

Creación exitosa de Neoesófago mediante Ingeniería de Tejidos en un Modelo Animal

Diego Ricardo Esquiliano-Rendon, Atlantida Raya-Rivera,
Alberto Parra-Barrera, Jaime Nieto-Zermeño, Ricardo Ordorica-Flores,
Gerardo Blanco-Rodriguez, Pedro Valencia-Mayoral,
Jaime Penchyna-Grub, Eduardo Bracho-Blanchet

Universidad Nacional Autonoma de México
Hospital Infantil de México “Federico Gómez”
Calle: Dr.Márquez No. 162, Col. Doctores, Delegación: Cuauhtémoc,
C.P. 06720, México, D.F.

Solicitud de sobretiros: Dr.Diego Ricardo Esquiliano-Rendon.
Hospital Infantil de México “Federico Gómez”
Calle: Dr.Márquez No. 162, Col. Doctores, Delegación: Cuauhtémoc,
C.P. 06720, México, D.F.

Resumen

Introducción: Cada año se reportan alrededor de 5,000 a 10,000 pacientes con enfermedad congénita o adquirida del esófago que requieren tratamiento quirúrgico, a diferencia del resto del tracto gastrointestinal no es posible la utilización de tejido autólogo para su reconstrucción debido a su limitada longitud así como su delicada vascularidad, por lo que se emplean complejos procedimientos como la interposición de colon, Un campo que ha venido creciendo y que podría aportar una solución a estos problemas es la ingeniería de tejidos. El propósito del presente trabajo consiste en la construcción de una prótesis de esófago a partir de células autólogas implantadas sobre una matriz de colágena y probar su utilidad en un modelo animal.

Material y Método: Se tomó una biopsia de tejido esofágico sano a nivel de cuello de conejos sanos, la cuál se procesó para disgregar sus componentes celulares en epitelio y músculo, se verificó la viabilidad celular por el método de MTT y su presencia por microscopía electrónica de barrido. La prótesis fue implantada en una segunda cirugía creando un defecto en “parche” en el esófago nativo, realizándose posteriormente estudios de endoscopia, esofagograma y necropsia en los animales.

Resultados: Posterior a la toma de biopsia las células epiteliales y musculares fueron aisladas y sembradas y multiplicadas en cajas de petri cosechadas y sembradas en una concentración de 1×10^7 cel/cm² en las prótesis de submucosa intestinal. Posteriormente las prótesis fueron implantadas en cuatro conejos sanos N=5, todos los conejos fueron sometidos posteriormente a estudios de esofagograma y endoscopia, observándose adecuada integración del ahora llamado neoesófago, con adecuado paso del medio de contraste no se observaron fugas ni estenosis, todos los animales permanecieron vivos, alimentándose por vía oral sin complicaciones hasta el momento de ser sacrificados excepto uno el cual murió por causas ajenas al estudio. En los estudios histopatológicos, se observa una arquitectura casi normal del neoesófago con presencia de capa mucosa y muscular adecuada.



Conclusión: En el presente estudio pudimos establecer las condiciones, generales para el aislamiento, caracterización y multiplicación de células epiteliales y musculares de tejido esofágico sano, asimismo se creó una prótesis esofágica, la cual pudo implantarse en animales a los cuales se creó un defecto del 50% de la luz del mismo con una adecuada integración del ahora llamado neoesófago. Todos los animales permanecieron vivos alimentándose por vía oral sin complicaciones, lo cual sienta las bases para elaborar una prótesis total de esófago la cual en un futuro pueda ser utilizada en el tratamiento de niños con lesiones esofágicas congénitas o adquiridas.

Palabras Clave: Enfermedad congénita o adquirida del esófago; Ingeniería de tejidos; Neoesófago.

Creating successful Neoesófago by Tissue Engineering in an Animal Model

Abstract

Introduction: Every year about 5,000 are reported and 10,000 patients with congenital or acquired esophageal requiring surgical treatment, unlike the rest of the gastrointestinal tract is not possible to use autologous tissue for reconstruction because of its limited size and its delicate vascularity, which are used by complex procedures such as colon interposition, a field that has been growing and could provide a solution to these problems is tissue engineering. The purpose of this work involves the construction of a esophageal prosthesis from autologous cells implanted on a collagen matrix and test its usefulness in an animal model.

Material and Methods: We took a biopsy of healthy esophageal tissue at the neck of healthy rabbits, which were processed to segregate its cellular components in epithelial and muscle cell viability was verified by MTT method and their presence by electron microscopy scanning. The prosthesis was implanted in a second surgery to create a defect in "patch" in the native esophagus, further studies of endoscopy, esophagogram and necropsy in animals.

Results: After the biopsy epithelial and muscle cells were isolated and multiplied sown and harvested in Petri dishes and seeded at a concentration of 1×10^7 cel/cm² in intestinal submucosa prostheses. Subsequently, the prostheses were implanted in four healthy rabbits N = 5, all rabbits subsequently underwent esophagogram and endoscopy studies, observing proper integration of the now called neoesófago, with adequate passage of contrast medium showed no leakage or stenosis, all animals remained alive, feeding by mouth without complications so far from being slaughtered except one who died for reasons unconnected with the study. In histopathological studies, there is an almost normal architecture neoesófago presence of mucosa and muscle layer proper.

Conclusion: In this study we establish the conditions, general characterization for the isolation and multiplication of epithelial cells and muscle tissue healthy esophageal also created an esophageal prosthesis, which could be implanted in animals to which a defect was created 50 % of the light of it with proper integration of the now called neoesófago. All animals remained alive feeding by mouth without complications, which lays the basis for developing an esophageal prosthesis in the future which can be used in the treatment of children with congenital or acquired esophageal lesions.

Index words: Congenital or acquired disease of the esophagus; Tissue engineering; Neoesófago.

Introducción

Las enfermedades congénitas o adquiridas del esófago que requieren tratamiento quirúrgico generalmente están asociadas a una alta morbilidad y a una amplia variedad de complicaciones posquirúrgicas.¹

A diferencia del resto del tracto gastrointestinal en el caso del esófago no es posible la utilización de tejido autólogo para su reconstrucción debido a su limitada longitud así como su delicada vascularidad.²

En enfermedades congénitas severas como las atresias esofágicas especialmente la denominada tipo A en donde la distancia entre los cabos esofágicos es muy amplia se emplean complejos procedimientos como el ascenso gástrico³ interposición de intestino delgado⁴ o grueso,⁵ haloinjertos con pedículo vascular etc. sin embargo las complicaciones de dichos procedimientos se encuentran en el orden del 30 al 40%.⁶⁻⁸



Asimismo se han utilizado múltiples procedimientos paliativos en el caso de lesiones malignas cuando no es posible la sustitución de este órgano.⁹

Cada año se reportan alrededor de 5,000 a 10,000 pacientes con enfermedad congénita o adquirida del esófago, estos casos incluyen anomalías congénitas como atresia esofágica con fistula traqueo-esofágica con una incidencia de entre 1 a 4500 en los Estados Unidos,¹⁰ asimismo los niños con lesiones traumáticas como las quemaduras por ingestión de sustancias cáusticas tienen como consecuencia una alta morbilidad, debido a la estenosis que producen, requiriendo en muchas ocasiones la sustitución esofágica total.¹¹

Lo anterior hace patente cada vez más la necesidad de crear nuevas técnicas y procedimientos para el tratamiento de estos pacientes de tal manera que podamos mejorar sustancialmente e incluso idealmente restaurar completamente la calidad de vida.

Al respecto miles de vidas se han salvado gracias a los avances en trasplantes de órganos, sin embargo en nuestro medio esto se ve muy limitado debido al reducido número de donadores compatibles disponible, por ejemplo en los Estados Unidos menos de 3000 donadores de hígado están disponibles para una demanda aproximada de 30,000 pacientes.¹²

Un campo que ha venido creciendo y que podría aportar una solución a estos problemas es la ingeniería de tejidos, la cuál aplica los principios de ingeniería, y de las ciencias biológicas para crear sustitutos vivos que restauran, mantengan o mejoren la función de tejidos y órganos y que además tengan la capacidad de auto-propagación, y de auto-reparación.¹³

Existen tres estrategias generales para la creación de tejido nuevo:

1. *Creación de células sustitutas*: esta técnica evita las complicaciones de una cirugía y permite reemplazar solamente aquellas células que no tienen función, se limita por el rechazo inmunológico y por el potencial fallo de las células implantadas de mantener su función.

2. *Sustancias inductoras de tejido*: consiste en la fabricación a gran escala de moléculas señal como factores de crecimiento y el desarrollo de métodos para llevar dichas moléculas hasta los tejidos blanco.

3. *Cultivo de células y su colocación en matrices*: en sistemas cerrados las células están

encerradas en membranas que permiten la salida de sus productos y evitan el ataque del sistema inmunológico, en sistemas abiertos están adheridas a matrices naturales como colágena o sintéticas como los polímeros, e implantadas en el cuerpo, asimismo estas células pueden ser autólogas.¹²

En los últimos años la utilización de materiales a base de matriz extracelular (MEC) como templates para la reparación de órganos a tenido gran auge, estos materiales se originan a partir de submucosa de intestino delgado (SIS) o submucosa de vejiga urinaria (UBS)¹³ por sus siglas en inglés y se han utilizado exitosamente como injertos para la reparación de defectos aplicados en dermatología, en cirugía cardiovascular, ortopedia, dura madre, vejiga urinaria.¹⁵⁻¹⁷

El propósito del presente trabajo consiste en la construcción de una prótesis de esófago a partir de células autólogas implantadas sobre una matriz de colágena y probar su utilidad en un modelo animal.

Justificación

La alta morbilidad de las enfermedades congénitas o adquiridas del esófago en niños hace creciente la necesidad de crear modalidades de tratamientos alternos a las tradicionales técnicas empleadas en la actualidad. Las técnicas de ingeniería de tejidos aplicadas a esófago mediante el uso de biomateriales basados en matriz extracelular como template para la regeneración de músculo y epitelio esofágico es una alternativa que podría mejorar el tratamiento y la calidad de vida de estos niños.

Planteamiento del problema

¿Es factible la utilización de injertos de biomateriales basados en matriz extracelular como la submucosa de intestino delgado como template para el cultivo de células epiteliales y musculares para la reconstrucción de esófago?

Hipótesis

Es posible reconstruir esófago a partir de la obtención de una biopsia esofágica, multiplicar las células epiteliales y musculares en el laboratorio, sembrarlas en una matriz de colágena para finalmente implantarla en el sitio del defecto a reparar.



Objetivo

Multiplicar células epiteliales y musculares sembrarlas en una matriz de colágena para utilizarse como injerto autólogo para la reparación de un defecto esofágico.

Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones en nuestro laboratorio para la selección y expansión de células de epitelio esofágico.
2. Establecer las condiciones en nuestro laboratorio para la selección y expansión de células de músculo esofágico.
3. Fabricación in vitro de una prótesis de esófago a partir de células autólogas sembradas en una matriz de colágena
4. Probar la viabilidad de una prótesis de esófago en un modelo animal.
5. Corroborar los resultados mediante estudio histopatológico, inmunohistoquímica y microscopía electrónica de barrido.

Diseño

Estudio experimental de tipo ensayo de laboratorio en animales.

Animales utilizados en este estudio: conejos raza New Zeland de cualquier género adultos sanos con peso entre 4 y 6 kg.

Tamaño de muestra: Cinco conejos, cada animal será examinado por un veterinario para garantizar buen estado de salud.

Se les implantarán un Template de Colágena(MEC-SIS) sembradas con células (grupo experimental).

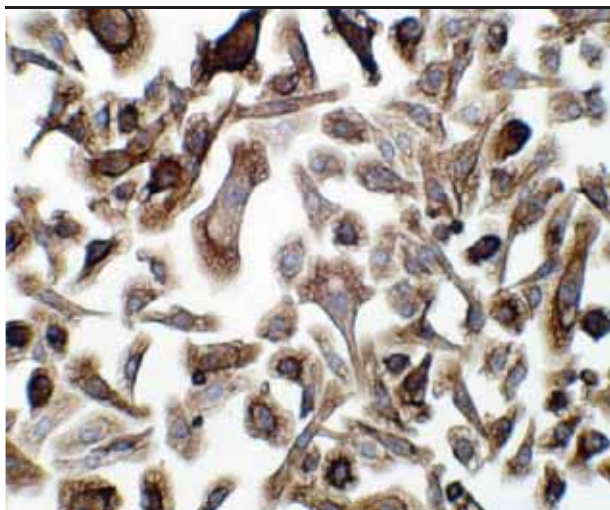


Figura 1. Epitelio esofágico caracterizado con anti-citoqueratinas AE1/AE3

Grupo control: Templates sin células.

Material y Métodos

Fabricación de esófago

I.- Obtención de matriz de colágena acelular de intestino delgado.

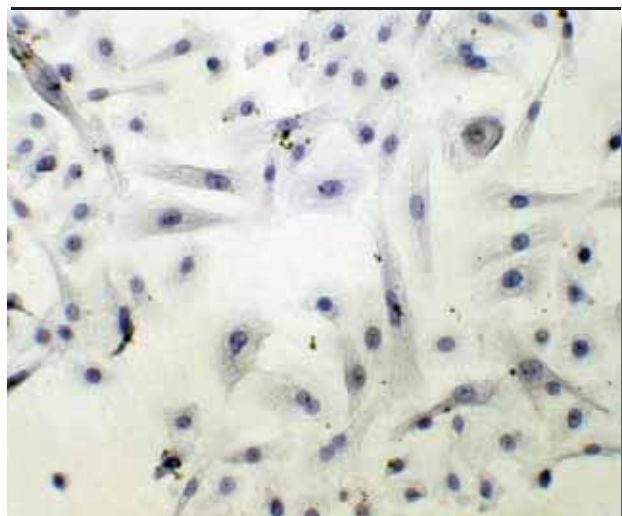
La obtención de la matriz acelular de colágena de intestino delgado se realizará como está descrito,²¹ brevemente secciones de intestino delgado serán delaminados mecánicamente de las capas superficiales de túnica mucosa y de la muscularis externa, la túnica submucosa remanente consistirá casi exclusivamente de matriz extracelular con algunas células.

Posteriormente se trata con ácido peracético al 0.1% lavado con aguda desionizada y solución salina para retirar las últimas células con un pH neutro, para lograr un biomaterial estéril el tejido será secado y liofilizado por 24 hrs y esterilizado con óxido de etileno. Previo a su uso el tejido será re-esterilizado con luz UV por 24 hrs.

Cosecha celular:

Se tomará una biopsia de tejido esofágico a nivel de cuello de conejos sanos la cuál será transportada al laboratorio en solución de Hanks. Se realizará micro disección utilizando lupas de 2.5 X para remover cuidadosamente la capa seromuscular del tejido del esófago.

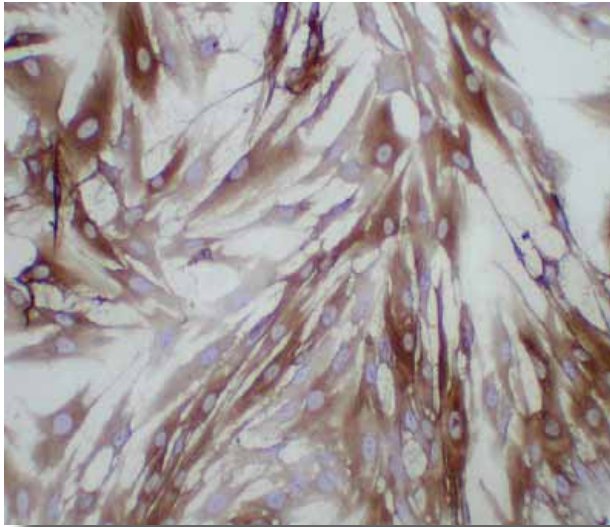
Las células musculares serán inducidas para multiplicación utilizando la técnica de explante,²² brevemente consiste en fraccionar en pequeñas porciones de tejido seromuscular y mantenidas en cajas de cultivo de 10cc con medio Dubelco's Eagle modificado suplementadas con 10% de suero fetal bovino (DMEM/FBS).



Epitelio esofágico tinción H y E



Figura 2. Músculo esofágico liso caracterizado con anti (alfa) actina



Las células epiteliales serán disociadas utilizando digestión enzimática, mediante colagenasa y dispasa, estas serán agregadas a las cajas de Petri de 25cc. con medio de keratinocitos libre de suero (medio K) y se utilizarán para aislar las células epiteliales en solución.

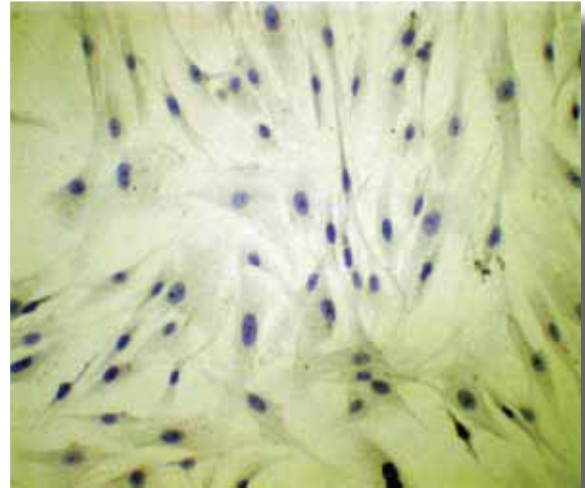
III.- Siembra de células sobre la matriz de colágena

Las células serán cultivadas en cajas de Petri de 25cc. Una vez que alcancen 70% de confluencia, realizándose pasaje a dos cajas de Petri, hasta completar tres pasajes.

El pasaje de las células se realizará al incubarlas con una solución EDTA-tripsina por 1min., para desprender las células del plato de cultivo, y esta será inactivada con suero.

Las células serán centrifugadas y el paquete celular se llevará a una concentración de 1×10^7 cel/cc con medio fresco.

Músculo esofágico tinción con H y E



Los templates serán sembrados secuencialmente con células epiteliales dentro de lumen y las células musculares en la superficie externa resuspendidas en una solución con medio.

Los tejidos sembrados serán incubados por siete días. Los tejidos no sembrados se utilizarán como controles incubados por 24hrs. en medio DMEM/FBS previo a la implantación.

Descripción general de procedimientos quirúrgicos

Para este estudio se utilizarán diez conejos divididos en dos grupos uno experimental y otro control.

A cada animal en la primer cirugía se le tomará una biopsia esofágica a nivel de cuello de aproximadamente 0.5 cm de longitud la cuál se procesará en el laboratorio para aislar, cultivar y expandir las células epiteliales y musculares. En esta misma cirugía se les colocará una sonda de yeyunostomía a fin de proporcionarles alimento por esta vía evitando la ingesta oral por cinco días para favorecer la cicatrización en el defecto creado.

Una vez expandidas las células y conformada la prótesis esofágica, se procederá a una segunda cirugía en donde se creará un defecto de aproximadamente 2 cm de longitud de circunferencia total la cuál se reparará mediante el implante de la prótesis esofágica, los animales se mantendrán igualmente alimentados por sonda de yeyunostomía por siete días.

Los animales se mantendrán vivos por períodos de 15 días a seis meses, estos tiempos fueron escogidos basados en experimentos similares utilizando submucosa de intestino delgado como template de colágena o template de ácido poliglicólico (PGA).¹⁸⁻²⁰

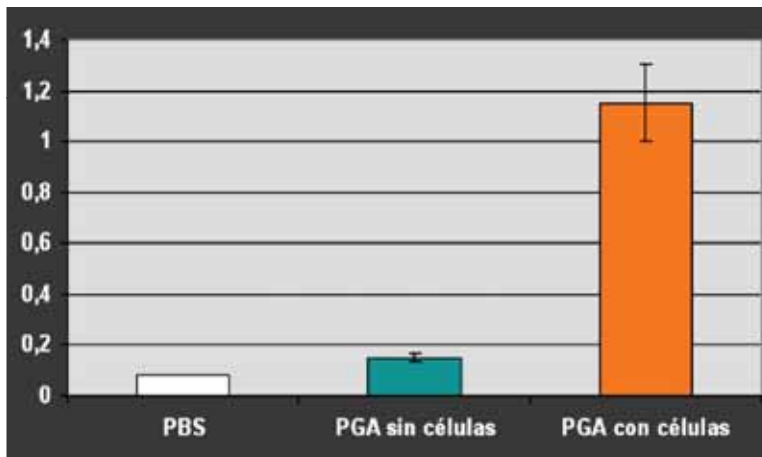
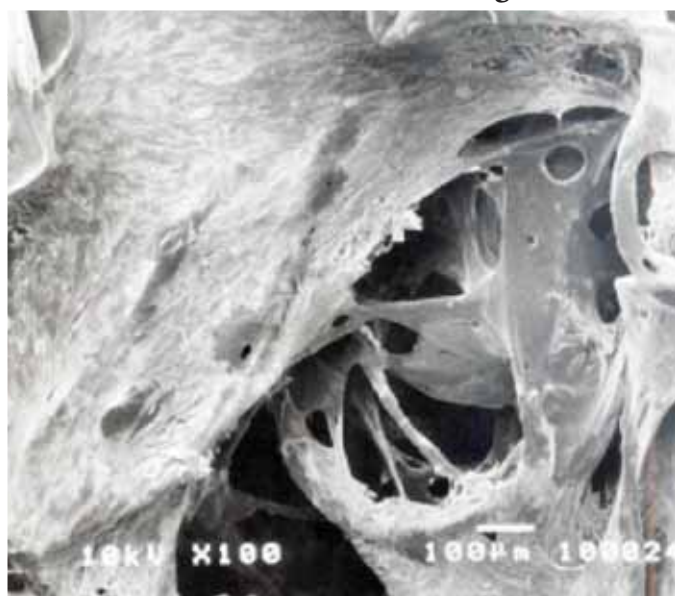


Tabla 1. Viabilidad celular

Figura 3. Microscopia electrónica



PGA sembrada con células



SIS sembrada con células

Procedimientos quirúrgicos:

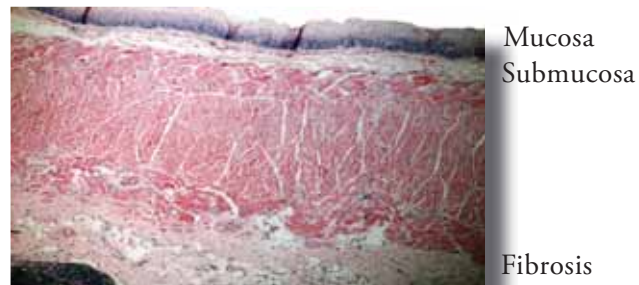
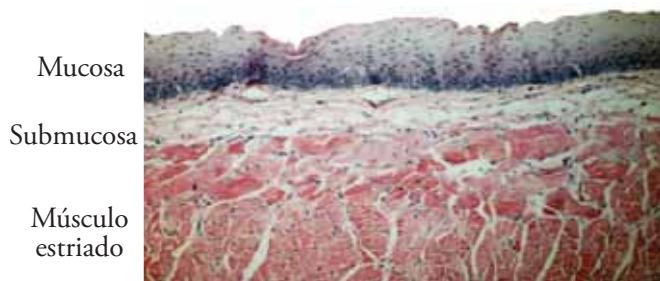
Primera cirugía: Cada conejo será anestesiado por inducción con Tiopental sódico IV. Se realizará asepsia y antisepsia de la región cervical ventral y abdominal con isodine espuma y tintura de yodo-alcohol se colocarán de campos estériles, y se procederá a realizar una incisión media, posteriormente mediante disección roma por planos se identificará el esófago, al cuál se realizará una incisión de un centímetro de longitud para toma de biopsia, el defecto se cerrará con sutura absorbible de vicryl 3 ceros (Ethicon Ltd. UK.), se afrontará el tejido celular subcutáneo con vicryl 3 ceros y piel con vicryl 4 ceros.

Posteriormente se procederá a realizar incisión media abdominal de aproximadamente dos centímetro de longitud se realizará disección por planos hasta cavidad abdominal hasta localizar asa de intestino delgado (yeyuno) el cuál se incidirá para colocar sonda de yeyunostomía la

cuál se fijará mediante jareta de vicryl 3 ceros, fijándose asimismo el intestino a pared abdominal anterior con vicryl 3 ceros, exteriorizándose la sonda por contra abertura en piel a la cuál se fijará con seda 4 ceros.

Segunda cirugía: Se realizarán los mismos procedimientos de anestesia y de asepsia, posteriormente se realizará incisión media en cuello de aproximadamente 4 cm, disección por planos hasta localizar el esófago, al cuál se resecará un segmento de dos centímetro de longitud y 50% de circunferencia en donde se colocará la prótesis esofágica en “parche” suturándola a los bordes del esófago con monocryl 5 ceros con puntos simples totales.

Asimismo se colocarán clips de metal (premiun surgiclip M 11.5 Unites States Surgical Corp., Norwalk Conn) en los bordes quirúrgicos del esófago nativo como marcadores, una vez fijada la prótesis se procederá a cierre de la herida por planos de igual manera que en la primera cirugía.



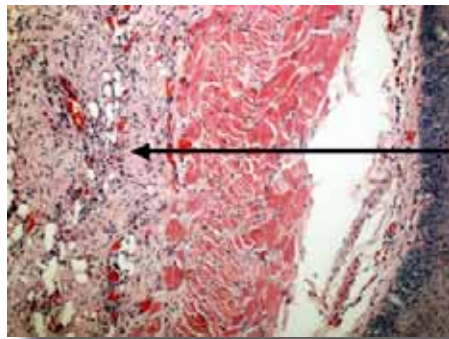
Figuras 4 y 5. Cortes Histológicos de neoesófago

Cortes histológicos de prótesis de neoesófago en “parche” teñidos con Hematoxilina

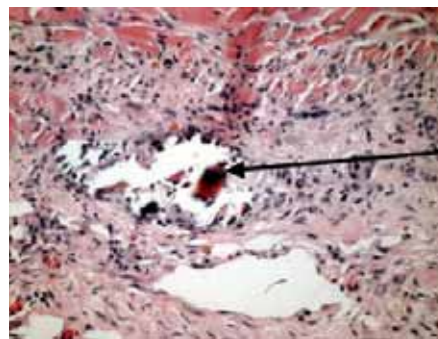


Figuras 6 y 7.
Crotes de neoesófago

Cortes Histológicos de neoesófago en "parche" teñidos con hematoxilina y eosina



Reacción
inflamatoria



Restos materiales
de sutura y reacción
inflamatoria

Cuidados post-quirúrgicos

Cada animal recibirá una dosis intra operatoria de antibiótico (cefazolina 500 mg IV.) y en el postoperatorio (cefalexina 500 mg por sonda cada 12 hrs por siete días).

Se mantendrán con alimentación por sonda de yeyunostomía por siete días y posteriormente se reiniciará la alimentación oral en forma gradual, los animales estarán bajo el cuidado de médicos veterinarios quienes vigilarán su evolución.

Evaluación postoperatoria

1.- Se realizará serie esofagogastrodueodenal y endoscopia esofágica a los 15 días postquirúrgicos.

2.- Los animales serán sacrificados mediante la inyección de una sobredosis de pentobarbital sódico y cloruro de potasio al mes de la operación y a los 2, 4, 6 meses postquirúrgicos para evaluación histopatológica.

3.- Estudio Histopatológico:

Al momento de la autopsia el esófago regenerado incluyendo el esófago nativo normal será resecado y abierto mediante una incisión longitudinal y se realizarán las siguientes mediciones:

Los especímenes recolectados serán fijados en formol al 10% y se realizará un estudio histopa-

tológico con microscopio de luz mediante tinción tricromo de Masson.¹⁸ Así como tinciones con HyE comparándose con tejidos sanos.

4.- Inmunohistoquímica:

La presencia de células de músculo liso será corroborada por inmunofluorescencia mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal de ratón anti humano contra alfa actina de músculo liso y contra citoqueratinas (Dako A/S, Glostrup, Denmark). (Ver anexo descripción de técnicas).

Resultados

I.- El protocolo consta de tres fases, la primera fase in Vitro consiste en la toma de biopsias de músculo y mucosa esofágica, la caracterización de ambos tejidos por métodos inmunológicos microscopia electrónica de barrido y la construcción de una prótesis esofágica, viable, la segunda fase consiste en la implantación de dicha prótesis en el modelo animal de experimentación, y la tercera fase estudios supervivencia.

Caracterización celular

Selección y expansión de células de epitelio y músculo liso

Consistió en la toma de biopsia de músculo y mucosa esofágica en un modelo animal (conejo) la separación de ambos grupos de células por métodos enzimáticos y/o explante lograr su expansión en medios especiales de cultivo lo cual se ha llevado a cabo satisfactoriamente y su caracterización por métodos de inmunohistoquímica siendo positivos para pancitoqueratinas (epitelio) y alfa actina (músculo) Figura 1 y 2.

En esta etapa asimismo las células se cultivaron ambos tipos de células en una prótesis compuesta de submucosa intestinal (SIS) y se



Figura 10. Endoscopia



Figura 11. Esófagograma

comprobó la viabilidad celular (Tabla 1).

Microscopía electrónica

Por último se estudio las prótesis ya sembradas con células mediante microscopía electrónica de barrido. (Figura 3)

Reportes Histopatológicos

Las prótesis ya sembradas con células fueron implantadas de manera subcutánea en el dorso de ratas wistar y retiradas 20 días después para su análisis histopatológico los primeros ensayos no mostraron presencia de células epitelias ni musculares en estas prótesis, sin embargo en estudios posteriores se observaron células, lo cual se corroboró con estudios de viabilidad.

Posteriormente las prótesis fueron implantadas en un defecto creado en el esófago cervical en conejos sanos siendo sacrificados posteriormente.

Los reportes histopatológicos de los estudios postmortem reportan una arquitectura muy semejante al normal con presencia de células epiteliales y musculares. (Figuras 6 y 7)

En otros cortes observamos restos de material de sutura y reacción inflamatoria. (Figuras 8 y 9)

Se realizaron los estudios de serie esofágica, la cuál muestra adecuado paso del medio de contraste sin datos de estenosis ni fugas, lo cuál se confirma con endoscopia mostrando una li-

gera cicatriz en la zona de toma de biopsia, y una morfología normal a la inspección visual. (Figuras 10 y 11)

Conclusiones

1. Se establecieron las condiciones en nuestro laboratorio para la selección y expansión de células de epitelio esofágico.
2. Se establecieron las condiciones en nuestro laboratorio para la selección y expansión de células de músculo esofágico.
3. Se fabricó in vitro una prótesis de esófago a partir de células autólogas sembradas en una matriz de colágena
4. Después de 10 días en cultivo la viabilidad celular fue adecuada.
5. Fue posible implantar la prótesis en "parche" en el esófago nativo con adecuada integración en los 4 animales
6. Los estudios de esofagografía y endoscopia esofágica mostraron una adecuada luz en la prótesis in vivo sin evidencia de fugas ni estenosis.

Referencias

1. Lillehei GW, Shamberger RC. Reoperative esophageal surgery. *Sem Pediatr Surg* 2003;12:100-106
2. Spitz L. Esophageal atresia: past, present, and future. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 19-25
3. Ein SH. Gastric tubes in children with caustic esophageal injury: a 32-year review. *J Pediatr Surg* 1998; 33:1363-1365
4. Saeki M, Tsuchida Y, Ogada T, et al. Long term results of jejunal replacement of the esophagus. *J pediatr Surg* 1988; 23:483-489
5. Hendren WH, Hendren WG. Colon interposition for esophagus in children. *J Pediatr Surg* 1985;20:829-839
6. Ahmad SA, Silvestre KG, Hebra A, et al. Esophageal replacemen using the colon: is it a good choice?. *J Pediatr Surg* 1996;31:1026-1030
7. Erdogan E, Emir H, Eroglu E, et al. Esophageal replacement using the colon: a 15-year review. *Pediatr Surg Int* 2000;16:546-549
8. Raffensperger JG, Luck SR, Reynolds M, et al. Intestinal Bypass of the esophagus. *J Pediatr Surg* 1996;31:38-47
9. Mayoral W. The esophacoil stent for malignant esophageal obstruction. *Gastrointest Endosc Clin North Am* 1999;9:423-430
10. Aziz D, Schiller D, Gerstle JT, Ein SH, lang-



er JC. Can "Long- Gap" esophageal atresia be safely managed at home while awaiting anastomosis. *J pediatr Surg* 2003;38:705-708

11. Chen HC, Tang YB. Microsurgical reconstruction of the esophagus. *Semin Surg Oncol* 2000;19:235-245

12. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science* 1993;260:920-926

13. Grikscheit TC, Vacanti JP. The History and current status of tissue engineering: the future of pediatric surgery. *J Pediatr Surg* 2002;37:277-288

14. Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Cell Develop Biol* 2002;13:377-383

15. Kropp BP, Cheng EY, Pope IV JC, Brock III JW, Koyle MA, Furness PD, et al. Use of small intestinal submucosa for corporal body grafting in cases of severe penile curvature. *J Urol* 2002;168:1742-1745

16. Prevel CD, Eppley BL, Summerlin DJ, et al. Small intestinal submucosa (SIS): Utilization as a wound dressing in full-thickness rodent wounds. *J Plast Surg* 1995;35:381-388

17. Cob MA, Badylak SF, Janas W, et al. Histology after dural grafting with small intestinal submucosa. *Surg Neurol* 1996;46:389-394

18. Grossklaus DJ, Shappell SB, Adams MC, Brock III JW, Pope IV JC. Small intestinal submucosa as a urethral coverage layer. *J Urol* 2001;166

19. Yamamoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, Matsumoto K, Takimoto Y, Kiyotani T, et al. Intrathoracic esophageal replacement in the dog with the use of an artificial esophagus composed of a collagen sponge with double-layered silicone tube. *J thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:276-286

20. Barnes W, Redo F, Ogata K. Replacement of portion of canine esophagus with composite prosthesis and greater omentum. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1972;64:892-896

21. Takimoto Y, Nakamura T, Yamamoto Y, Kiyotani T, Teramachi M, Shimizu Y. The experimental replacement of a cervical esophageal segment with an artificial prosthesis with the use of collagen matrix and a silicone stent. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:98-106

22. Sandusky GE, Badylak SF, Morff RJ, Johnson WD, Lantz GC. Histologic findings after in vivo placement of small intestine submucosa vascular grafts and saphenous vein grafts in the carotid artery in dogs. *Am J Pathol* 1992;140:317-321

23. Karmioli S. Cell isolation and selection. En: Atala A, Lanza RP, editores *Methods of tissue engineering*. New York: Academic Press;2002. p.19-35.

