo de 30 dias, por maior evidência de tecido fibroso e formação de novos capilares para deposição de tecido conjuntivo. Reação tipo corpo estranho, processo que acontece para tentar isolar o material inerte do restante do organismo, composta por macrófagos e monócitos bem ativados, com presença de células multinucleadas (gigantes) foi visto em apenas dois animais do grupo de sete dias em grau discreto na adventícia. Houve ausência total desse tipo celular e em três amostras do grupo de sete dias e em todos os animais dos grupos de 15 e 30 dias.

Crescimento celular intraluminal em área de prótese não foi visto, contudo foi notado a presença de desprendimento celular de leucócitos, restos celulares e

bactérias, uma vez que a prótese é um material inorgânico, e não dispõem da capacidade da proliferação celular espontânea sendo assim, as celularidades observadas na face interna do implante são fruto de tal migração.

Os resultados revelaram que o protótipo traqueal impresso em 3D poderia proporcionar integração biológica adequada com o tecido traqueal circundante. De acordo com a *American Society for Testing and Material (ASTM)*, biocompatibilidade é a relação entre a resposta tecidual submetida a aplicação do implante e o reconhecimento adequado do biomaterial em estudo.

Em adição as propriedades anatômicas do suporte traqueal implantado devem ser semelhantes às do tecido traqueal nativo. Durante a respiração, mudanças de alta pressão ocorrem no lúmen da traqueia, desde a pressão positiva alta (expiração) até a pressão negativa baixa (inspiração). Se a prótese traqueal não tiver rigidez suficiente e elasticidade, será eventualmente achatada. Por isso, foi selecionado PCTPE, perfazendo a classe de elastômeros que tem sido amplamente empregado na engenharia de tecidos (Zdrahala e Zdrahala, 1999), pelo fato de exigir flexibilidade e rigidez (Du et al., 2005; Verma e Marsden, 2005). A avaliação macroscópica revelou que a traqueia operada de todos os animais manteve sua forma sem distorção e deformidade. Sendo assim, a prótese de co-poliâmida associada ao elastômero termoplástico impresso em 3D demonstrou ser um excelente suporte, devido falta de falhas na área de enxertia, permitindo adequado fluxo de ar pelo conduto traqueal.

Por fim, próteses traqueais que utilizam tecnologia de impressão 3D, pelo método de modelagem por fusão e deposição, oferecem produção simples e personalizada com alta precisão (Murphy Atala, 2014; Chia et al., 2015). O protótipo traqueal possuiu arquitetura semelhante à traqueia original, contendo dimensões equivalentes, impermeabilização de ar e superfície rugosa para facilitar o crescimento do tecido hospedeiro. Em comparação com outras técnicas de fabricação, este método avançado de impressão 3D pode oferecer construções traqueais estáveis e personalizadas de qualquer tamanho e formato para uso clínico futuro (Kang et al., 2016).

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- O tempo de sobrevivência dos animais foram no máximo de 30 dias. Seria interessante avaliar a resposta in vivo por período maior, a fim de analisar a possibilidade de sinais clínicos futuros.

- Os transplantes traqueais foram aplicados em segmentos curtos com acometimento de 0,5 cm de traqueia de coelho. A realização de transplantes com acometimento de 30% - 50% do comprimento total da traqueia do animal para avaliação de comportamento celular seria opção futura.

- Não se tratou de um ensaio cíclico que avaliasse a fadiga da amostra utilizada, sendo pertinente estudo de resistência mecânica para aplicações que venham a provir.

- A partir da nova prótese de PCTPE impresso em 3D há a perspectiva de estudos que invistam na ciência de implantes customizados por impressora 3D como alternativa para o reparo de defeitos traqueais de grandes extensões.

8. CONCLUSÕES

Nas condições em que este trabalho fora conduzido é possível concluir que a prótese traqueal biomimética desenvolvida usando a tecnologia de impressão 3D são facilmente fabricados, oferecem boas características estruturais, ótima função anatômica e excelente integração biológica.

9. REFERÊNCIAS

Akiba T, Inagagaki T, Nakada, T (2013) Three-dimensional printing model of anomalous bronchi before surgery. **Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery** 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5761/atcs.cr.13-00189>>.

Amauchi W, Birolini D, Branco PD, Oliveira MR (1983) Lesões da Árvore Traqueobrônquica Por Traumatismo Torácico Fechado. **Revista do Hospital das Clínicas** 38:130-136.

Baiguera S, Birchall MA, Macchiarini P (2010) Tissue-engineered tracheal transplantation. **Transplantation** 89: 485-49.1

Banks J (2013) Adding value in additive manufacturing: Researchers in the United Kingdom and Europe look to 3D printing for customization. **IEEE Pulse** 4: 22–26.

Bartlett S (2013) Printing organs on demand. *Lancet Respiratory Medicine* 9:684.

Baumgartner F, Sheppard B, Virgilio C, Esrig B, Harrier D, Nelson RJ, Robertson, JM (1990) Tracheal and Main Bronchial Disruptions After Blunt Chest Trauma: Presentation and Management. **Annals of Thoracic Surgery** 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2222045>>.

Bird J (2012) Exploring the 3D printing opportunity. **The financial times** 1990. Disponível em: <<http://www.ft.com/cms/s/0/6dc11070-d763-11e1-a378-00144feabdc0.html#axzz24gFn5Cal>>.

Bonzon N, Carrat X, Deminière C, Daculsi G, Lefebvre F, Rabaud M (1995) New artificial connective matrix made of fibrin monomers, elastin peptides and type I + III collagens: structural study, biocompatibility and use as tympanic membranes in rabbit. **Biomaterials** 16:881-5.

Boogaard R, Huijsmans SH, Pijnenburg MW, Tiddens HÁ, Jongste JC, Merkus, PJ (2005) Tracheomalacia and bronchomalacia in children: incidence and patient characteristics. **Chest** 5:3391-3397.

Bustamante S, Bose S, Bishop P, Klatter R, Norris F (2014) Novel application of rapid prototyping for simulation of bronchoscopic anatomy. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia** 28:1134-1137.

Chia H; Nand; Wu BM 2015 Recent advances in 3D printing of biomaterials. **Journal of Biological Engineering** 9:4.

Choi JW, Kim N (2015) Clinical application of three-dimensional printing technology in craniofacial plastic surgery. **Archives of Plastic Surgery** 42: 267-277.

Chua CHM, Chui CK, Rai B, Lau DPD (2013) Development of a patient specific artificial tracheal prosthesis: design, mechanical behavior analysis and manufacturing In:

ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY SOCIETY **Anais eletrônicos...** New Jersey 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24111165> >.

Clarke DL, Holt DE, King LG (2011) Partial resolution of hypoplastic trachea in six english bulldog puppies with bronchopneumonia. **Journal of the American Animal Hospital Association** 47:329–335.

Conconi MT, De Coppi P, Di Liddo R, Vigolo S, Zanon GF, Parnigotto PP (2005) Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. **Transplant International** 18: 727-34.

Courey MS (1995) Airway obstruction. The problem and its causes. **Otolaryngologic Clinics of North America** 28:673-84

Coyne BE, Finland RB (1992) Hypoplasia of the trachea in dogs: 103 cases (1974–1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 201:768–772.
Cummins (2010). The rise of additive manufacturing. The engineer. **Revista eletrônica** Disponível em: <<http://www.theengineer.co.uk/issues/24-may-2010/the-riseof-additive-manufacturing/>>.

Cui X, Boland T, D'Lima DD, Lotz MK (2012) Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine. **Recent Patents Drug Delivery Formulation** 2:149–155.

Delaere P, Hardillo J, Hermans R, Van Den Hof B (2001). Prefabrication of composite tissue for improved tracheal reconstruction. **Annals of Otolaryngology & Laryngology** 110:849-858.

Du Y J, Klement P, Berry L R, Tressel P and ChanAK (2005) In vivo rabbit acute model tests of polyurethane catheters coated with a novel antithrombin-heparin covalent complex. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** 94:366–372.

Elliott MJ, Haw MP, Jacobs JP (1996) Tracheal reconstruction in children using cadaveric homograft trachea. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery** 10:707–712.

Ettinger SJ, Kantrowitz B, Brayley K (2004). Doenças da Traquéia. In: Ettinger, SJ, Feldman E (Eds.) **Tratado de medicina interna veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1096-112.

Fasanella FJ, Shivley JM, Wardlaw JL, Givaruangsawat S (2010) Brachycephalic airway obstructive syndrome in dogs: 90 cases (1991-2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 237:1048-1051.

Flecknell PA (2009). Preparing for anesthesia. In: Flecknell PA (Eds.) **Laboratory Animal**. Oxford: Elsevier, p. 1-15.

Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP (2011) Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. **The Annals of Thoracic Surgery** 72:577-591.

Gardner E, Gray DJ, O'Rahilly R (1963). Traquéia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Grillo HC, Donahue DM, Msthisen DJ, Wain JC, Wright CD (1995) Postintubation tracheal stenosis. Treatment and results. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery** 3:486-492.

Grillo HC (2002) Tracheal replacement: a critical review. **The Annals of Thoracic Surgery**. 73:1995-2004

Gross, BC, Erkal JL, Lockwood SY (2014) Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. **Analytical Chemistry** 7:3240–3253.

Goldstein TA, Smith BD, Zeltsman D, Grande Dand Smith LP (2015) Introducing a 3-dimensionally printed, tissueengineered graft for airway reconstruction: a pilot study. **Otolaryngology. Head Neck Surgery** 153:1001-1006.

Haag JC, Jungebluth P, Macchiarini P (2003) Tracheal replacement for primary tracheal cancer. *Head and Neck Oncology* 21: 171-177.

Hallers EJ, Rakhorst G, Marres HAM, Jansen JA, Kooten TG, Schutte HK (2004) Animal models for tracheal research. **Biomaterials** 25: 1533-1543.

Haykal S, Salna M, Waddell TK, Hofer S.O (2014) Advances in tracheal reconstruction **Plastic and Reconstructive Surgery – Global Open** 2-178.

Hoffmann KK, Kuhn JJ, Strasnick B (2003) Bone Cements as Adjuvant Techniques for Ossicular Chain Reconstruction. **Otology and Neurotology** 24:24-8.

Högset O, Bredberg G (1986) Plaster of Paris: thermal properties and biocompatibility. **Acta Otolaryngol** 101:445-52.

Hollingsworth. Abraçadeira de náilon “Easy –ty”. [online], 2010. Disponível em: <http://www.hollingsworth.com.br/abracadeiras.html>. Acesso em: 14 de janeiro de 2014.

Jungebluth P, Go T, Asnaghi A, Bellini S, Martorell J, Calore C (2009) Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery** 138: 586-93.

Junqueira LC, Carneiro J. Tecido cartilaginoso (2008). In.: Junqueira LC, Carneiro J (Eds.) **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 129-134.

Jung SY, Lee SJ, Kim HY, Park HS, Wang Z, Kim HJ, yoo JJ, Chung SM, Kim HS (2016) 3D printed polyurethane prosthesis for partial tracheal reconstruction: a pilot animal study. **IOPscience** 8: 1-10.

Kang HW, Lee SJ, Ko IK, Kengla C, Yoo JJ, Atala A (2016) A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. **Nature Biotechnology** 34:312–329.

Kaye R, Goldstein T, Zeltsman D, Grande DA, Smith LP (2016) Three dimensional printing: A review on the utility within medicine and otolaryngology. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology** 89:145-148.

Kirpenstejin J, Haar GT (2006) Tracheal trauma: Fixing it. **Proceedings of the North American Veterinary Conference - Small Animal Edition** 20:1413-1414.

Klein GT, Lu Y, Wang MY (2013) 3D printing and neurosurgery ready for prime time? **World Neurosurgery** 80:233–235.

Kodama H (1981) Automatic method for fabricating a three-dimensional plastic model with photo-hardening polymer. **Review of Scientific Instruments** 11:1770-1773.

Kojima K, Vacanti CA (2014) Tissue engineering in the trachea. **Anatomical record (Hoboken)** 44:55-54.

Laroia AT, Thompson BH, Laroia ST (2010) Imagem moderna da árvore traqueobrônquica. **World Journal of Radiology** 2:237-248.

Liu J, Zhang CP, Li Y, Dong S (2015) Post-intubation tracheal stenosis after management of complicated aortic dissection: a case series. **Journal of Cardiothoracic Surgery** 10:148.

Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnagui MA, Rees LE, Cogan TA (2008) Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. **Lancet** 372: 2023-2030.

Maeda K, Yasufuku M, Yamamoto T (2001) A new approach to the treatment of congenital tracheal stenosis: balloon tracheoplasty and expandable metallic stenting. **Journal of Pediatric Surgery** 36:1646-1649.

Marques RG (2005). Técnica operatória e cirurgia experimental. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 301-314.

Martinod E, Seguin A, Holder-Espinasse M, Kambouchner M, Duterque-Coquillaud M, Azorin JF (2005) Tracheal regeneration following tracheal replacement with an allogenic aorta. **Thoracic Surgery** 79: 942–949.

Meijer AGW, Segenhout HM, Albers FWJ, van de Want HJL (2002) Histopathology of biocompatible hydroxylapatite-polyethylene composite in ossiculoplasty. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia** 64:173-179.

Mertz L (2013) Dream it, design it, print it in 3-D: What can 3-D printing do for you? **IEEE Pulse** 6: 15–21.

Montovani JC, Nakajima V (2003) Alterações epiteliais e cartilaginosas em cirurgia traqueal: estudo experimental em cobaias. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia** 69: 159-164.

Murphy SV, Atala A (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology* 32:773–85.

Musah S, Chen J, Hoyle GW (2012) Repair of tracheal epithelium by basal cells after chlorine-induced injury. **Respiratory Research** 13:107

Nakada T, Akiba T, Inagaki T (2014) Thoracoscopic anatomical subsegmentectomy of the right S2bp S3 using a 3D printing model with rapid prototyping. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery** 19:696-698.

Neville WE, Bolanowski JP, Kotia GG (1990). Clinical experience with the silicone tracheal prosthesis. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery** 99:604 -613.

Park JH, Jung JW, Kang HW, Joo YH, Lee JS, Cho DW (2012) Development of a 3D bellows tracheal graft: mechanical behavior analysis, fabrication and an in vivo feasibility study. **Biofabrication** 4:1-10.

Peppas NA, Langer R (1994)New challenges in biomaterials. **Science** 25: 1715-1720.

Pereira BMT, Cassin WS, Fiorelli RKA (2011) Trauma de laringe e traqueia. In.: Andreollo NA, Aquino JLB, Martineza CAR (Eds.) **Atualidades em Clínica Cirúrgica: Intergastro e Trauma**. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 75-87.

Piatti TM, Rodrigues RAF. **Plásticos: características, usos, produção e impactos ambientais**, 2005, EDUFAL.

Pinchuk LJ (1995) A review of the biostability and carcinogenicity of polyurethanes in medicine and the new generation of 'biostable' polyurethanesBiomater. **Journal of Polymer Science** 3:225.

Reed SD, Evans DE (2009). Tracheal hypoplasia with a discrete subaortic septal ridge in a Rottweiler puppy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 21:17-119.

Riecks TW, Birchard SJ, Stephens A (2007) Surgical correction of brachycephalic syndrome in dogs: 62 cases (1991–2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 1:1324-1328.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V (1994) **Pathologic basis of disease**. 5 Ed. Philadelphia: W. B. Saunders 52-92.

Sarper A, Ayten A, Eser I, Ozbudak O, Demircan A (2005) Tracheal stenosis after tracheostomy or intubation: review with special regard to cause and management. **Texas Heart Institute Journal** 32:154-158.

Scott K, Hardie E, Marks SL (2006) Tracheal lacerations. **Journal of Emergency and Critical Care Medicine** 11:1-4.

Shaari CM, Farber D, Brandwein MS, Gannon P, Urken ML (1998) Characterizing the antigenic profile of the human trachea: implications for tracheal transplantation. **Head Neck** 20: 522-527.

Shaw RR, Paulson DL, Kee JL (1961). Traumatic Tracheal Rupture. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surger** 42:281-297.

Shi H, Zhifei X, Xiong Q, Zhao, Lu D (2005) Experimental Study of Replacing Circumferential Tracheal Defects With New Prosthesis. **Thoracic Surgery** 79:672–677.

Schubert C, van Langeveld MC, Donoso LA (2014) Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. **British Journal of Ophthalmology** 2:159–161.

Schwager K, Geyer G (1998) Titanium and glass-ionomer cement as ossicular replacement materials: biocompatibility results after implantation in the rabbit. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia** 60:322-328.

Slatter HB (Eds.) (1985) **Textbook of small animal surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders 2:2718.

Souza, M. **Aspectos morfológicos da cicatrização de feridas cirúrgicas da pele de ratos suturadas com diferentes tipos de fios de poliamida**. 2001. 43 f. Dissertação (Mestrado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

Spiegel JH, Kessler JL (2005) Tympanic membrane perforation repair with acellular porcine submucosa. **Otology and Neurotology** 26:563-6.

Stadler K, Hartman S, Matheson J, O'Brien R (2011) Computed tomographic imaging of dogs with primary laryngeal or tracheal airway obstruction. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 52:377-384.

Suter PF, Colgrove DJ, Ewing GO (1972) Congenital hypoplasia of the canine trachea. **Journal of the American Animal Hospital Association** 8:120-127.

Suter PF, Lord PF (1984) Diseases of the Nasal Cavity, Larynx, and Trachea. In.: Suter PF, Lord PF (Eds.) **Thoracic Radiography: A Text Atlas of Thoracic Disease in the Dog and Cat**. Switzerland: Wettswil, p. 237-240.

Tsang V, Murday A, Gillbe C (1989) Slide tracheoplasty for congenital funnel-shaped tracheal stenosis. **Annals of Thoracic Surgery** 48:632-635.

Trabandt N, Brandes G, Wintermantel E, Lenarz T, Stieve M (2004) Limitations of Titanium Dioxide and Aluminum Oxide as Ossicular Replacement Materials: An Evaluation of the Effects of Porosity on Ceramic Prostheses. **Otology and Neurotology** 25:682-93.

Verma S; Marsden PA 2005 Nitric oxide-eluting polyurethanes vascular grafts of the future?. **New England Journal of Medicine** 353:730–731.

Vince DG, Hunt JA, Williams DF (1991) Quantitative assessment of the tissue response to implanted biomaterials. **Biomaterials** 12:731-736.

Vondrys D, Elliott MJ, Mc Laren CA (2011) First experience with biodegradable airway stents in children. **Annals of Thoracic Surgery** 92:1870-1874.

Webakey ME (1962) The use of heavy Marlex mesh for tracheal reconstruction following resection for malignancy. **Journal Thoracic Cardiovascular Surgery** 44:520-527.

Worman LW, Pemberton AH, Narodick BG (1964) Tracheoplasty by means of a periosteal pedicle graft. **Journal Thoracic Cardiovascular Surgery** 47:572-576.

Zdrahala RJ, Zdrahala IJ 1999 Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. **Journal of Biomaterials Science** 14:67–90.

Zein NN, Hanouneh IA, Bishop PD (2013) Three-dimensional print of a live for preoperative planning in living donor liver transplantation. **Liver Transplant** 19:1304-1310.

Zhu W, Ma X, Gou M, Mei D, Zhang KZ, Chen S (2016) 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. **Current Opinion in Biotechnology** 40:103-112.

Zook BC, Hathaway JE (1966) Tracheal stenosis and congenital cardia anomalies in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 149:298-302.

Weber DE, Semaan MT, Wasman JK, Beane R, Bonassar LJ, Megerian CA (2006) Tissue-Engineered Calcium Alginate Patches in the Repair of Chronic Chinchilla Tympanic Membrane Perforations. **Laryngoscope** 116:700-4.

Wu W, Cheng X, Zhao Y, Chen F, Feng X, Mao T (2007) Thoughts and progress. Tissue engineering of trachea-like cartilage grafts by using chondrocyte macroaggregate: experimental study in rabbits. **Artificial Organs** 31: 826-834.

10. APÊNDICES

Apêndice 1. Critérios da avaliação macroscópica das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos do grupo de sete dias. Jaboticabal, 2018.

TABELA 1. CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO MACRSCÓPICA					
GRUPO 7 DIAS					
CRITÉRIOS	ANIMAIS				
	1A	2A	3A	4A	5A
ADERÊNCIA	+	+	+	+	+
SINAIS DE INFECÇÃO	++	+	+	-	-
GRANULOMA	+++	++	-	-	+
DEISCÊNCIA DE SUTURA	-	-	-	-	-
DEFORMIDADE TRAQUEAL	-	-	-	-	-
RECOBRIMENTO TECIDUAL	+	-	-	-	+

Ausente = (-) Discreto = (+), Moderado = (++) , Acentuado = (+++)

Apêndice 2. Critérios da avaliação macroscópica das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos do grupo de 15 dias. Jaboticabal, 2018.

TABELA 2. CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO MACRSCÓPICA					
GRUPO 15 DIAS					
CRITÉRIOS	ANIMAIS				
	1B	2B	3B	4B	5B
ADERÊNCIA	++	++	++	++	++
SINAIS DE INFECÇÃO	-	-	-	-	-
GRANULOMA	+	-	+	-	-
DEISCÊNCIA DE SUTURA	-	-	-	-	-
DEFORMIDADE TRAQUEAL	-	-	-	-	-
RECOBRIMENTO TECIDUAL	++	++	++	++	++

Ausente (-), Discreto = (+), Moderado = (++) , Acentuado = (+++)

Apêndice 3. Critérios da avaliação macroscópica das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos do grupo de 30 dias. Jaboticabal, 2018.

TABELA 3. CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO MACRSCÓPICA					
GRUPO 30 DIAS					
CRITÉRIOS	ANIMAIS				
	1C	2C	3C	4C	5C
ADERÊNCIA	++	++	++	++	++
SINAIS DE INFECÇÃO	-	-	-	-	-
GRANULOMA	+	-	+	-	-
DEISCÊNCIA DE SUTURA	-	-	-	-	-
DEFORMIDADE TRAQUEAL	-	-	-	-	-
RECOBRIMENTO TECIDUAL	+++	+++	+++	+++	+++

Ausente (-), Discreto = (+), Moderado = (++) , Acentuado = (+++)

Apêndice 4. Critérios da análise histopatológica das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos do grupo de sete dias. Jaboticabal, 2018.

GRUPO 7 DIAS					
CRITÉRIOS	ANIMAIS				
	1A	2A	3A	4A	5A
GRAU DE INFLAMAÇÃO	+++	+++	+++	+++	+++
INFILTRADO POLIMORFONUCLEAR	+++	+++	+++	+++	+++
INFILTRADO MONONUCLEAR	+++	+++	+++	+++	+++
INFILTRADO DE CÉLULAS GIGANTES	-	-	-	+	+
CONGESTÃO VASCULAR TRAQUEAL	+	++	+++	+++	+++
EDEMA CELULAR OU INTERSTICIAL TRAQUEAL	+	++	+++	+++	+++
HEMORRAGIA TRAQUEAL	-	-	+	-	-
FIBROSE EM REGIÃO TRAQUEAL	-	-	-	-	-
FIBROSE EM REGIÃO DE PRÓTESE E ANASTOMOSE	-	-	-	-	-
ESTENOSE INTRALUMINAL	-	-	-	-	-
PROLIFERAÇÃO TECIDUAL TRAQUEAL (EXTERNO)	-	-	-	-	-
PROLIFERAÇÃO TECIDUAL TRAQUEAL (INTERNO)	+	-	-	-	+

Discreto = (+), Moderado = (++) , Acentuado = (+++)

Apêndice 5. Critérios da análise histopatológica das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos do grupo de 15 dias. Jaboticabal, 2018.

GRUPO 15 DIAS					
CRITÉRIOS	ANIMAIS				
	1B	2B	3B	4B	5B
GRAU DE INFLAMAÇÃO	+++	+++	+++	+++	++
INFILTRADO POLIMORFONUCLEAR	+++	+++	+++	+++	++
INFILTRADO MONONUCLEAR	+++	+++	+++	+++	++
INFILTRADO DE CÉLULAS GIGANTES	-	-	-	-	-
CONGESTÃO VASCULAR TRAQUEAL	+++	+++	++	+	+++
EDEMA CELULAR OU INTERSTICIAL TRAQUEAL	+++	+++	++	+	+++
HEMORRAGIA TRAQUEAL	++	-	++	-	+
FIBROSE EM REGIÃO TRAQUEAL	-	-	-	-	-
FIBROSE EM REGIÃO DE PRÓTESE E ANASTOMOSE	++	+++	++	+	-
ESTENOSE INTRALUMINAL	-	-	-	-	-
PROLIFERAÇÃO TECIDUAL TRAQUEAL (EXTERNO)	++	++	++	++	++
PROLIFERAÇÃO TECIDUAL TRAQUEAL (INTERNO)	-	-	-	-	-

Discreto = (+), Moderado = (++) , Acentuado = (+++)

Apêndice 6. Critérios da análise histopatológica das próteses traqueais impressas em impressora 3D em coelhos do grupo de 30 dias. Jaboticabal, 2018.

GRUPO 30 DIAS					
CRITÉRIOS	ANIMAIS				
	1C	2C	3C	4C	5C
GRAU DE INFLAMAÇÃO	++	+++	++	++	+
INFILTRADO POLIMORFONUCLEAR	++	+++	++	++	+
INFILTRADO MONONUCLEAR	++	+++	++	++	++
INFILTRADO DE CÉLULAS GIGANTES	-	-	-	-	-
CONGESTÃO VASCULAR TRAQUEAL	++	+++	++	+++	+++
EDEMA CELULAR OU INTERSTICIAL TRAQUEAL	++	+++	++	+++	+++
HEMORRAGIA TRAQUEAL	-	-	++	-	-
FIBROSE EM REGIÃO TRAQUEAL	-	-	-	-	-
FIBROSE EM REGIÃO DE PRÓTESE E ANASTOMOSE	++	+++	+	+++	++
ESTENOSE INTRALUMINAL	-	-	-	-	-
PROLIFERAÇÃO TECIDUAL TRAQUEAL (EXTERNO)	+++	+++	+++	+++	+++
PROLIFERAÇÃO TECIDUAL TRAQUEAL (INTERNO)	-	-	-	-	-

Discreto = (+), Moderado = (++) , Acentuado = (+++)