

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**“COMPARAÇÃO HISTOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA
DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO PROCESSO DE
REPARAÇÃO TRAQUEAL COM O USO DE BIOPRÓTESES
EM COELHOS”**

Polyanne Ferreira e Fonseca
Médica Veterinária

2023

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

**“COMPARAÇÃO HISTOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA
DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO PROCESSO DE
REPARAÇÃO TRAQUEAL COM O USO DE BIOPRÓTESES
EM COELHOS”**

Discente: Polyanne Ferreira e Fonseca

Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Coorientadora: Profa. Dra. Josiane Moraes Pazzini

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.

2023

F676c

Fonseca, Polyanne Ferreira e

Comparação histoquímica e imunistoquímica da resposta inflamatória no processo de reparação traqueal com o uso de bioprótese em coelho / Polyanne Fonseca. -- Jaboticabal, 2023

51 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Paola Castro Moraes

Coorientadora: Josiane Morais Pazzine

1. Angiogenese. 2. Estudo comparativo. 3. Imunomarcção. 4. Inflamação. 5. Histopatológico. 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.

O REGISTRO DE IMPACTO

Pesquisas envolvendo reparação tecidual e materiais biocompatíveis apresentam relevância, pois proporcionam implantes alternativos e mais acessíveis financeiramente. O presente trabalho comprovou, por meio de análise histopatológica e imuno-histoquímica, que a reparação tecidual traqueal com implante de copoliâmida associado a elastômero termoplástico pode ser considerado biocompatível e pode ser utilizado na cirurgia de tecidos cartilagosos como a traqueia.

Researches involving technological components and biocompatible materials are relevant for obtaining alternative and more financially accessible implants. This study confirmed by histopathological analysis and immunohistochemistry that tracheal tissue repair with copolyamide implant associated with thermoplastic elastomer can be considered biocompatible and can be used in surgery of cartilaginous tissues such as the trachea.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: COMPARAÇÃO HISTOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TRAQUEAL COM O USO DE BIOPRÓTESES EM COELHOS

AUTORA: POLYANNE FERREIRA E FONSECA
ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES
COORIENTADORA: JOSIANE MORAIS PAZZINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Cirurgia Veterinária, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Virtual)
Depto de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. ANA MARIA DE SOUZA ALMEIDA (Participação Virtual)
Departamento de Ornitopatologia / Universidade Federal de Goiás - UFG

Documento assinado digitalmente
PAOLA CASTRO MORAES
Data: 17/07/2023 14:21:55-0300
Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

Profa. Dra. ANELISE CARLA CAMPESI DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
ANELISE CARLA CAMPESI DOS SANTOS
Data: 14/07/2023 10:49:18-0300
Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

Jaboticabal, 14 de julho de 2023

g.vb ANELISE CARLA CAMPESI DOS SANTOS
Data: 17/07/2023 14:26:54-0300
Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Polyanne Ferreira e Fonseca, nascida em Goiânia, estado de Goiás, no dia dezesseis do mês de setembro de 1979. Concluiu o ensino médio no Centro Educacional Riacho Fundo - Distrito Federal, no ano de 1997. Ingressou no curso de Medicina Veterinária pela Universidade Pioneira de Integração Social — UPIS/DF em 2011 e obteve o título de Bacharel em Medicina Veterinária em dezembro de 2016. Entre os anos 2017 e 2018, participou do III Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia de pequenos animais, pela Fundação de Apoio e Pesquisa, Ensino e Extensão — FUNEP, na FCAV/UNESP. Ingressou em março de 2021 como aluno regular no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/UNESP, nível de Mestrado, sob orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes e coorientação da Profa. Dra. Josiane Moraes Pazzini, Unilago São José do Rio Preto. Atua como Conselheira efetiva no Conselho Regional de Medicina Veterinária do Distrito Federal — CRMV/DF, desde o ano de 2019, até o presente momento.

EPÍGRAFE

*“O que não dá prazer não dá proveito. Em
resumo, senhor, estude apenas o que lhe
agradar.”*

- William Shakespeare

DEDICATÓRIA

Este trabalho foi proveniente do meu esforço e dedicação, juntamente com o apoio da minha família no qual dedico e agradeço por mais uma vitória alcançada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por me conceder mais uma vitória e me abençoar para que eu conseguisse seguir em frente mesmo diante de tantos obstáculos.

Às minhas irmãs por compartilharem comigo seu tempo e que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha mãe e ao meu pai por tanto apoio e dedicação para traçar comigo esse mestrado que é de suma importância em minha vida.

Obrigada aos meus amigos que compartilharam comigo palavras, apoio e conforto em tantos momentos imparciais que passei.

E deixar registrado aqui meu enorme amor pelas minhas cadelas Cindy e Layla que estavam presentes ao meu lado me dando tanto carinho.

Agradeço também à Orientadora Dra. Paola Castro Moraes, da UNESP de Jaboticabal, pela oportunidade deste mestrado, a qual sua orientação foi de extrema relevância para realização deste projeto, me proporcionando assistência e amparo dia após dia, a ajuda com as documentações de ingresso na universidade, do apoio nas matérias que tive dificuldades, na prova de proficiência de inglês e que me incentivou compartilhou seu conhecimento durante todo esse tempo comigo.

E a coorientadora Dra. Josiane Morais Pazzini da Unilago, São José do Rio Preto, que me orientou nas demandas que surgiram durante o projeto, me ajudando a resolvê-los e que também doou um dos reagentes que tive uso durante todo o processo e na doação das lâminas de pele de rato.

Ao meu amigo Gabriel João Unger Carra, da UNESP de Jaboticabal que me ajudou no processo prático das lâminas com leitura e coloração, na ajuda por protocolar as documentações necessárias na universidade, no qual teve tanta compreensão e empatia comigo para me assegurar de que cada passo dado tinha muita importância nessa jornada.

À professora Marina Zimmermann Galvão, da Universidade CEUB, no qual realizei meu estágio, agradeço a ajuda, sabedoria e compreensão e; por sua equipe que sempre me trataram com muita cordialidade.

E ao professor Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves, da UNESP, por ter me

cedido os reagentes necessários para o desenvolvimento do meu trabalho.

Agradeço também ao mestre da UnB, Davi Emanuel Ribeiro de Souza, pela ajuda na confecção das lâminas de imunistoquímica e à professora Ana Maria de Souza Almeida, doutora da UFG, por toda ajuda e apoio para a confecção do trabalho.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|-----------|
| CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS | ii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | v |
| LISTA DE FIGURAS | vi |
| LISTA DE QUADROS | vii |
| CAPÍTULO 1. Considerações Gerais | 1 |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 3. OBJETIVO..... | 8 |
| 3.1. Objetivo Geral | 8 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 8 |
| 4. REFERÊNCIAS..... | 9 |
| CAPÍTULO 2. Comparação histoquímica e imunoistoquímica da resposta inflamatória no processo de reparação traqueal com o uso de biopróteses em coelhos | 12 |
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 14 |
| 2.1. Aspectos Éticos..... | 14 |
| 2.2. Amostras | 14 |
| 2.3. Avaliação Imunoistoquímica | 15 |
| 2.4. Delineamento Estatístico..... | 17 |
| 3. RESULTADOS | 19 |
| 4. DISCUSSÃO | 26 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 29 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 30 |

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.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

COMPARAÇÃO HISTOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TRAQUEAL COM O USO DE BIOPRÓTESES EM COELHOS

RESUMO — Na rotina da Medicina Veterinária, o transplante traqueal é opção terapêutica para casos de estenoses traqueais e colapso de traqueia grau IV, porém, há ainda grande taxa de insucesso por conta de necrose e tecido de granulação. Diante do desafio de encontrar qual biomaterial é melhor para a implantação de próteses traqueais, objetivou-se com esta pesquisa avaliar por meio de imunohistoquímica amostras de implante de co-poliâmida em anastomose traqueal de coelho (*Oryctolagus cuniculus*), referentes aos tempos pós-operatórios de 7 dias (Grupo A; n=5), 15 dias (Grupo B; n= 5) e 30 dias (Grupo C; n= 4). Após o processamento para avaliação histológica das amostras, lâminas foram confeccionadas para análise imunohistoquímica para avaliar angiogênese, reparação tecidual e inflamação, por meio dos anticorpos Caveolina-1, Colágeno tipo II e Colágeno tipo III, macrófago HAM 56 e Interleucina I, e a avaliação destes indicadores foi realizada pela contagem de células marcadas por meio de análise semi-qualitativa. Para a análise estatística foram utilizados o teste de Shapiro-Wilk, teste de Kruskal-Wallis e Dunn, com nível de significância de $p \leq 0,05$. Na comparação entre o presente estudo e o estudo realizado por Yamashiro (2019), observou-se que as técnicas de imunohistoquímica e histoquímica se completam para avaliar os implantes traqueais. Quando comparado o processo inflamatório, as duas avaliações apresentaram resultados semelhantes nos grupos A, B e C, sendo observado grau de inflamação acentuado no grupo A, e moderado no grupo B e discreto em C. Em relação à avaliação angiogênica, a análise imunohistoquímica não foi expressiva para essa marcação, apresentando um escore discreto para todos os grupos, diferentemente da análise histoquímica em que foi melhor detectada essa variável. Quando analisados os resultados obtidos em relação à reparação tecidual, a avaliação imunohistoquímica foi mais precisa, apresentando marcação mais expressiva nos três grupos de colágeno tipo II e colágeno tipo III, quando comparado com os resultados histoquímicos em que não foi observada diferença significativa de proliferação tecidual após a implantação traqueal. Diante destes resultados, pode-se concluir que ambas as técnicas são importantes e se completam no processo de averiguação do grau de angiogênese, reparação tecidual e inflamação após implantação de próteses traqueais.

Palavras-chave: angiogênese, estudo comparativo, imunomarcação, inflamação, histopatológico, reparação tecidual

HISTOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL COMPARISON OF THE INFLAMMATORY RESPONSE IN THE TRACHEAL REPAIR PROCESS WITH THE USE OF BIOPROSTHESES IN RABBITS

ABSTRACT - In Veterinary Medicine's routine, tracheal transplantation is a therapeutic option for cases of tracheal stenosis and grade IV tracheal collapse, for example, however, there is still a high rate of failure due to necrosis and granulation tissue. Faced with the challenge of finding which biomaterial is best for the implantation of tracheal prostheses, the objective of this research was to evaluate, by means of immunohistochemistry, samples of co-polyamide implantation in tracheal anastomosis of a rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), referring to the postoperative times of 7 days (Group A; n=5), 15 days (Group B; n=5) and 30 days (Group C; n=4). After processing for histological evaluation of the samples, slides were prepared for immunohistochemical analysis to evaluate angiogenesis, tissue repair and inflammation, using antibodies Caveolin-1, Collagen type II and Collagen type III, macrophage HAM 56 and Interleukin I, and the evaluation of these indicators was carried out by counting the marked cells through semi-qualitative analysis. For statistical analysis, the Shapiro-Wilk test, Kruskal-Wallis and Dunn test were used, with a significance level of $p \leq 0.05$. In the comparison between the present study and the study carried out by Yamashiro (2019), it was observed that the immunohistochemistry and histochemistry techniques complement each other to evaluate tracheal implants. When comparing the inflammatory process, the two evaluations showed similar results in groups A, B and C, with a marked degree of inflammation being observed in group A, and moderate in group B and mild in C. Regarding the angiogenic evaluation, the immunohistochemical analysis did not was significant for this marking, presenting a discrete score for all groups, unlike the histochemical analysis in which this variable was better detected. When analyzing the results obtained in relation to tissue repair, the immunohistochemical evaluation was more accurate, showing more expressive marking in the three groups of collagen type II and collagen type III, when compared with the histochemical results in which no significant difference in tissue proliferation was observed. after tracheal implantation. Given these results, it can be concluded that both techniques are important and complement each other in the process of investigating the degree of angiogenesis, tissue repair and inflammation after implantation of tracheal prostheses.

Keywords: angiogenesis, comparative study, immunostaining, inflammation, histopathological, tissue repair

LISTA DE ABREVIATURAS

3D tridimensional

°C: graus célsius

CAV-I: caveolina I

CD: reparo caudal

CID: coagulação intravascular disseminada

Cox-2 ciclo-oxigenase-2

CR: reparo cranial

CSD: caveolin scaffolding domain

FNT: fator de necrose tumoral

FTC β : fator transformador de crescimento β

HAM 56: human alveolar macrophage 56

HE hematoxilina eosina

h: hora/horas

IL: interleucina

IL-1: interleucina tipo 1

IL-2: interleucina tipo 2

IL-4: interleucina tipo 4

IL-6: interleucina tipo 6

IL-7: interleucina tipo 7

IL-10: interleucina tipo 10

IL-12: interleucina tipo 12

IL-13 interleucina tipo 13

MEC: matriz extracelular

PCTPE: poliamida associada a elastômero termoplástico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. 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: Yamashiro, 2019 18
- Figura 2. Imunomarcção de Interleucina I na avaliação semi-qualitativa, Grupo B. Aumento de 40x. (Laboratório de Imunoistoquímica: FCAV-UNESP, Jaboticabal, 2022) 22
- Figura 3. Imunomarcção de Macrófago HAM 56 na avaliação semi-qualitativa, Grupo B. Aumento de 40x. (Laboratório de Imunoistoquímica: FCAV-UNESP, Jaboticabal, 2022)..... 244
- Figura 4. Imunomarcção de Caveolina I na avaliação semi-qualitativa, Grupo B. Aumento de 40x. (Laboratório de Imunoistoquímica: FCAV-UNESP, Jaboticabal, 2022) 24
- Figura 5. Imunomarcção do Colágeno II na avaliação semi-qualitativa, Grupo C. Aumento de 40x. (Laboratório de Imunoistoquímica: (FCAV-UNESP, Jaboticabal, 2022) 25
- Figura 6. Imunomarcção do Colágeno III na avaliação semi-qualitativa, Grupo C. Aumento de 40x. (Laboratório de Imunoistoquímica: FCAV-UNESP, Jaboticabal, 2022) 25

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Avaliação dos indicadores mediante cada marcador | 19 |
| Quadro 2. Descrição da técnica de imunoistoquímica realizada em cada marcador | 20 |

CAPÍTULO 1. Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

Segundo Grenzel (2019), um dos avanços tecnológicos mais impressionantes das últimas décadas é a impressão tridimensional (3D). A impressão 3D produz objetos por meio do processo de adição de camada sobre camada de materiais, que se baseia em modelo virtual, gerado por computador a partir de dados segmentados de seções transversais bidimensionais, permitindo a produção precisa de modelos em pouco tempo e com custos baixos (Kim et al., 2017).

Estudos que envolvem transplantes traqueais apresentam grande taxa de insucesso, necrose e tecido de granulação (Grillo, 2002). Modelos sintéticos desenvolvidos para reposição da traqueia apresentam vantagens como adaptação à forma, tamanho e características biomecânicas previamente determinadas, entretanto, geram falhas por não adquirirem estruturas macro e micro anatômicas do órgão (Haykal et al., 2014). Dentre os biomateriais, os polímeros estão dentre os mais empregados no âmbito médico, ondes suas principais características são a biodegradabilidade e a biocompatibilidade (Pires et al., 2017).

A quantificação do processo inflamatório para determinar a resposta do hospedeiro à bioprótese e sua durabilidade após a implantação pode ser realizada por métodos como histoquímica ou a imunoistoquímica. Colorações histoquímicas consistem no conjunto de reações químicas específicas das estruturas ou substâncias endógenas do tecido. Já a imunoistoquímica permite observar proteínas presentes nos tecidos relacionadas com fatores determinantes do comportamento biológico e patológico. A padronização dos métodos que avaliam a angiogênese, o grau de inflamação e de reparação tecidual são importantes, a fim de facilitar a execução das pesquisas, bem como para auxiliar na interpretação dos dados (Pazzini et al, 2017).

Para a avaliação da resposta à substituição traqueal por implante impresso em 3D, no presente estudo, utilizaram-se os marcadores Interleucina I, Macrófago HAM 56, Caveolina I e Colágeno tipo II e tipo III, marcadores estes específicos para as

diferentes fases que ocorrem após o trauma inicial, sendo elas a fase de inflamação, a fase de angiogênese e a fase de reparação tecidual, respectivamente.

Podemos dizer que a avaliação histoquímica por meio da coloração Hematoxilina e Eosina é eficaz na avaliação da resposta inflamatória em casos de substituição traqueal com uso de implantes impressos em 3D? Buscou-se comparar os achados por meio de reações histoquímicas e imunoistoquímicas com o uso de marcadores específicos para reparação tecidual.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Há, no âmbito da medicina, a necessidade do desenvolvimento de técnicas que permitam a substituição, ou ao menos, a reconstrução parcial de diversos órgãos, entre eles a traqueia. O tratamento cirúrgico das afecções traqueais ainda é grande desafio ao cirurgião, tendo em vista que, dentre vários tecidos e materiais sintéticos avaliados, o material ideal para o substituto traqueal ainda não foi estabelecido (Drachler et al., 2015).

Infecções, deiscências, estenoses e lesões de estruturas adjacentes são apenas algumas das complicações mais graves e frequentes em cirurgias relacionadas à reconstrução de defeitos na traqueia (ressecção de segmento traqueal e anastomose término-terminal), seja para correção de estenoses ou ressecção de tumores (Miranda, 2009). Os vários métodos e técnicas utilizando, por exemplo, modelos sintéticos para substituição da traqueia, têm apresentado várias complicações que, para serem minimizadas, faz-se necessária a consideração da anatomia, desenvolvimento biológico e enfermidades de cada paciente, o que estimula pesquisas para métodos alternativos no manejo dos defeitos traqueais (Haykal et al., 2014; Kim et al., 2017).

Dentre tais métodos, o uso de biomateriais se mostra promissor no meio acadêmico, principalmente na área da saúde. Dentre eles, podem ser citados como exemplos os dispositivos biomédicos (como biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise), materiais implantáveis (como suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, dentes), dispositivos para a liberação de medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele) e curativos, dentre muitos outros (Pires et al., 2017).

Não há consenso na literatura sobre a definição do termo biomaterial. Nesta pesquisa, será adotada a definição defendida por Willians (2009), em que o autor a toma como qualquer substância, excluindo fármacos, desenvolvida independente ou como parte de um sistema complexo, e que podem ser utilizados como parte de um tratamento ou procedimentos diagnósticos, aumentando ou substituindo algum tecido, órgão ou função do corpo independentemente do período de tempo que seja utilizado por meio de interações em pacientes humanos e veterinários.

Desta forma, ao se considerar o uso de biomateriais num organismo vivo, faz-se necessária discussão relacionada ainda a dois fatores: a biocompatibilidade e a biofuncionalidade. A biocompatibilidade pode ser entendida como a compatibilidade do material com tecidos ou órgãos vivos, uma vez que não exista toxicidade, nocividade nem induza rejeição imunológica, já a biofuncionalidade está relacionada à capacidade do biomaterial, sendo biocompatível, de desempenhar a função pretendida do organismo (Geetha et al., 2008). Assim, a associação entre biocompatibilidade e biofuncionalidade expressam a capacidade do biomaterial de desenvolver adequadamente a função desejada com aceitação pelo organismo, considerando suas características mecânicas, físicas e químicas (Almeida Filho, 2012).

Dentre os diversos materiais utilizados na produção de biomateriais, Pires et al., (2017) listam os metais, as cerâmicas, os polímeros sintéticos ou naturais e os compósitos, materiais que são constituídos de mais de um tipo de material insolúveis entre si. Dentre estes, os polímeros possuem grande variedade e podem ser aplicados em diversos campos, com a vantagem do baixo custo de produção se comparados aos demais (Silva e Silva, 2003), assim, os biomateriais poliméricos estão dentre os mais empregados no âmbito médico.

Das ferramentas tecnológicas com destaque nesta área, é possível citar a impressão 3D, que permite a produção de materiais com dimensões milimetricamente precisas e baseadas em dados específicos de cada paciente, possibilitando procedimentos cada vez mais personalizados (Miranda, 2009).

Diversos materiais podem ser utilizados para a impressão de próteses em três dimensões, dentre eles, a co-poliâmida é sabidamente biocompatível, caracterizando-se pela elasticidade devido a sua resistência mecânica, produzindo baixa reatividade tecidual (Yamashiro, 2019). Apresenta propriedades atóxicas, mínima reação inflamatória e pode ser empregada em quase todos os tipos de tecidos (Souza, 2001).

A ideia da associação da co-poliâmida com o elastômero termoplástico (PCPTE) 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).

A integração biológica e resposta inflamatória entre o implante manufaturado implantado e o tecido hospedeiro adjacente é fundamental para promover reparação tecidual. Essa avaliação pode ser feita por meio das análises histopatológicas, que são as mais comuns (Yamashiro, 2019), e a imunoistoquímica, que surge como

alternativa para determinar a expressão de biomarcadores específicos em diferentes tipos de células e tecidos, por meio do princípio antígeno-anticorpo (Miranda, 2009).

A avaliação histopatológica da biocompatibilidade dos enxertos revela 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. Alguns macrófagos podem estar presentes. Após três semanas há 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 (Bonzon et al., 1995).

Para a análise imunoistoquímica, faz-se uso de marcadores específicos que são característicos de eventos celulares particulares, tais como proliferação ou apoptose (Pazzini et al., 2017). O objetivo da imunoistoquímica é reconhecer antígenos para assim identificar e classificar células específicas dentro de uma população celular morfológicamente heterogênea. A visualização do complexo antígeno-anticorpo por meio do microscópio é possível pela adição de um conjugado ou de uma enzima ao anticorpo (Capelozzi, 2009).

Em relação às citocinas, são polipeptídeos ou glicoproteínas intracelulares hidrossolúveis, produzidas pelas células no local da lesão ou por células do sistema imunológico por meio da ativação de proteinoquinases. Estas substâncias se ligam a receptores específicos ativando mensageiros intracelulares que regulam a transição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar ou atenuar a resposta inflamatória, sendo consideradas citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, respectivamente, de acordo com o microambiente que estão localizadas (Oliveira et al., 2011).

Como não é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto à função biológica, elas foram agrupadas em Interleucinas (IL), sendo numeradas sequencialmente de IL-1 a IL-35. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as IL-1, 2, 6, 7 e o FNT (Fator de Necrose Tumoral). As anti-inflamatórias são as IL-4, IL-10, IL-13 e FTC β (Fator Transformador de Crescimento β) (Oliveira et al., 2011).

Interleucinas são moléculas proteicas, que atuam na transmissão de sinais e estímulos capazes de modular os mecanismos da inflamação. A Interleucina 1 (IL-1) foi

originalmente descrita como pirógeno endógeno devido à capacidade de induzir febre durante as infecções. A IL-1 é responsável por uma parte significativa do efeito imunostimulador em tecidos, tais como a pele e articulações, induzindo-os de forma sistêmica nas primeiras horas após o trauma ou infecção, atuando principalmente na proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos e histiócitos (Gonzaga et al., 2013). A IL-1 atua no mecanismo inflamatório, estimulando a adesão de leucócitos nas células endoteliais, aumentando a atividade de coagulação, estando diretamente ligada à gênese da Coagulação Intravascular Disseminada (CID) (Pires et al., 2017).

Macrófagos são leucócitos que fazem parte do sistema imune inato. Originando-se de uma única célula-tronco precursora pluripotente, diferenciam-se em eritrócitos, plaquetas e demais células brancas presentes no sangue. Um dos tipos de células que é formado por meio da maturação e diferenciação da célula tronco no sangue é o monócito, que corresponde a 5 a 10% das células brancas circulantes, permanecendo na corrente sanguínea por cerca de 24 horas, migrando após, para os tecidos. Ao migrarem para os tecidos, os monócitos amadurecem e se transformam em macrófagos, que passam a possuir formas especializadas e nomes distintos de acordo com o tecido onde se encontram, sendo chamadas de células da micróglia no cérebro, células mesangiais nos rins, osteoclastos nos ossos, células de Kupffer no fígado e macrófagos alveolares no pulmão (Agero, 2003).

O HAM 56 (Human Alveolar Macrophage 56) é um marcador específico de macrófagos, um anticorpo monoclonal contra macrófagos alveolares humano, que foi desenvolvido especificamente para placas ateroscleróticas (Brito, 2005).

A Caveolina - I (CAV - I) é uma proteína que atua na regulação e modulação da sinalização intracelular sendo o principal componente na formação das cavéolas, as quais são invaginações da membrana lipídica citoplasmática responsáveis pela endocitose celular. Além disso, tem participação na progressão tumoral, na transdução de sinal, na regulação do transporte vesicular e na homeostase do colesterol. A interação da CAV - I ocorre através do Caveolin Scaffolding Domain (CSD), que é essencial para a ligação da proteína com outras moléculas e pode inibir as proteínas associadas. Recentemente, tem sido mostrado que CAV - I pode modular a resposta inflamatória em diversos aspectos, dentre eles, a expressão de Cox - 2, de IL - 1, IL - 6, e IL - 12 e na compensatória mitocondrial, diante das respostas de estresse oxidativo induzida pelo aumento do colesterol (Chen et al., 2014; Chen et al., 2016).

Pazzini et al. (2017), realizaram um estudo histoquímico das colorações Hematoxilina & Eosina e Tricrômico de Masson para avaliação da proliferação

vascular em coelhos, utilizando os anticorpos CD31 e CD34 e a Caveolina - I para avaliação imunoistoquímica. Neste estudo, a comparação imunoistoquímica da Caveolina - I, CD31 e CD34 como marcadores de angiogênese em coelhos evidenciaram que ambos os anticorpos são capazes de imunomarcas os vasos neoformados, porém, a Caveolina - I apresentou melhor imunomarcasção de vasos de pequeno e médio calibre, e embora não seja um marcador específico para angiogênese, pode ser utilizada como marcador imuno-histoquímico de endotélio vascular em coelhos.

O colágeno é a maior classe de proteína fibrosa insolúvel encontrada na matriz extracelular e nos tecidos conectivos. É uma família de proteínas relacionadas, geneticamente diferentes, cuja principal função é estrutural (Vargas e Carrascosa, 1997).

Em relação ao processo de reparação e cicatrização tecidual, o colágeno é um importante componente estrutural que está presente em todas as fases deste processo. A depender de sua caracterização bioquímica, quantidade e padrão organizacional, irá ser determinado a resistência da cicatriz fibrosa final (Lima et al., 2002).

Estão classificados pelo menos 18 tipos de colágenos e suas subunidades, que são as cadeias alfa, codificadas por genes diferentes. Os colágenos tipo I, II e III são os mais abundantes do organismo. O tipo I é o mais abundante e pode ser encontrado na pele, tendões, ligamentos e ossos; o tipo II, em cartilagem e humor vítreo; e o tipo III, em pele e músculos. Cada molécula de colágeno é um bastão pequeno e rígido formado pelo entrelaçamento em tríplice hélice de três cadeias polipeptídicas, as cadeias alfa. Essa estrutura proteica justifica as propriedades físicas e biológicas dos colágenos: rigidez, solidez e estabilidade (Vargas, Audí e Carrascosa, 1997; Prestes et al., 2013).

O colágeno tipo II é um dos principais componentes presentes na Matriz Extracelular (MEC) da cartilagem hialina, assim como o glicosaminoglicano (Whitney et al., 2018). Além disso, as fibras colágenas atuam diretamente na sustentação do parênquima e acabam por sofrer diversas agressões mediante processos inflamatórios intensos, levando à colagenólise e conseqüente necrose tecidual extensa. Em tecidos com presença de parênquima cartilaginosa, a perda de colágeno tipo II pode ser importante indicador para injúrias inflamatórias, comprometendo a sustentação do tecido cartilaginoso e dos vasos sanguíneos que auxiliam na irrigação tecidual. Além disso, o acúmulo de proteína de colágeno tipo II, sem um aumento concomitante de colágenos tipo I, pode indicar maior atividade na condrogênese da cartilagem articular hialina (Kim et al., 2017).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Objetivou-se, com o presente trabalho, a comparação entre as avaliações histoquímicas das amostras utilizadas na pesquisa inicial intitulada “Biocompatibilidade de implante de copoliamida associada à elastômero termoplástico (PCTPE) customizado por impressora tridimensional em anastomose traqueal de coelho (*Oryctolagus cuniculus*)”, de autoria de Yamashiro (2019), com novas preparações, comparando os achados histológicos da pesquisa inicial com os achados obtidos por meio da avaliação imunoistoquímica.

3.2. Objetivos Específicos

Quantificar o grau de angiogênese, reparação tecidual e inflamação por meio dos marcadores Caveolina I, Colágeno do tipo II e do tipo III, Interleucina I e macrófago HAM 56, respectivamente.

4. REFERÊNCIAS

Agero U (2003) Microscopia de desfocalização aplicada a estudo de fagocitose por macrófagos. 73f. **Tese (Doutor em Ciências Física)**. UFMG - Minas Gerais.

Almeida Filho E (2012) Plataforma inorgânica a base de apatitas de interesse biológico visando à liberação controlada de fármacos. 121f. **Tese (Doutor em Química)**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita — Araraquara, São Paulo.

Bonzon et al. (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: 881-885.

Brito HLF (2005) Estudo imuno-histoquímico do infiltrado inflamatório em vilosidade de etiologia desconhecida, vilosidades causadas por parasitas e intervilosidade fúngica - estudo comparativo com análise qualitativa e quantitativa. 76f. **Tese (Doutor em Ciências Médicas)**. Campinas, São Paulo.

Capellozi VL (2009) Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão – Artigo de revisão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 35: 375-382.

Chen YH et al. (2014) Caveolin-1 provides palliation for adverse hepatic reactions in hypercholesterolemic rabbits. **Plos One**. 9: 24-37.

Chen YH et al. (2016) Caveolin-1 expression ameliorates nephrotic damage in a rabbit model of cholesterol Induced hypercholesterolemia. **Plos One**. 11: 1-16.

Drachler IP et al. (2015) Modelo experimental de substituição traqueal por segmento ileal reforçado com espiral de polipropileno em coelhos. Hospital de Clínicas de PortoAlegre (HCPA). **Clinical and Biomedical Research**. 35: 202-218.

Geetha MAK et al. (2008) TI based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implant: a review. **Progress in Materials Science**. 54 (3): 397-425.

Gonzaga DVB; Vieira FO (2013) Interleucina – 1: Revisão de literatura das funções biológicas dos 2 membros da família IL – 1. 18f. **Trabalhos de Pesquisa e Iniciação Científica dos cursos de Ciências Biológicas e Pedagogia** - Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Minas Gerais.

Grenzel LYS (2019) Estudo das técnicas de fabricação aditiva (impressão 3D) e da sua aplicação na construção civil. 65f. **Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Civil apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro Civil da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul**, Santa Rosa, Rio Grande do Sul.

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

Haykal S et al. (2014) Advances in tracheal reconstruction. **Plastic and Reconstructive Surgery Global Open**. 2: 1-11.

Kim WS et al. (2017) Tracheal reconstruction with a free vascularized myofascial flap: preclinical investigation in a porcine model to human clinical application. **Scientific Reports**. 7: 10022.

Lima SS et al. (2022) Análise quanti e semiquantitativa do colágeno no reparo tecidual: um estudo comparativo. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. 21: 644-649.

Miranda LHM (2009) Padronização da reação de imuno-histoquímica, utilizando soro policlonal de coelho anti *Sporothrix schenckii*, para o diagnóstico da esporotricose canina. 68f. **Dissertação (Mestre em Ciências)** Centro de Pesquisa Chagas - Rio de Janeiro.

Oliveira CMB et al. (2011) Citocinas e dor – Artigo de revisão. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. 61: 255-265.

Pazzini JM et al. (2017) Histochemical and immunohistochemical evaluation of angiogenesis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) submitted to skin grafts associated with platelet-rich plasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 37: 1519-1525.

Piatti TM, Rodrigues RAF (2005) Plásticos: características, usos, produção e impactos ambientais. 51f. Editora da Universidade Federal de Alagoas — EDUFAL. **Série: Conversando sobre Ciências em Alagoas** - Maceió.

Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM (2017) Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**. 38: 957-971.

Prestes RC et al. (2013) Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. 15: 375-382.

Silva ALBB, Silva EO (2003) Conhecendo materiais poliméricos. 84f. Universidade Federal de Mato Grosso — Instituto de Ciências Exatas e da Terra. **Departamento de Física - Grupo de Pesquisas em Novos Materiais** - Mato Grosso.

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

Vargas DM, Audí L, Carrascosa A (1997) Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo — Artigo de revisão. Serviço de Escolares e Adolescentes do Hospital Universitário Materno-Infantil Vall d'Hebron. Universidade Autônoma de Barcelona, Barcelona, Espanha. **Revista de Associação Médica Brasileira**. 43: 367-370.

Whitney AG et al. (2018) Thyroxine increases collagen type II expression and accumulation in scaffold-free tissue-engineered articular cartilage. **Tissue Engineering (Part A)** 5: 369-381.

Williams DF (2009) On the nature of biomaterials. **Biomaterials**. 30:5897–5909.

Yamashiro LM (2019) Biocompatibilidade de implante de copolíamida associada à elastômero termoplástico (PCTPE) customizado por impressora tridimensional em anastomose traqueal de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). 60f. **Dissertação (Mestre em Cirurgia Veterinária) Unesp** - Jaboticabal.

CAPÍTULO 2. Comparação histoquímica e imunoistoquímica da resposta inflamatória no processo de reparação traqueal com o uso de biopróteses em coelhos

Polyanne Ferreira e Fonseca¹, Laise Michi Yamashiro², Gabriel João Unger Carra², Josiane Morais Pazzini³, Paola Castro Moraes⁴

¹ Mestranda em Cirurgia Veterinária, UNESP, Jaboticabal/SP, Brasil

² Mestre em Cirurgia Veterinária, UNESP, Jaboticabal/SP, Brasil

³ Doutora em Cirurgia Veterinária, UNILAGO, São José do Rio Preto/SP, Brasil

⁴ Doutora em Cirurgia Veterinária, UNESP, Jaboticabal/SP, Brasil

RESUMO - Na rotina da Medicina Veterinária, o transplante traqueal é opção terapêutica para casos de estenoses traqueais por exemplo, porém, há ainda grande taxa de insucesso por conta de necrose e tecido de granulação. Diante do desafio de encontrar qual biomaterial é melhor para a implantação de próteses traqueais, objetivou-se com esta pesquisa avaliar por meio de imunoistoquímica amostras de implante de co-poliâmida em anastomose traqueal de coelho (*Oryctolagus cuniculus*), referentes aos tempos pós-operatórios de 7 dias (Grupo A; n=5), 15 dias (Grupo B; n= 5) e 30 dias (Grupo C; n= 4). Após o processamento para avaliação histológica das amostras, lâminas foram confeccionadas para análise imunoistoquímica para avaliar angiogênese, reparação tecidual e inflamação, por meio dos anticorpos Caveolina-1, Colágeno tipo II e Colágeno tipo III, macrófago HAM 56 e Interleucina I, e a avaliação destes indicadores foi realizada pela contagem de células marcadas por meio de análise semi-qualitativa. Para a análise estatística foram utilizados o teste de Shapiro-Wilk, teste de Kruskal-Wallis e Dunn, com nível de significância de $p \leq 0,05$. Na comparação entre o presente estudo e o estudo realizado por Yamashiro (2019), observou-se que as técnicas de imunoistoquímica e histoquímica se completam para avaliar os implantes traqueais. Quando comparado o processo inflamatório, as duas avaliações apresentaram resultados semelhantes nos grupos A, B e C, sendo observado grau de inflamação acentuado no grupo A, e moderado no grupo B e discreto em C. Em relação à avaliação angiogênica, a análise imunoistoquímica não foi expressiva para essa marcação, apresentando um escore discreto para todos os grupos, diferentemente da análise histoquímica em que foi melhor detectada essa variável. Quando analisados os resultados obtidos em relação à reparação tecidual, a avaliação imunoistoquímica foi mais precisa, apresentando marcação mais expressiva nos três grupos de colágeno tipo II e colágeno tipo III, quando comparado com os resultados histoquímicos em que não foi observada diferença significativa de proliferação tecidual após a implantação traqueal. Diante destes resultados, pode-se concluir que ambas as técnicas são importantes e se completam no processo de averiguação do grau de angiogênese, reparação tecidual e inflamação após implantação de próteses traqueais.

Palavras-chave: angiogênese, estudo comparativo, imunomarcção, inflamação, estudo histopatológico, reparação tecidual

1. INTRODUÇÃO

A substituição traqueal por meio da utilização de próteses equivalentes a condutos tubulares provou ser ineficaz, especialmente quando o defeito traqueal acomete mais de 50% do comprimento total do órgão, o que aumenta os desafios na sua reconstrução, como a presença de infecção, extrusão, obstrução ou rejeição crônica (Grillo, 2002).

O avanço da tecnologia possibilitou o desenvolvimento de próteses traqueais de materiais diversos, porém ainda não apresentaram resultados satisfatórios, pois apesar de já terem sido avaliados diversos materiais, o material ideal para substituição traqueal ainda não fora estabelecido (Drachler et al., 2015).

Complicações relacionadas às próteses implantadas podem ocorrer, principalmente no que se refere ao processo inflamatório exacerbado, podendo culminar na rejeição do material (Kaye et al., 2016). Portanto, faz-se necessário a análise do perfil inflamatório, de angiogênese e de reparação tecidual para avaliação da funcionalidade do implante de bioprótese traqueal.

Por meio da avaliação histoquímica ou por meio da imunoistoquímica, é possível a quantificação e qualificação do processo inflamatório, determinando assim a resposta do hospedeiro à bioprótese, assim como sua durabilidade.

Diante da importância de se encontrar um material que atenda todas as características necessárias para o sucesso da implantação da prótese traqueal, evitando que ocorra processo inflamatório com possível rejeição do implante, objetivou-se, com esta pesquisa, comparar os achados histoquímicos, verificados anteriormente por Yamashiro (2019), de reparação tecidual quando realizada a substituição traqueal por implante impresso em 3D, com os achados imunoistoquímicos do presente estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, sob o protocolo nº 007989/17.

2.2. Amostras

As amostras utilizadas neste projeto são provenientes do trabalho realizado por Yamashiro (2019), que fez a reconstrução traqueal com implante de poliamida associada a elastômero termoplástico (PCTPE) customizado em impressora 3D. Os animais foram distribuídos em três grupos (A, B e C), referentes aos tempos de eutanásia de 7, 15, e 30 dias pós-operatórios, sendo que os grupos A e B possuíam cinco animais e o grupo C quatro animais.

As amostras foram processadas conforme a rotina histológica convencional e lâminas de imunoistoquímica preparadas para avaliação da angiogênese, reparação tecidual e inflamação nos tecidos provenientes dos animais que receberam a bioprótese de traqueia. Em relação ao estudo a ser comparado, as amostras foram analisadas por meio da histoquímica, utilizando a coloração hematoxilina-eosina (HE), e posteriormente avaliados o processo cicatricial, rejeição e resposta inflamatória após a inserção do implante traqueal. O procedimento cirúrgico de reconstrução traqueal está ilustrado na Figura 1.

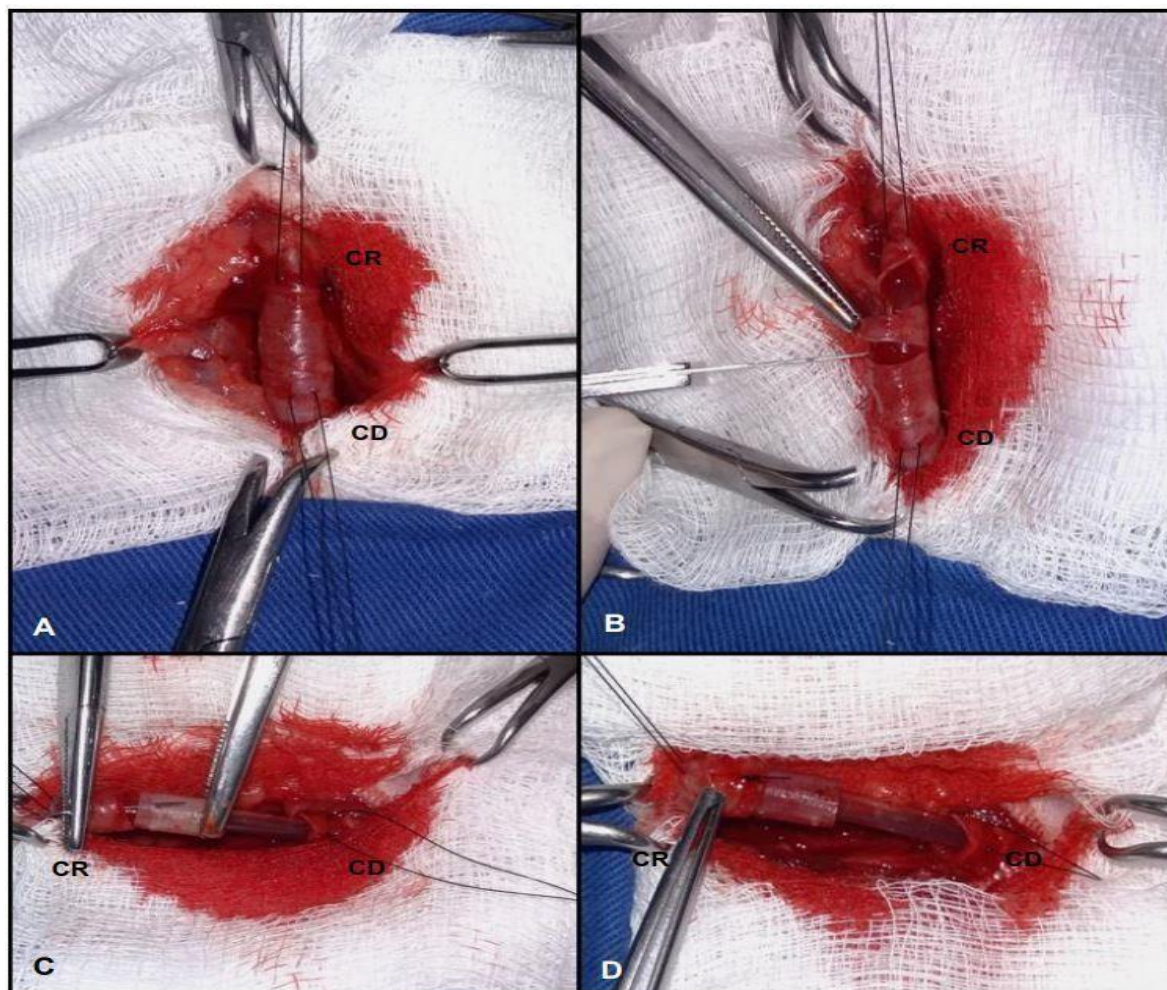


Figura 1. Sequência de imagens fotográficas de implantação da prótese traqueal confeccionada em impressora 3D, em coelhos. **(A)** Exposição e isolamento do órgão através da aplicação de fio de reparo cranial (CR) e caudal (CD) ao local da incisão; **(B)** Ressecção total em 360 graus da traqueia na 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: Yamashiro, 2019.

2.3. Avaliação Imunoistoquímica

As amostras foram processadas conforme a rotina histopatológica convencional e lâminas de imunoistoquímica preparadas para avaliação da

angiogênese, reparação tecidual e inflamação nos tecidos provenientes dos animais que receberam a bioprótese de traqueia. Em relação ao estudo a ser comparado, as amostras foram analisadas por meio da histoquímica, utilizando a coloração hematoxilina-eosina (HE), e posteriormente avaliados o processo cicatricial, rejeição e resposta inflamatória após a inserção do implante traqueal. 2.4 Avaliação Imunoistoquímica

Para a técnica, os cortes foram estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, com adesivo comercial (3-aminopropiltriétoxi-silano: Sigma Chemical C.O., Estados Unidos). Na sequência, os cortes foram mantidos em estufa a 67 °C por uma hora, e a seguir procedeu-se a desparafinização em soluções decrescentes de xilóis e álcoois. Os cortes foram processados com anticorpo específico e o sistema de detecção utilizado foi o kit de polímero NovoLink (Leica Solutions, Estados Unidos).

As avaliações realizadas mediante à expressão de cada anticorpo são apresentadas no Quadro 1. A avaliação dos indicadores foi realizada pela contagem de células marcadas (Maeda et al., 1995) por meio de avaliação semi-qualitativa, sendo expresso como: Ausente (0), Discreto (1), Moderado (2) e Acentuado (3). No Quadro 2 é descrito a técnica imunoistoquímica realizada em cada marcador.

Quadro 1. Avaliação dos indicadores mediante cada marcador.

| Marcador | Indicador/Avaliação |
|-------------------|----------------------------|
| Caveolina - I | Angiogênese |
| Interleucina - I | Inflamação |
| Macrófago HAM 56 | Inflamação |
| Colágeno tipo II | Reparação tecidual |
| Colágeno tipo III | Reparação tecidual |

Quadro 2. Descrição da técnica de imunoistoquímica realizada em cada marcador.

| Reagente | Diluição | Recuperação Antigênica | Bloqueadores | Incubação |
|-------------------------|---|---|-------------------------------|--|
| Macrófago HAM 56 | Solução Retrival: 25ml concentrado + 225 ml água deionizada. DAB > 50 µl em 1000 µl = 100 µl | Pepsina porcine gastric mucosa: Sigma Life Science United Kingdom | Proteína – 10 min. | 2 a 4h <i>overnight</i> – Estufa e Capela de fluxo |
| Interleucina I | Solução Retrival: 25ml concentrado + 225 ml água deionizada. DAB > 50 µl em 1000 µl = 100 µl | Pepsina porcine gastric mucosa: Sigma Life Science United Kingdom | Proteína – 10 min. | 2 a 4h <i>overnight</i> – Estufa e Capela de fluxo |
| Colágeno II | Solução Retrival: 25ml concentrado + 225 ml água deionizada. DAB > 50 µl em 1000 µl = 100 µl | Pepsina porcine gastric mucosa: Sigma Life Science United Kingdom | <i>Post-primary</i> – 30 min. | 2 a 4h <i>overnight</i> – Estufa e Capela de fluxo |
| Colágeno III | Solução Retrival: 25ml concentrado + 225 ml água deionizada. DAB > 50 µl em 1000 µl = 100 µl | Pepsina porcine gastric mucosa: Sigma Life Science United Kingdom | Polímero NovoLink – 30 min. | 2 a 4h <i>overnight</i> – Estufa e Capela de fluxo |
| Caveolina I | Solução Retrival: 25ml concentrado + 225 ml água deionizada. DAB > 50 µl em 1000 µl = 100 µl | Pepsina porcine gastric mucosa: Sigma Life Science United Kingdom | Peroxidase – 10 min. | 2 a 4h <i>overnight</i> – Estufa e Capela de fluxo |

2.4. Delineamento Estatístico

Os resultados obtidos de quantificação dos marcadores específicos relacionados ao grau de inflamação, angiogênese e reparação tecidual foram confirmados por meio dos achados microscópicos utilizando análises histoquímicas e imunoistoquímicas, e comprovados estatisticamente. Por meio do teste de Shapiro-Wilk, foram analisadas que as distribuições das variáveis seguem uma distribuição

não-paramétrica, portanto para realizar as análises comparativas dessas amostras foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Dunn, ao nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$). Para estas análises foi utilizado o software R 4.2.2 (Innocent and Trusting).

3. RESULTADOS

Na análise estatística semi-qualitativa, em relação ao grau de inflamação, foi observada variância estatística na expressão de Interleucina I, quando comparados os grupos B e C, que representam os tempos de 15 e 30 dias ($p \leq 0,05$). O grupo B apresentou 80% dos animais com moderada expressão de Interleucina I e 20% com acentuada expressão, enquanto que no grupo C observou-se 25% de expressão moderada e 50% de expressão acentuada de Interleucina I. Ademais, fora observada tendência de correlação inversa moderada ($\tau = -0,42$), ainda que não significativa ($p = 0,09$), entre o grau de inflamação e a contagem de macrófagos. Na Figura 2 pode-se observar a imunomarcção de Interleucina I na avaliação semi-qualitativa. Em relação à reatividade para o anticorpo Interleucina I, todos os grupos apresentaram esta característica, sendo observada discreta imunomarcção no grupo A, variando de discreta a moderada no grupo C e tendo acentuada imunomarcção no grupo B.

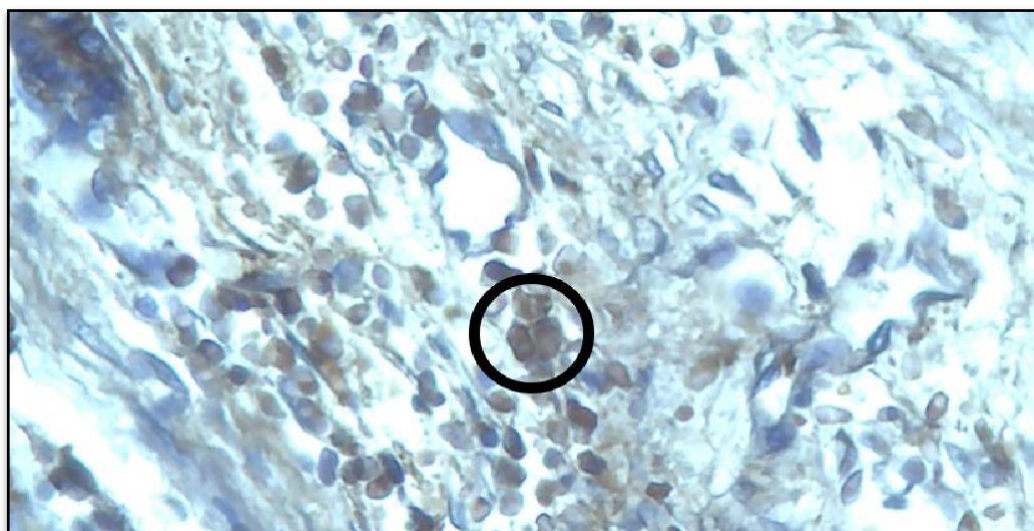


Figura 2. Imunomarcção de Interleucina I na avaliação semi-qualitativa, após 15 dias de implante em traqueia de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). Aumento de 40x. (Laboratório de Imunoistoquímica: FCAV-UNESP, Jaboticabal, 2022).

No que se refere ao grau de reparação tecidual, a análise estatística semi-qualitativa evidenciou correlação inversa moderada ($\tau = -0,48$) ($p \leq 0,05$) entre o índice de proliferação intraluminal de células e a expressão de colágeno tipo II. Na Figura 7, que apresenta os resultados da análise estatística da avaliação histoquímica do estudo de Yamashiro (2019), pode-se observar que a proliferação intraluminal é discreta apenas no grupo A, em que apenas 40% dos animais apresentam esta característica, e ausente nos outros dois grupos, B e C. Em contrapartida, na avaliação imunoistoquímica, notou-se que a expressão de colágenos tipo II tem graduação discreta em 60% dos animais do grupo A e de 20% dos animais no grupo B. Em relação à imunomarcação do colágeno tipo II, o grupo A apresenta uma graduação moderada em 40% dos animais, o grupo B 40% e o grupo C em 75% dos animais. A graduação acentuada da expressão de colágeno tipo II foi maior apenas no grupo B, em que apenas 40% dos animais apresentaram esta característica. Foi observada também tendência de correlação moderada ($\tau = 0,41$), ainda que não significativa ($p = 0,09$) entre o índice de proliferação extra luminal de células e a expressão de colágeno tipo II. Em relação à análise estatística do índice de expressão do colágeno tipo III, não foi observada diferença estatística.

A correlação entre a imunomarcação de macrófagos apresentou-se como moderada nos grupos A e B e discreta no grupo C, como apresentado na Tabela 1. Na Figura 3 é possível observar a imunomarcação de macrófago HAM 56 na avaliação semi-qualitativa.

A imunomarcação para Caveolina I foi discretamente observada em todos os grupos avaliados, como demonstrado na Figura 4.

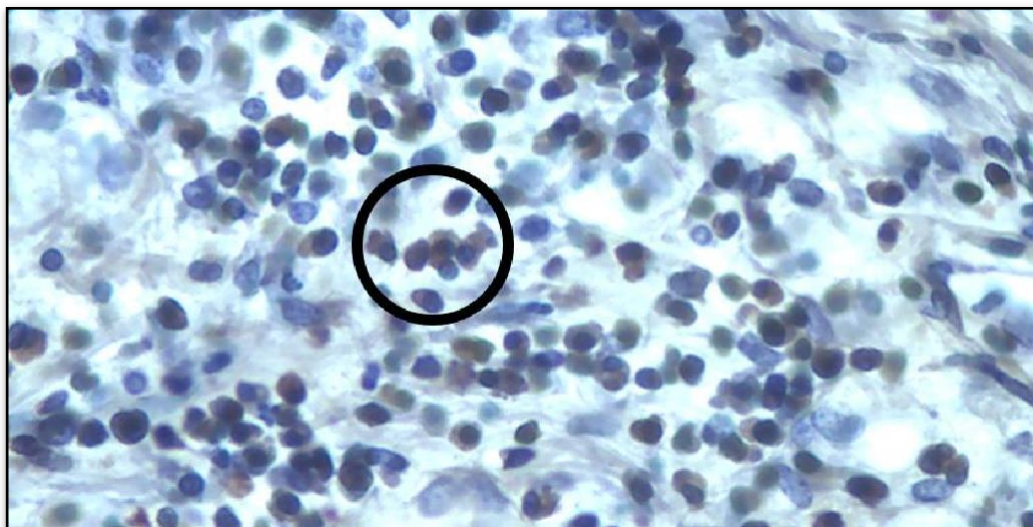


Figura 3. Imunomarcção de Macrófago HAM 56 na avaliação semi-qualitativa, após 15 dias de implante em traqueia de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) Aumento de 40x. (Laboratório de Imunoistoquímica: FCAV-UNESP, Jaboticabal, 2022).



Figura 4. Imunomarcção de Caveolina I na avaliação semi-qualitativa, após 15 dias de implante em traqueia de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). Aumento de 40x. (Laboratório de Imunoistoquímica: FCAV-UNESP, Jaboticabal, 2022).

Semelhante aos demais anticorpos, a imunomarcção para colágeno tipo II e colágeno tipo III também foi presente em todos os grupos. A reação para colágeno II

foi considerada discreta no grupo A, moderada no grupo C e acentuada no grupo B. A imunomarcaco para colágeno tipo III foi considerada como discreta nos grupos A, B e C.

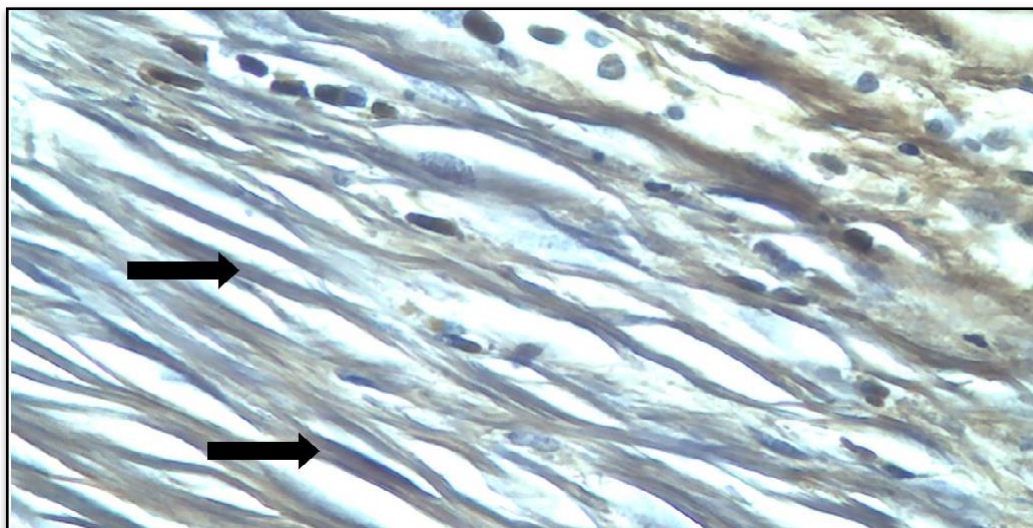


Figura 5. Imunomarcaco do Colágeno II na avaliao semi-qualitativa, após 30 dias de implante em traqueia de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). Aumento de 40x. (Laboratório de Imunoistoquímica: (FCAV-UNESP, Jaboticabal, 2022).

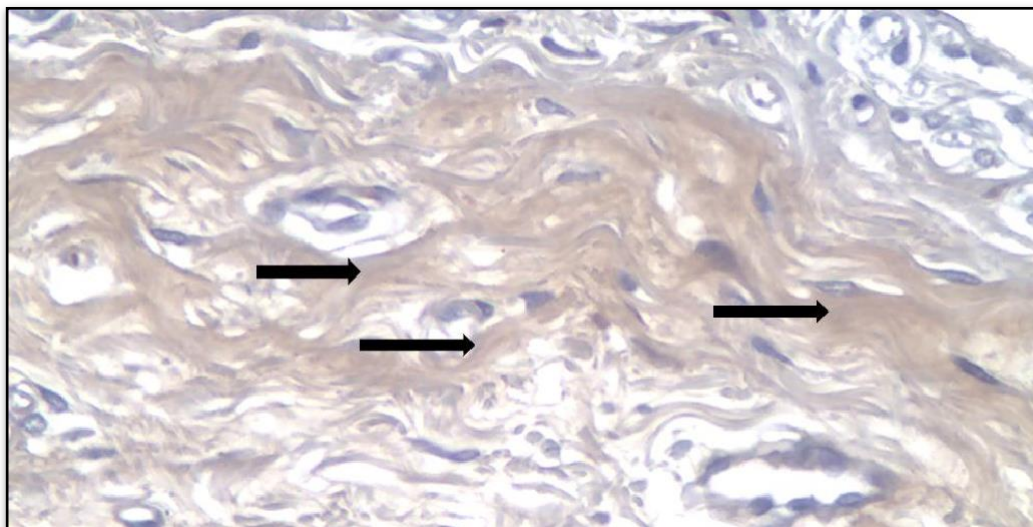


Figura 6. Imunomarcção do Colágeno III na avaliação semi-qualitativa, após 30 dias de implante em traqueia de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). Aumento de 40x. (Laboratório de Imunoistoquímica: FCAV-UNESP, Jaboticabal, 2022).

Todas as avaliações das imunomarcações estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Dados do estudo da avaliação de imunoistoquímica de amostras microscópicas referente ao processo de biocompatibilidade das próteses traqueais em coelhos dos grupos de 7, 15 e 30 dias.

| CRITÉRIOS | GRADUAÇÃO | 7 dias | 15 dias | 30 dias |
|-----------------------------------|-----------------|---------|---------|---------|
| | | n (%) | n (%) | n (%) |
| EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO II | Discreto (+) | 3 (60%) | 1 (20%) | - |
| | Moderado (++) | 2 (40%) | 2 (40%) | 3 (75%) |
| | Acentuado (+++) | - | 2 (40%) | 1 (25%) |
| EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO III | Discreto (+) | 3 (60%) | 2 (40%) | 1 (25%) |
| | Moderado (++) | 2 (40%) | 3 (60%) | 2 (50%) |
| | Acentuado (+++) | - | - | 1 (25%) |
| EXPRESSÃO DE MACRÓFAGO HAM 56 | Discreto (+) | 1 (20%) | 1 (20%) | 1 (25%) |
| | Moderado (++) | 4 (80%) | 2 (40%) | 2 (50%) |
| | Acentuado (+++) | - | 2 (40%) | 1 (25%) |
| EXPRESSÃO DE CAVEOLINA | Discreto (+) | 3 (60%) | 3 (60%) | 2 (50%) |
| | Moderado (++) | 2 (40%) | 1 (20%) | 2 (50%) |
| | Acentuado (+++) | - | 1 (20%) | - |
| EXPRESSÃO DE INTERLEUCINA | Discreto (+) | 1 (20%) | - | 1 (25%) |
| | Moderado (++) | 4 (80%) | 4 (80%) | 1 (25%) |
| | Acentuado (+++) | - | 1 (20%) | 2 (50%) |

Tabela 2. Estudo estatístico da avaliação histoquímica de amostras microscópicas referente ao processo de biocompatibilidade das próteses traqueais em coelhos dos grupos de sete, 15 e 30 dias (Adaptado de Yamashiro, 2009).

| CRITÉRIOS | GRADUAÇÃO | 7 dias | 15 dias | 30 dias |
|---|-----------------|----------|----------|----------|
| | | n (%) | n (%) | n (%) |
| GRAU DE INFLAMAÇÃO | Ausente (-) | - | - | - |
| | Discreto (+) | - | - | 1 (20%) |
| | Moderado (++) | - | 1 (20%) | 3 (60%) |
| | Acentuado (+++) | 5 (100%) | 4 (80%) | 1 (20%) |
| INFILTRADO POLIMORFONUCLEAR | Ausente (-) | - | - | - |
| | Discreto (+) | - | - | 1 (20%) |
| | Moderado (++) | - | 1 (20%) | 3 (60%) |
| | Acentuado (+++) | 5 (100%) | 4 (80%) | 1 (20%) |
| INFILTRADO MONONUCLEAR | Ausente (-) | - | - | - |
| | Discreto (+) | - | - | - |
| | Moderado (++) | - | 1 (20%) | 4 (80%) |
| | Acentuado (+++) | 5 (100%) | 4 (80%) | 1 (20%) |
| INFILTRADO DE CÉLULAS GIGANTES | Ausente (-) | 3 (60%) | 5 (100%) | 5 (100%) |
| | Discreto (+) | 2 (40%) | - | - |
| | Moderado (++) | - | - | - |
| | Acentuado (+++) | - | - | - |
| CONGESTÃO VASCULAR TRAQUEAL | Ausente (-) | - | - | - |
| | Discreto (+) | 1 (20%) | 1 (20%) | - |
| | Moderado (++) | 1 (20%) | 1 (20%) | 2 (40%) |
| | Acentuado (+++) | 3 (60%) | 3 (60%) | 3 (60%) |
| EDEMA CELULAR OU INTESTICIAL TRAQUEAL | Ausente (-) | - | - | - |
| | Discreto (+) | 1 (20%) | 1 (20%) | - |
| | Moderado (++) | 1 (20%) | 1 (20%) | 2 (40%) |
| | Acentuado (+++) | 3 (60%) | 3 (60%) | 3 (60%) |
| HEMORRAGIA TRAQUEAL | Ausente (-) | 4 (80%) | 2 (40%) | 4 (80%) |
| | Discreto (+) | 1 (20%) | 1 (20%) | - |
| | Moderado (++) | - | 2 (40%) | 1 (20%) |
| | Acentuado (+++) | - | - | - |
| FIBROSE EM REGIÃO TRAQUEAL | Ausente (-) | 5 (100%) | 5 (100%) | 5 (100%) |
| | Discreto (+) | - | - | - |
| | Moderado (++) | - | - | - |
| | Acentuado (+++) | - | - | - |
| FIBROSE EM REGIÃO DE PRÓTESE E ANASTOMOSE | Ausente (-) | 5 (100%) | 1 (20%) | - |
| | Discreto (+) | - | 1 (20%) | 1 (20%) |
| | Moderado (++) | - | 2 (40%) | 2 (40%) |
| | Acentuado (+++) | - | 1 (20%) | 2 (40%) |
| ESTENOSE INTRALUMINAL | Ausente (-) | 5 (100%) | 5 (100%) | 5 (100%) |
| | Discreto (+) | - | - | - |
| | Moderado (++) | - | - | - |
| | Acentuado (+++) | - | - | - |
| PROLIFERAÇÃO TECIDUAL TRAQUEAL (EXTERNA) | Ausente (-) | 5 (100%) | - | - |
| | Discreto (+) | - | - | - |
| | Moderado (++) | - | 5 (100%) | - |
| | Acentuado (+++) | - | - | 5 (100%) |
| PROLIFERAÇÃO TECIDUAL TRAQUEAL (INTERNA) | Ausente (-) | 3 (60%) | 5 (100%) | 5 (100%) |
| | Discreto (+) | 2 (40%) | - | - |
| | Moderado (++) | - | - | - |
| | Acentuado (+++) | - | - | - |

4. DISCUSSÃO

O avanço da tecnologia possibilitou o desenvolvimento de próteses traqueais de materiais diversos, porém, mesmo avaliando vários tecidos e materiais sintéticos, o substituto traqueal ideal ainda não fora estabelecido. (Darchler et al., 2015; Silva, 2017). Conforme avaliado no estudo realizado por Yamashiro, (2019), é possível inferir, por meio de avaliação histoquímica, que a prótese traqueal biomimética que fora desenvolvida por meio da tecnologia de impressão 3D pode ser facilmente fabricada, oferece boa característica estrutural e ótima função anatômica e integração biológica, demonstrando ser excelente suporte por ter proporcionado fluxo adequado de ar pelo conduto traqueal, além de ter havido falhas na área de enxertia. Porém, é importante ressaltar que a ressecção de anéis traqueais não é isenta de riscos, pois o estudo fora baseado em segmentos curtos da traqueia com acometimento de 0,5 cm, portanto, a realização de transplantes com acometimento de 30% a 50% do comprimento total da traqueia ainda é opção futura para avaliação do comportamento celular (Yamashiro, 2019).

Os resultados estatísticos observados no presente estudo foram satisfatórios em relação à implantação da prótese traqueal em coelhos, e foram correlacionados com o trabalho inicial de Yamashiro (2019), que avaliou os achados por meio de análises histoquímicas.

No estudo de Yamashiro (2019), fora possível observar variação significativa nos achados histológicos em relação à análise do grau de inflamação, em que o grupo A demonstrou inflamação acentuada em 100% dos animais, o grupo B apresentou 20% dos animais com inflamação moderada e 80% com inflamação acentuada e o grupo C com 20% dos animais apresentando inflamação discreta, 60% dos animais com inflamação moderada e 20% com inflamação acentuada. Neste estudo, os achados imunoistoquímicos foram semelhantes, sendo que no grupo A o grau de inflamação foi caracterizado como moderado, em que 80% dos animais apresentaram marcação para macrófagos HAM 56 e Interleucina I, células pertencentes ao processo inflamatório, no grupo B notou-se que 40% dos animais apresentaram moderada expressão para macrófagos e 80% para Interleucina I, e no grupo C a expressão ficou dividida em 25% com graduação discreta, 25% moderada e 50% com graduação acentuada para Interleucinas I. Tanto nos resultados obtidos no estudo de Yamashiro (2019) quanto no presente estudo pode-se observar que nos primeiros dias após a

colocação da bioprótese, há uma acentuada presença de células inflamatórias, que corroboram com a primeira fase do processo de cicatrização, onde ocorre num primeiro momento a migração de neutrófilos e monócitos que se transformam em macrófagos. Estes macrófagos regulam substâncias que sinalizam o recrutamento de células importantes para fagocitarem debris celulares e bactérias, para que ocorra a degradação da matriz extracelular provisória e facilite a migração de células para a segunda fase da cicatrização, a fase proliferativa. (Souza e Mann, 2011).

Estudo realizado por Alves (2015) com biomateriais implantados em região maxilar de coelhos, verificou que nos primeiros dias a resposta tecidual apresentava reação de granulação, com presença de inflamação crônica, infiltrado rico em macrófagos e células gigantes multinucleadas, semelhante aos achados neste estudo, demonstrando que a presença destas células se deve à tentativa do organismo de reabsorver o material implantado, e não necessariamente a falta de biocompatibilidade. Sendo assim, os resultados referentes à resposta inflamatória, dos dois tipos de análise, histoquímica e imunoistoquímica foram importantes para delimitar o grau de inflamação após a colocação da bioprótese traqueal, não apresentando diferenças significativas entre si. Porém, no que se refere a uma análise mais específica sobre quais células inflamatórias estão presentes no processo inflamatório, a avaliação imunoistoquímica consegue delimitar melhor tais células, fornecendo dados quantitativos importantes, sendo uma técnica complementar considerada importante nos dias de hoje nos laboratórios de patologia cirúrgica (Taylor e Levenson, 2006; Werner et al., 2005). Em avaliação imunoistoquímica, com utilização do imunomarcador Caveolina-1, para quantificar os mecanismos envolvidos no processo de angiogênese, em todos os grupos foram observados graduação discreta. Em contrapartida, na avaliação histoquímica realizada no estudo de Yamashiro (2019), o grau de prevalência dos mecanismos envolvendo angiogênese aumentaram gradativamente entre os grupos de A à C, conforme o decorrer dos dias após implantação da bioprótese traqueal. O grupo A não apresentou esta característica, porém no grupo B houve ocorrência moderada em 100% dos animais e no grupo C foi observado ocorrência acentuada de 100% dos animais. Os achados imunoistoquímicos deste estudo são contrários ao de Pazzini et al. (2017), que obtiveram resultado satisfatório com o emprego de Caveolina-1 para contagem de microvasos em enxertos de pele em coelhos. Serafim e colaboradores (2016) também relataram bons resultados na quantificação angiogênica de cirurgia reconstrutiva em coelhos. Abbas et al., (2013) afirmam que a Caveolina-1 não é um anticorpo específico

para angiogênese, e sim para identificar membrana citoplasmática e endotélio, corroborando com o presente estudo.

Em relação aos mecanismos envolvidos no processo de reparação tecidual, o grupo A na avaliação deste estudo, apresentou graduação discreta e moderada na imunomarcagem de colágeno tipo I e colágeno tipo II. No grupo B observou-se marcação discreta e moderada destas variáveis e no grupo C a marcação ficou mais evidente na graduação moderada e acentuada. Estes resultados corroboram com as fases de proliferação celular e maturação do processo cicatricial, em que há substituição de fibrina por colágeno, sendo o ápice entre duas e três semanas após a lesão (Hosgood, 2017), como apresentados nos grupos B (15 dias após o procedimento) e C (30 dias após o procedimento). Tazima e colaboradores (2008) afirmam que na fase de maturação, que tem duração entre seis a oito semanas após a lesão, as fibras colágenas encontram-se em equilíbrio devido à ação da colagenase, confirmando os resultados identificados no presente estudo. Bini et al. (2021) realizaram um estudo de avaliação termográfica de implante de co-poliâmida associado a elastômero termoplástico em traqueia de coelhos, e observaram que os animais avaliados com 30 dias de implante não apresentaram nenhum grau de inflamação e encontravam-se na fase de maturação. Assim como o grupo C (30 dias após o implante traqueal) deste experimento, o qual apresentou grau acentuado de marcação para colágeno e grau discreto e moderado de inflamação. Em contrapartida, na avaliação histoquímica, observou-se ausência de 100% de proliferação de tecido extraluminal no grupo A, 100% de graduação moderada para o grupo B e 100% de graduação acentuada para o grupo C. E, quando analisada a graduação da proliferação de tecido intraluminal, os resultados obtidos foram: grupo A apresentando 60% dos animais com ausência desta variável versus 40% dos animais com discreta apresentação e grupo B e C com 100% de ausência da mesma. Diante da comparação entre as duas técnicas, pode-se verificar que a técnica de imunoistoquímica proporcionou melhor análise da deposição de colágeno tipo II no processo de reparação tecidual.

Ao analisar todos os resultados obtidos tanto no presente estudo como no estudo que foi utilizado para comparação de Yamashiro (2019), pode-se inferir que as duas técnicas se complementaram, por avaliarem marcadores ligeiramente diferentes, porém estes estão relacionados à inflamação, angiogênese e reparação tecidual após implantação de bioprótese traqueal.

5. CONCLUSÃO

Diante das avaliações realizadas neste estudo e as comparações feitas com o estudo de Yamashiro (2019), é possível concluir que tanto a imunoistoquímica quanto a histoquímica se mostraram técnicas eficazes para a avaliação do grau de inflamação, angiogênese e reparação tecidual após implantação de bioprótese traqueal, por possuírem resultados finais consideravelmente semelhantes, além de condizerem com as alterações em exame físico relatadas por Yamashiro, (2019) e por corroborar com a literatura consultada.

6. REFERÊNCIAS

Abbas AK, Kumar V, Fausto N, Aster J (2013) **Robbins & Cotran Patologia, Bases Patológicas das Doenças: inflamação e reparo**. 29-74.

Alves ANN (2015) Avaliação histoquímica e imunohistoquímica do reparo ósseo após implantação de microesferas de hidroxapatita carbonatada nanoestruturada contendo 5% de estrôncio. 51f. **Tese (Doutorado em Odontologia)**, Universidade Federal Fluminense — Rio de Janeiro.

Bini IFB, Yamashiro LM, Ido CK, Ribeiro JO, Montanhim GL, Pazzini JM, Sá Rocha TAS, Dias LGGG, Moraes PC (2021) Avaliação por câmera termográfica de implante de co-poliâmida associado a elastômero termoplástico em traqueia de coelho. **Veterinária e Zootecnia** 28: 01 — 11.

Drachler IP et al. (2015) Modelo experimental de substituição traqueal por segmento ileal reforçado com espiral de polipropileno em coelhos. **Clinical and Biomedical Research** 35: 4227.

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

Hosgood G (2017) The biology of wound healing. In: Willians J, Moores A **BSAVA Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction**, England, 1-16.

Kaye et al. (2016) Three dimensional printing: A review on the utility within medicine and otolaryngology. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**. 89:145-148.

Maeda et al. (1995) Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**.13: 477-481.

Pazzini JM et al. (2017) Histochemical and immunohistochemical evaluation of angiogenesis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) submitted to skin grafts associated with platelet-rich plasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 37: 1519-1525.

Schneider A, Rosito T, Von Diemen V (2000) Estudo de viabilidade de aloenxerto de traqueia em ratos: o papel da omentoplastia na vigência de imunossupressão. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. 27:189-192.

Serafim EL (2016) Fechamento de defeitos em padrão de figura geométrica associado ao emprego de anestesia por tumescência com lidocaína em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). 68f. **Dissertação (Mestre em Cirurgia Veterinária)**, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Jaboticabal.

Silva SJQ (2017) Nova prótese em nitinol extra luminal de traqueia. 56f. **Dissertação (Mestre em Ciência Animal)**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro — Rio de Janeiro.

Souza CHM, Mann FA (2011) Basic wound healing and wound closure. In: Mann FA, Constantinescu GM, Yoon HY **Fundamentals of small animal surgery**. India,176-186.

Takano GHS (2021) Painel inicial de marcadores imunocitoquímicos para identificação de sítios primários de carcinomas em efusões e lavados peritoneais em mulheres. 110f. **Tese (Doutor em Ciências Médicas)** Universidade de Brasília — Brasília.

Tazima MFGS, Vicente YAMVA, Moriya T (2008). Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina de Ribeirão Preto** 41:259-64.

Taylor CL, Levenson RM (2006) Quantification of immunohistochemistry - issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. **Histopathology**. Oxford 49: 411-424.

Yamashiro LM (2019) Biocompatibilidade de implante de co-poliâmida associada à

elastômero termoplástico (PCTPE) customizado por impressora tridimensional em anastomose traqueal de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). 60f. **Dissertação (Mestre em Cirurgia Veterinária)** Universidade Estadual Paulista Filho - Jaboticabal.

Werner B, Campos AC, Nadji M, Torres, LFB (2005) Uso prático da imunohistoquímica na patologia cirúrgica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 41: 353-364.