

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

REJEIÇÃO E REVASCULARIZAÇÃO
INDIRETA DO IMPLANTE DE TRAQUÉIA
GLICERINADA

Maurício Guidi Saueressig

Orientador: Dr. Amarílio Vieira de Macedo Neto
Prof. Adjunto do Departamento de Cirurgia - UFRGS
Co-orientadora: Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss
Profa. Titular do Departamento de Patologia – UFRGS

Dissertação de Mestrado

Porto alegre/RS

Maio 2002

O presente trabalho foi realizado no Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na vigência dos auxílios concedidos pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) concedeu bolsa ao autor. Um pesquisador assistente recebeu bolsa da FAPERGS.

***Para Antonio, Marilice, Patrícia,
Felipe e Anna Luiza, com muito carinho***

AGRADECIMENTOS

Este trabalho demarca a estreita amizade e cumplicidade que cultivei com pessoas notáveis do Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para essas pessoas que conheci e compartilhei estes últimos dois anos, nos quais não faltaram palavras carinhosas e de incentivo, ofereço este trabalho.

Agradeço, também

ao **Professor Amarílio Vieira de Macedo Neto**, afetuoso amigo, tornou-se um modelo pessoal e profissional. Seu senso crítico e conhecimento, associada ao seu modo especial de conduzir a solução de problemas, transformaram a árdua jornada da pós-graduação num trabalho prazeroso e gratificante;

à **Professora Maria Isabel Albano Edelweiss**, pelo estímulo e orientação, indispensáveis para a conclusão deste trabalho;

ao **Professor Antonio de Pádua Silva Neto**, pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos, na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

ao **Adriano G. Melos**, que nesses últimos dois anos, tornou-se um amigo. Seu apoio nos experimentos foram fundamentais;

aos alunos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **Fabício L. Savegnago, Ibsen G. Bruno, Fabício Z. Barcelos, Felipe H. de Souza, Marconi O. Fernandes e Marcelo de Borba**, hoje amigos e pesquisadores que posso confiar;

ao **Alexandre Heitor Moreschi**, amigo e médico exemplar, seu estímulo e colaboração facilitaram o desenvolvimento deste trabalho;

ao **Marcelo Cypel e Tatiana K. Simon**, meus amigos, pelo apoio prestado nos experimentos;

a todas as enfermeiras do CME (Centro de Materiais Esterilizados) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e particularmente à **Solange M. Guimarães** pela cooperação e pelo apoio;

ao **Professor Luis Rohde**, pela confiança depositada neste trabalho;

à secretária do PPG de cirurgia, **Estela M. Araripe**, pelo auxílio dispensado durante todas as fases da realização do mestrado;

ao **Antonio G. Severino** e ao **Professor Felipe L. Schneider**, do Laboratório de Neuroanatomia, Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela cooperação e orientação na metodologia;

ao **Professor Luis Felipe S. Gonçalves**, pela colaboração nas microfotografias;

ao **Jorge A. Lopes**, técnico de laboratório do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela cuidadosa confecção das lâminas de histologia;

à **Helen Flores**, pela disposição em organizar a ficha catalográfica deste trabalho;

à **Professora Fátima Áli**, pela assessoria na redação final deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	13
LISTA DE SÍMBOLOS	14
1 REVISÃO DA LITERATURA	15
1. 1 Revascularização do aloenxerto traqueal.....	17
1. 2 Antigenicidade da traquéia.....	20
1. 3 Reepitelização do enxerto traqueal.....	22
1. 4 Métodos de conservação traqueal.....	23
2 OBJETIVOS	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA	30
RESUMO DO ARTIGO CIENTÍFICO	38
3 INTRODUÇÃO	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4. 1 Protocolo experimental.....	44
4. 2 Coleta dos aloenxertos	44
4. 3 Coleta dos auto-enxertos.....	47
4. 4 Implantação no omento maior.....	47
4. 5 Injeção do látex.....	51
4. 6 Coleta dos implantes e dos enxertos no omento maior.....	51
4. 7 Macroscopia.....	53
4. 8 Teste da resistência à deformação (Malacia).....	53
4. 9 Análise histológica.....	53
4. 10 Análise estatística.....	57

5 RESULTADOS	59
5. 1 Macroscopia.....	59
5. 2 Teste da resistência à deformação	59
5. 3 Análise histológica.....	63
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÃO	85
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO CIENTÍFICO	87
GLOSSÁRIO	91
ARTIGO CIENTÍFICO NA VERSÃO EM LÍNGUA INGLESA	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número total de cães com uma das três combinações de dois segmentos de traquéia distintos, provenientes dos grupos de pesquisa (auto-enxerto, aloenxerto e glicerina).....50

Tabela 2. Avaliação histológica e presença de malacia nos segmentos traqueais, após 28 dias de implantação no omento maior.....60

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Origem da amostra e dos grupos de pesquisa (auto-enxerto, aloenxerto e glicerina) a partir dos 51 cães.....43

Fig. 2. Fotos da coleta dos implantes e dos enxertos traqueais. Foto 1, exposição do segmento traqueal a ser coletado. Foto 2, dissecação da parede posterior da traquéia, afastando o órgão de sua posição próxima ao esôfago. Foto 3, segmento traqueal, com seis anéis cartilagosos, que será coletado como auto-enxerto. Quinta cartilagem apontada na seta. Foto 4, dissecação e ressecção da adventícia traqueal durante a preparação do implante que será conservado na glicerina.....45

Fig. 3. Fotos do armazenamento e da hidratação da traquéia glicerinada. Foto 1, traquéia (seta) imersa na glicerina a 99 %, e armazenada em temperatura ambiente no frasco de vidro hermeticamente fechado. Foto 2, traquéia glicerinada antes da hidratação. Foto 3, traquéia glicerinada mergulhada no soro fisiológico para hidratação, numa cuba metálica. Foto 4, traquéia glicerinada após hidratação.....46

Fig. 4. Fotos da coleta do auto-enxerto e da traqueoplastia. Foto 1, incisão da traquéia no 10º anel cartilaginoso (seta). Foto 2, após a retirada do auto-enxerto com seis anéis cartilagosos, suturou-se inicialmente a parede posterior da traquéia, ventilando o cão, pelo campo operatório, com um tubo aramado (seta) na luz inferior do defeito traqueal. Foto 3, sutura da parede anterior da traquéia. Foto 4, anastomose término-terminal finalizada (seta).....48

Fig. 5. Fotos das implantações dos segmentos traqueais (setas) no omento maior. Foto 1, omento maior mobilizado da cavidade peritoneal através da laparotomia. Foto 2, segmento traqueal pronto para ser envolvido pelo omento maior. Foto 3, segmento traqueal já implantado no omento maior. Foto 4, dois segmentos traqueais de grupos diferentes envolvidos pelo omento maior.....49

Fig. 6. Fotos do procedimento de infusão do látex pela aorta, antes da coleta dos segmentos traqueais no omento maior. Foto 1, dissecação do retroperitônio para

identificação do segmento da aorta abdominal acima do tronco celíaco (E = estômago, A = aorta, R = rim direito). Foto 2, punção da aorta (seta) para infusão do látex.....52

Fig. 7. Fotos do teste da resistência à deformação (malacia) dos segmentos traqueais. Setas indicam o segmento traqueal com 0,5 cm de comprimento. Fotos 1 e 2, utilizamos um manômetro aerógeno conectado a um cateter multiperfurado que passou através da luz do segmento traqueal, presente no interior de um preservativo vedado, no qual foi desenvolvido a pressão negativa de 200 mmHg. Fotos 3 e 4, o manômetro mostra a pressão negativa no interior colabado do preservativo, enquanto que o segmento traqueal manteve a sua luz, ou seja, não apresentou malacia.....54

Fig. 8. Desenho do corte transversal da traquéia, dividida em quatro quadrantes, a fim de quantificar a revascularização circunferencial e o infiltrado mononuclear (desenho extraído de Salassa JR, Pearson BW, Payne S. Gross and microscopical blood supply of the trachea. Ann Thorac Surg 1977;24:100-7).....55

Fig. 9. Foto do corte transversal dos segmentos de traquéia dos três grupos de pesquisa, coletados após 28 dias de implantação no omento maior. Observar no auto-enxerto, o látex de cor verde no fragmento de omento maior aderido, e o exsudato purulento na luz.....61

Fig. 10. Fotos de dois segmentos de traquéia do grupo aloenxerto, mostrando obstruções de pelo menos 50 % da luz pela fibrose.....62

Fig. 11. Microfotografia do epitélio respiratório (ER) e da submucosa (S) de segmentos de traquéia do grupo auto-enxerto, após a implantação no omento maior nos cães número 32 (foto 1), 13 (fotos 2 e 3) e 20 (foto 4), durante 28 dias. Os vasos (*) da submucosa estão preenchidos com látex (hematoxilina-eosina; ampliação original: fotos 1 e 2 = 100 X, fotos 3 e 4 = 400 X).....64

Fig. 12. Microfotografias do segmento traqueal glicerinado, após 28 dias no omento maior do cão número 20. Revascularização da submucosa, com vasos preenchidos pelo

látex verde (setas) (hematoxilina-eosina; ampliação original: fotos 1 e 2 = 100 X, foto 3 = 400 X, foto 4 = 40 X).....65

Fig. 13. Médias do número de vasos corados na submucosa dos grupos auto-enxerto, aloenxerto e glicerina. As pequenas barras verticais representam os desvios padrões nesses grupos. O símbolo (*) indica as médias dos grupos auto-enxerto e glicerina que foram estatisticamente diferentes ($p = 0,029$).....66

Fig. 14. Médias do número de setores com vasos funcionais dos grupos auto-enxerto, aloenxerto e glicerina. As pequenas barras verticais representam os desvios padrões nesses grupos. O símbolo (*) indica a média do grupo auto-enxerto que foi estatisticamente maior em comparação às médias dos grupos glicerina ($p = 0,005$) e aloenxerto ($p = 0,013$).....67

Fig. 15. Médias dos escores de arterite aguda dos grupos auto-enxerto, aloenxerto e glicerina. As pequenas barras verticais representam os desvios padrões nesses grupos. O símbolo (*) indica as médias dos grupos auto-enxerto e aloenxerto que foram estatisticamente diferentes ($p = 0,001$).....68

Fig. 16. Microfotografias da arterite intimal leve-moderada (v1) em segmentos de traquéia do grupo aloenxerto, após a implantação por 28 dias, no omento maior dos cães número 26 (fotos 1, 2 e 3) e 16. Setas finas indicam os linfócitos permeando a íntima dos vasos. Seta larga aponta o látex na luz arteriolar (hematoxilina-eosina; ampliação original: 400X).....69

Fig. 17. Microfotografias da arterite intimal grave (v2) em segmentos traqueais do grupo aloenxerto, após a implantação por 28 dias, no omento maior dos cães número 17 (foto 1), 25 (foto 2), 27 (foto 3) e 26 (foto 4). Setas apontam para a luz dos vasos parcialmente obstruídos pelas células mononucleares (hematoxilina-eosina; ampliação original: 400X).....70

Fig. 18. Correlação entre o número de setores com vasos funcionais e o escore de arterite aguda ($r_s = - 0,308$; $p = 0,025$).....72

Fig. 19. Microfotografias da arterite crônica (cv) no segmento traqueal do grupo glicerina, após a implantação por 28 dias, no omento maior do cão número 19. Seta larga aponta para células mononucleares permeando a íntima do vaso (hematoxilina-eosina; ampliação original: 400X).....73

Fig. 20. Médias dos escores da infiltração de mononucleares nos grupos auto-enxerto, aloenxerto e glicerina. As pequenas barras verticais representam os desvios padrões. O símbolo (*) indica a média do grupo aloenxerto que foi estatisticamente maior em comparação às médias dos grupos auto-enxerto ($p = 0,000$) e glicerina ($p = 0,001$).....74

Fig. 21. Médias dos escores de lesão cartilaginosa dos grupos auto-enxerto, aloenxerto e glicerina. As pequenas barras verticais representam os desvios padrões nesses grupos ($p = 0,646$).....75

Fig. 22. Microfotografias dos anéis cartilagosos (C) de quatro segmentos traqueais dos grupos: foto 1 = glicerina (ampliação 100 X), foto 2 = auto-enxerto (ampliação 40 X), fotos 3 e 4 = aloenxerto (ampliação 100 X) (hematoxilina-eosina). Observar hialinização da matriz e cariólise nos condrócitos da foto 4. Fotos 1 a 3 apresentam cartilagens sem lesões isquêmicas. Os segmentos traqueais foram implantados, durante 28 dias, no omento maior dos cães número 12 (foto 1), 13 (foto 2), 14 (foto 3) e 24 (foto 4).....76

Fig. 23. Microfotografias dos segmentos de traquéia glicerinadas, implantadas, durante 28 dias, no omento maior dos cães número 19 (foto 1), 12 (foto 2), 20 (foto 3) e 11 (foto 4). Submucosa (S), cartilagem (C), adventícia (A), epitélio respiratório (EP), glândulas da submucosa (G), vaso preenchido com látex verde (*) (hematoxilina-eosina; ampliação original: fotos 1 e 3 = 40 X, foto 2 = 400 X, foto 4 = 100 X).....78

LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF - *basic fibroblast growth factor*

et al. – *et alii* – e outros.

HLA – *Human Leucocyte Antigen*

IM – via intramuscular

IV – via intravenosa

IN – via inalatória

MHC – *Major Histocompatibility Complex*

PAS – *Periodic Acid-Schiff*

SC – via subcutânea

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

n – número de implantes ou enxertos traqueais examinados

p – probabilidade de erro tipo I

G – *gauge*; unidade de medida do calibre de um cateter

v0 – ausência de arterite

v1 – arterite intimal leve-moderada

v2 – arterite intimal grave

v3 – arterite transmural

cv – arterite crônica

α – nível de significância estatística

1 REVISÃO DE LITERATURA

A reconstrução de defeitos traqueais extensos é um problema ainda sem uma solução definitiva⁽¹⁾. A traqueoplastia mediante a ressecção circunferencial com anastomose término-terminal é o tratamento de escolha na maioria das doenças da traquéia, resolvendo até 90 % desses casos⁽²⁻⁴⁾.

Contudo, o tamanho da ressecção traqueal tem um limite. Em 1964, o estudo em cadáveres, de Grillo et al.⁽¹⁾, estabeleceu esse limite em 6,4 cm, ou 60 %, premissa reforçada por outros autores^(2,5-6). Ressecções abaixo desse limite, mas superiores a 5 cm devem ser acompanhadas de manobras que possibilitem a redução da tensão dos bordos traqueais⁽⁵⁾, como o rebaixamento da laringe proposta por Montgomery⁽⁷⁾.

A tensão máxima suportável ao nível de anastomose término-terminal em ressecções traqueais é 1700 g, segundo o trabalho em cães de Cantrell e Folse⁽⁸⁾, em 1961. Esse limite tensional também seria aplicável nas anastomoses de traquéias humanas, de acordo com o estudo em cadáveres, de Mulliken e Grillo⁽⁶⁾, em 1967.

Um componente local indispensável para a cicatrização nas anastomoses que envolvem a traquéia é a permanência da circulação arterial, garantida pela preservação da delicada rede vascular, durante a dissecação e nas manobras de mobilização da traquéia^(9, 10).

A tensão exagerada de uma anastomose traqueal término-terminal induz ao estiramento da via aérea, determinando a interrupção do fluxo sangüíneo, nos vasos que penetram perpendicularmente entre cada anel cartilaginoso. O resultado é a deiscência parcial, com proliferação do tecido de granulação, provocando a estenose⁽¹¹⁾.

A traqueostomia definitiva⁽¹²⁾, a radioterapia⁽⁵⁾, a traqueoplastia de deslizamento⁽¹³⁾ e o tubo T de Montgomery⁽⁵⁾, resguardando suas indicações e suas limitações, são opções para o manejo de pacientes com doenças traqueais que excedem o limite seguro para a ressecção com anastomose término-terminal. Excluindo-se a traqueoplastia de deslizamento para pacientes pediátricos, as outras alternativas listadas estão longe de se

tornarem soluções definitivas para pacientes com doenças extensas da traquéia, pois não restabelecem plenamente as funções da via aérea.

A fonação, a limpeza de secreções e a respiração nasal seriam garantidas pela manutenção da continuidade da via aérea, com impacto substancial na qualidade de vida dos pacientes que teriam como única opção, por exemplo, a traqueostomia e sua morbidade associada. Essa premissa estimulou o emprego de próteses, de tecidos autógenos ou do transplante traqueal, com o objetivo de reconstruir defeitos traqueais extensos e, dessa forma, permitir a conservação das funções da via aérea⁽¹⁴⁾.

Em 1945, Belsey⁽¹⁵⁾ foi quem realizou a primeira reconstrução de um defeito traqueal extenso com um substituto protético, em uma paciente com recorrência de carcinoma adenocístico. Para isso, utilizou uma prótese traqueal de aço recoberta com fásia lata para reconstruir o defeito que se estendia do nível da fúrcula esternal até a borda superior da carina. Após sobreviver 12 meses, uma nova recidiva tumoral provocou o falecimento da paciente. Não houve relato sobre o manejo das complicações inerentes a esse procedimento.

Até o momento, já foram testadas próteses de traquéia com os mais diversos materiais⁽¹⁶⁾. A mais conhecida é aquela produzida com silicone e desenvolvida por Neville et al.⁽¹⁷⁾.

Entretanto, a incapacidade em propiciar a reepitelização nos defeitos maiores de 2 cm⁽¹⁶⁾ com a ocorrência de graves complicações, como a proliferação do tecido de granulação com obstrução da luz, a infecção crônica e a erosão de grandes vasos, foi responsável pelo fracasso das próteses⁽³⁾. Não bastou esse substituto apresentar qualidades como rigidez e impermeabilidade, pois a adequada manutenção da luz traqueal dependeria de fatores adicionais que estiveram ausentes, como a epitelização e a vascularização do segmento reconstruído^(1, 3, 16, 18-19).

Em 1940, o cirurgião Taffel - citado por Belsey⁽¹⁵⁾ - procedeu à primeira substituição experimental da traquéia com tecido autógeno, mediante o auto-enxerto de fásia lata num

defeito pequeno, com 1 cm de extensão, localizado na parede traqueal de cães. Houve reepitelização e conservação da luz no segmento reconstruído.

O emprego de tecidos autógenos ou heterógenos, como a pele⁽²⁰⁾, o peritônio⁽²¹⁾ e a dura-máter⁽²²⁾, na substituição da traquéia visou a favorecer a migração do epitélio respiratório por distâncias maiores da traquéia nativa, propiciada pelo arcabouço vascular presente nesses substitutos⁽²³⁾. Na prática, ocorreu a mesma dificuldade para reconstruir os defeitos maiores de 2 cm. Entretanto, nesse caso, a dificuldade relacionou-se à incapacidade na manutenção da luz^(3, 20-22). Dependendo do tecido utilizado, a incapacidade em manter a luz traqueal demandou a aplicação de suportes para manter a rigidez no conduto aéreo^(3, 20, 24-25). Além do que, a complexidade dos procedimentos envolvendo substitutos traqueais, como aorta⁽²⁴⁾ e esôfago⁽²⁵⁾ por exemplo, sugerem extrema cautela quanto a sua aplicabilidade clínica⁽³⁾.

No momento atual, grande parte da pesquisa em torno de um substituto para a traquéia envolve os aloenxertos criopreservados, acrescidos de revascularização indireta, geralmente fornecida pela omentoplastia. Contudo, a revascularização, a rejeição e a conservação dos aloenxertos de traquéia são obstáculos para serem resolvidos, antes do uso rotineiro do transplante traqueal entre humanos^(3, 26).

1.1 Revascularização do aloenxerto traqueal

O insucesso do transplante experimental de traquéia utilizando-se auto-enxertos desvascularizados maiores de 2 cm ou 3 anéis cartilagosos provou definitivamente a impossibilidade de manter as funções da via aérea com um substituto traqueal longo e desvascularizado, tendo feito Neville et al.⁽²⁷⁾ e Grillo⁽³⁾ concluírem que, na ausência de um método eficaz para revascularizar imediatamente o aloenxerto traqueal, não seria possível o sucesso do transplante de traquéia.

Desde a observação de Morrison⁽²⁸⁾, em 1906, sobre a capacidade do omento maior em revascularizar e em manter a vitalidade celular de tecidos isquêmicos, o potencial dessa estrutura tem sido aproveitada em inúmeras aplicações cirúrgicas⁽²⁹⁾.

A fim de resolver a isquemia do brônquio doador nos transplantes de pulmão, Morgan et al.⁽³⁰⁾, em 1982, pesquisaram um método para a sua revascularização e sua proteção. Para isso, envolveram com omento maior os auto-enxertos brônquicos com 2 cm em extensão, reimplantados no coto do brônquio principal esquerdo, após pneumonectomia em cães. Houve revascularização dos enxertos a partir do 4º dia de pós-operatório, verificada através da injeção de corante (Microfil®), no tronco celíaco.

Os bons resultados da revascularização brônquica de Morgan et al.⁽³⁰⁾ e a facilidade do omento maior em atingir regiões distantes, quando comparado aos retalhos de fáscia⁽³¹⁻³²⁾, de intestino⁽²⁶⁾ ou de músculo⁽³³⁻³⁵⁾, estimularam o emprego da omentoplastia, visando a revascularização indireta dos aloenxertos da traquéia mediastinal ou cervical.

A revascularização indireta da traquéia foi executada em uma etapa, levando-se o omento maior até ao local do transplante, através do diafragma⁽³⁶⁻³⁸⁾, ou em duas etapas. Isto é, num primeiro momento, procedeu-se à implantação do enxerto no omento maior e, após 14 dias, realizou-se o transplante ortotópico com o segmento de traquéia integrado ao omento maior^(12, 20, 39-40).

Quando comparadas, a revascularização em duas etapas promoveu uma melhor regeneração da mucosa respiratória⁽³⁹⁾, pois apresentou uma circulação sanguínea na submucosa mais completa após 14 dias da implantação do segmento traqueal no omento maior⁽⁴⁰⁾.

A revascularização pelo omento maior inicia-se do 4º ao 7º dia, sendo suficiente para garantir a regeneração completa do epitélio respiratório até o 24º dia em enxertos de 1,5 cm a 3,5 cm de comprimento^(12, 20, 36-41). Portanto, a omentoplastia cursa com importante isquemia do aloenxerto nos primeiros dias. Foi o motivo que fez este procedimento cair em desuso para a proteção da anastomose brônquica dos transplantes pulmonares.

Estudos em cães envolvendo o transplante ortotópico com omentoplastia de enxertos traqueais maiores de 3,9 cm, ou a partir de oito anéis cartilagosos, resultaram em malacia isquêmica⁽³⁷⁻³⁸⁾. Entretanto, Borro et al.⁽⁴²⁾, em 1992, Murai et al.⁽⁴³⁾, em 1996, e Ueda et al.⁽⁴⁴⁾, em 1997, conseguiram enxertar segmentos traqueais de até 7 cm, realizando, respectivamente, pequenos cortes na parede externa do enxerto, retirando alguns anéis cartilagosos ou introduzindo o omento maior nas linhas de anastomose.

No sentido de acelerar a revascularização, empregou-se, experimentalmente, o fator de crescimento para fibroblasto (bFGF) no local do auto-enxerto ortotópico. Evidenciou-se revascularização no 3º dia, com uma regeneração mais precoce do epitélio respiratório⁽⁴⁵⁾.

Carreadores vasculares como a fáscia⁽³¹⁻³²⁾, o músculo⁽³³⁻³⁵⁾, o intestino⁽²⁶⁾ e o retalho livre pediculado com microanastomose vascular⁽⁴⁶⁾ são modalidades de revascularização da traquéia que foram tentadas como alternativas ao omento maior, mas a ocorrência de malacia isquêmica em longos segmentos foi semelhante ao apresentado pela omentoplastia.

A pesquisa sobre a revascularização direta da traquéia e do segmento traqueobrônquico tem sido desenvolvida no *Centre Chirurgical Marie Lannelongue/Université Paris-Sud*, desde 1992^(11, 47-49). Levando em consideração que a traquéia possui um pedículo vascular dificilmente individualizável, em que técnicas microcirúrgicas têm enorme chance de redundar em trombose, esse grupo de pesquisadores desenvolveu duas estratégias visando a revascularização direta: 1) a interposição da artéria subclávia doadora no sistema arterial cervical do receptor, permitindo o suprimento sangüíneo do enxerto através dos ramos da artéria tireóidea inferior; 2) a drenagem venosa adequada, anastomosando o efluente da veia cava superior do doador na confluência dos troncos braquiocefálicos do receptor. Esta última técnica demonstrou efetividade nos transplantes de traquéia com 9,75 cm em média⁽⁴⁸⁾, e associada a um duplo eixo de vascularização (artéria tireóidea inferior e artéria brônquica) foi eficiente na revascularização traqueobrônquica⁽⁴⁹⁾, evidenciando a manutenção do epitélio respiratório mucoprodutor desde as primeiras horas pós-transplante. No entanto, estas técnicas são

trabalhosas, necessitam cuidadoso protocolo de imunossupressão e foram testadas apenas em suínos.

1.2 Antigenicidade da traquéia

Os antígenos do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) classe II são os maiores responsáveis pela rejeição aguda dos transplantes em geral⁽⁴⁰⁾. No primeiro transplante traqueal entre humanos, relatado por Rose et al.⁽³⁵⁾, em 1979, as diferenças entre doador e receptor no MHC classe I (em uma posição no *locus* HLA-A e em três no *locus* HLA-B), não foram suficientes para provocar a falha do enxerto nas primeiras nove semanas de seguimento. Esse estudo ajudou a reforçar a idéia errônea de que a traquéia apresenta um baixo poder antigênico. Liu et al.⁽⁵⁰⁾, em 2001, observaram uma menor rejeição ao aloenxerto traqueal do que ao aloenxerto de pele.

Qualquer órgão sólido que receba uma revascularização direta resulta no acionamento do sistema imunológico do receptor pela chamada via direta. As células hematolinfóides doadoras migram, através do pedículo vascular principal, para tecidos linfóides do receptor, simultaneamente ao influxo de células do receptor ao aloenxerto (via direta de reconhecimento antigênico)⁽⁵¹⁾.

A rejeição aguda baseia-se principalmente na via direta de reconhecimento do antígeno⁽⁵¹⁾ e caracteriza-se histopatologicamente por arterite aguda. Essa vasculite tem efeito prognóstico no transplante, pois a sua presença é sinal de falha do enxerto e poderá redundar em rejeição crônica.

Na medida em que o aloenxerto traqueal associado à omentoplastia não recebe uma revascularização imediata, mas apenas a partir do 4°- 7° dias, não haverá migração simultânea das células hematolinfóides do doador e do receptor, reduzindo-se o estímulo antigênico. Predominará a via indireta de reconhecimento imunológico, que é menos intensa e baseada no reconhecimento dos alopeptídeos do doador pelas células apresentadoras de antígenos do receptor (principalmente macrófagos)⁽⁵²⁾.

Além disso, constatou-se a presença de antígenos do MHC classe II no epitélio, nas glândulas e nos capilares submucosos⁽⁵³⁻⁵⁵⁾, mas não na cartilagem dos anéis traqueais, que é a estrutura anatômica mais próxima dos linfáticos do receptor, durante o primeiros dias de transplante, o que dificulta a chamada via direta de sensibilização dos linfócitos, contribuindo para a baixa antigenicidade traqueal⁽⁵²⁾.

Há trabalhos, contudo, que ressaltaram a capacidade do tecido traqueal, através dos antígenos MHC classe II, em desencadear uma resposta imunológica, ao ponto de levar a óbito, pela asfixia, animais transplantados, uma vez que a proliferação do tecido de granulação ou a malacia isquêmica obstruíram a luz do aloenxerto^(12, 41, 43, 50, 53, 56-57). Esse desfecho, o infarto isquêmico, é o resultado final e comum da rejeição aguda em qualquer enxerto⁽⁵²⁾.

Lane et al.⁽⁵⁸⁾, em 1977, foram os primeiros a confirmar, histologicamente, sinais de rejeição aguda da traquéia através da presença do infiltrado mononuclear, predominante linfocítico e perivascular, em fragmentos de aloenxertos de traquéia, implantados no subcutâneo de ratos.

Os estudos experimentais de Nakanishi et al.⁽⁴¹⁾, em 1994, e de Delaere et al.⁽⁵⁹⁾, em 1995, esclareceram que a presença de células mononucleares, em especial, na parede dos vasos, representavam a arterite aguda. Essa vasculite foi responsabilizada pela trombose da microcirculação na submucosa e, em consequência, pelas lesões isquêmicas do epitélio respiratório e da cartilagem traqueal.

A fim de reduzir a rejeição aguda do transplante de traquéia, testaram-se drogas imunossupressoras⁽²⁷⁾, pareamento do MHC⁽⁵⁰⁾, irradiação⁽⁵³⁾, detergentes⁽⁵⁵⁾ e vários tipos de meios de conservação tecidual⁽⁶⁰⁻⁶¹⁾.

1.3 Reepitelização do enxerto traqueal

Idealmente, um aloenxerto traqueal com epitélio respiratório proporcionaria o retorno das funções mucociliares e a ausência da formação de granulomas⁽⁶²⁾. Por outro lado, ao estudarmos as soluções de conservação, buscamos não somente a possibilidade de criar um banco de traquéias, como também reduzir a antigenicidade do aloenxerto.

Os trabalhos de Tojo et al.⁽⁶³⁾ e de Mukaida et al.⁽⁶²⁾, ambos em 1998, estabeleceram que há a substituição da cobertura epitelial nativa, pela migração do epitélio da traquéia receptora através da anastomose, não identificando-se mucosa doadora no enxerto de 3 cm, após 20 dias do homotransplante ortotópico. Essa substituição do epitélio doador favorece a redução do estímulo antigênico.

Os fenômenos de revascularização e de reepitelização do enxerto traqueal são consecutivos^(23, 31). A revascularização iniciada entre o 4° e o 7° dia de transplante na região posterior membranosa, perfaz progressivamente uma direção pósterio-anterior e atinge toda a circunferência traqueal no 14° dia. Como a reepitelização é dependente da revascularização, o epitélio respiratório aparece também primeiro na região posterior membranosa no 8° dia da implantação, cobrindo toda a circunferência traqueal no 24° dia^(23, 31). Mukaida et al.⁽⁶²⁾ demonstraram que, em dois meses, ocorre a substituição completa do epitélio respiratório em um segmento traqueal de 3 cm.

1.4 Métodos de conservação traqueal

A constituição de um banco de traquéias, a exemplo dos já existentes com osso⁽⁶⁴⁾, podem solucionar os problemas com a falta de doadores e com a necessidade imprevista de um substituto traqueal durante uma ressecção de via aérea. Além disso, o meio de conservação teria um efeito imunomodulador, reduzindo a rejeição ao aloenxerto, e, por conseguinte, expandiria as indicações do transplante para pacientes com neoplasias, pois tornaria desnecessária a imunossupressão com seus riscos aumentados de infecção do enxerto⁽⁴⁴⁾.

O tecido conjuntivo, a cartilagem e o epitélio formam uma estrutura relativamente simples, facilitando a conservação eficiente e a longo prazo da traquéia. Um dos pioneiros no estudo dos meios de conservação traqueal foi Marrangoni⁽⁶⁵⁾, em 1950, quando empregou a liofilização nos aloenxertos de traquéia. Nesse método de conservação, perde-se a vitalidade celular, pois os enxertos foram congelados até - 25 °C e mantidos no vácuo durante três ou quatro dias. Oito dos seus nove cães sobreviveram ao homotransplante com traquéias liofilizadas.

Keshishian et al.⁽⁶⁶⁾, em 1956, preservaram segmentos de traquéia caninas na solução de Tyrodes modificada (soro fisiológico a 0,9 %, Mertiolate[®] e penicilina), mantendo-as a - 4 °C por até 14 dias. Todos os esses segmentos traqueais, quando homotransplantados em posição ortotópica, degeneraram em duas semanas.

Björk e Rodriguez⁽¹⁸⁾, em 1957, testaram três formas de conservação em segmentos de traquéia com até 11 anéis cartilagosos: o congelamento, o formol a 4 % ou 40 %; e o álcool a 95 %. Após duas semanas do homotransplante em cães, os implantes estavam degenerados.

Em 1982, Ilberg⁽⁵⁶⁾ publicou uma técnica de transplante, envolvendo o enxerto traqueal de 2 cm, conservado durante oito semanas no Cialit[®] (ácido carboxílico com propriedades bactericidas e conservantes) na substituição da parede anterior de uma traquéia cervical estenosada, porém mantida pérvia pelo tubo T de Montgomery. O

resultado satisfatório nesse paciente, após cinco anos de seguimento, são explicados pela substituição parcial (parede anterior cartilaginosa) de um segmento curto de traquéia. Notadamente, foi uma situação favorável ao aporte sanguíneo na área substituída.

Montovani et al.⁽⁶⁰⁾, em 1987, conservaram traquéias de camundongos desvitalizadas, na solução de formalina a 0,5 % durante duas semanas. Depois de 120 dias do homotransplante, observaram estenose traqueal pela reabsorção e pela desestruturação da cartilagem, conseqüência da rejeição crônica ou da substituição dos condrócitos desvitalizados pelo tecido de cicatrização.

Pinto⁽⁶⁷⁾, em 1991, preservou traquéias de cães em glutaraldeído a 2 % durante seis meses. Após 60 dias de implantação no omento maior, os implantes permaneciam sem malacia, ou seja, a cartilagem, apesar de desvitalizada, mantinha a rigidez da parede traqueal.

Maksoud⁽⁴⁰⁾, em 1997, aplicou a liofilização em segmentos traqueais com 4 cm, mas não apresentou os mesmos resultados de Marrangoni⁽⁶⁵⁾, pois todos os aloenxertos implantados no omento maior, durante 14 dias, mostravam-se necróticos, com degeneração das cartilagens dos anéis traqueais. A partir desses achados, o autor sugeriu o abandono desse método de conservação para a traquéia.

Jacobs et al.⁽⁶⁸⁾, em 1999, publicaram uma série de 37 pacientes em que foi realizado o homotransplante de segmentos longos da parede anterior da traquéia, semelhante a Ilberg⁽⁵⁶⁾. A maioria dos pacientes apresentava estenose pelo trauma da traquéia, pela intubação orotraqueal prolongada, ou congênita. Os implantes vieram de um banco de traquéias conservadas na acetona por períodos de até dois anos. Trinta e um pacientes estavam sem sintomas e não apresentavam sinais de rejeição durante um seguimento de até 14 anos. As desvantagens desse método foram o tempo mínimo de 80 dias de preparação do implante antes da aplicação clínica e a necessidade de órtese traqueal por tempo indefinido nos casos do transplante de segmentos mais longos (mais de 50 % da traquéia).

A partir do sucesso nas válvulas cardíacas⁽⁶⁹⁾, Deschamps et al.⁽⁷⁰⁾, em 1989, expandiram o uso da criopreservação para a traquéia.

A criopreservação é baseada no congelamento da traquéia a - 80 °C, armazenando-a em nitrogênio líquido a - 196 °C⁽⁶¹⁾. A traquéia é congelada com solução crioprotetora⁽⁶¹⁾ a fim de evitar as lesões intracelulares causadas pelos cristais de gelo⁽⁷⁰⁾.

Yokomise et al.⁽⁶¹⁾, em 1996, estudaram os aloenxertos traqueais em cães, ressaltando as seguintes qualidades da criopreservação:

a) a redução da antigenicidade, provavelmente, pela ausência de epitélio respiratório nativo a partir de nove meses de criopreservação;

b) a manutenção da vitalidade dos condrócitos e, portanto, da função da cartilagem do anel traqueal;

c) a possibilidade de armazenamento por até 285 dias.

Kunachak et al.⁽⁷¹⁾, em 2000, realizaram com sucesso os primeiros quatro homotransplantes da parede anterior cartilaginosa da traquéia, com enxertos criopreservados, em pacientes com intubação prolongada e possuindo estenoses da via aérea com uma média de 3,3 cm, não solucionadas, previamente, com traqueoplastia. No seguimento de até 20 meses, os pacientes permaneceram sem sintomas. Não houve necessidade do uso de órteses traqueais.

Apesar dos bons resultados iniciais, há dúvidas quanto ao efeito sobre a rejeição crônica⁽⁷²⁻⁷³⁾, e a relação entre o tempo de armazenamento e a vitalidade da cartilagem do anel traqueal^(57, 71-74) nos enxertos criopreservados.

Moriyama et al.⁽⁷²⁾, em 2000, evidenciaram trombose das artérias intercartilagosas nas traquéias caninas criopreservadas durante 60 dias. A isquemia provocou a degeneração dos condrócitos (cariólise) após 12 semanas do homotransplante. Esse resultado sugere que, apesar da criopreservação reduzir a rejeição aguda, a antigenicidade pode reaparecer, a longo prazo, como dano arterial, reflexo, talvez, de uma rejeição crônica, estimulada pela presença de antígenos nos núcleos viáveis dos condrócitos congelados.

Em relação ao tempo de armazenamento, Yokomise et al.⁽⁶¹⁾, em 1996, criopreservaram as traquéias durante nove meses e não constataram alteração na vitalidade dos condrócitos. Entretanto, Moriyama et al.⁽⁷²⁾, em 2000, e Nakanishi et al.⁽⁷³⁾, em 2001, relataram um maior número de condrócitos com sinais histológicos de degeneração, após manterem as traquéias congeladas durante dois e seis meses, respectivamente.

Todavia, o estudo experimental de Kushibe et al.⁽⁵⁷⁾, em 2001, mostrou redução semelhante da atividade metabólica dos condrócitos, entre as traquéias criopreservadas durante 2 meses e 24 meses.

Em contrapartida, essa degeneração cartilaginosa, secundária ao tempo prolongado de criopreservação, proporcionou uma redução do estímulo antigênico no aloenxerto de traquéia⁽⁷³⁾, efeito semelhante ao da descamação do epitélio respiratório⁽⁶¹⁾. No estudo de Nakanishi et al.⁽⁷³⁾, tempos de criopreservação superiores a 60 dias, resultaram na degeneração dos condrócitos e na redução da resposta alogênica após 28 dias de implantação do aloenxerto congelado no omento maior de cães.

As diferenças nas soluções de crioproteção, nas técnicas de congelamento e nos métodos de armazenamento dos enxertos talvez explicam as divergências entre os trabalhos com criopreservação citados.

Um banco de tecidos conservados pela glicerina, teria como atrativo principal a simplicidade técnica e o baixo custo. Pigossi et al.⁽⁷⁵⁾, em 1971, foram os primeiros a estudar experimentalmente e preconizar o uso clínico da glicerina como meio de conservação tecidual. Nesse trabalho, realizaram o homotransplante ortotópico de dura-máter, conservada na glicerina a 98 % por até 105 dias. Também a dura-máter humana conservada serviu como substituto de tecidos sintéticos e biológicos em diferentes aplicações cirúrgicas, como na correção de hérnias incisionais.

Lenot⁽⁷⁶⁾, em 1992, foi o primeiro a conservar a traquéia de cães na glicerina a 80 % e compará-la à criopreservação. Ele observou, em ambos os métodos, a manutenção das estruturas teciduais e mecânicas da traquéia.

Em todos trabalhos com a glicerina, os tecidos nela conservados e destituídos de vitalidade celular integravam-se a região receptora, através da penetração de fibroblastos e de neovasos, permitindo a revascularização, sem ocorrer reação antigênica⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾.

A glicerina também foi aplicada na conservação de embriões⁽⁷⁸⁾ e como crioprotetor⁽⁷⁹⁾.

As principais qualidades da glicerina são:

- a) o baixo custo;
- b) a aplicação clínica quase imediata, com apenas 12 dias necessários para o preparo do implante;
- c) a desidratação tecidual;
- d) a manutenção da estrutura do implante por no mínimo um ano;
- e) a redução da rejeição do implante, a capacidade de assepsia e a crioproteção;
- f) o aumento da resistência do tecido;
- g) o provável tempo ilimitado de conservação tecidual.

A análise desses dados motivou-nos para a pesquisa do implante de traquéia, conservado na glicerina a 99 %, a fim de confirmar as seguintes qualidades necessárias a um substituto da via aérea: a ausência de rejeição aguda, que permite a revascularização da sua submucosa, e, por conseguinte, fornece o substrato para a reepitelização de sua luz; e a permanência da rigidez da sua parede, através da conservação da estrutura cartilaginosa da traquéia, o que evita a malacia.

2 OBJETIVOS

Investigar a possibilidade de um aloenxerto de traquéia, conservado na glicerina a 99 %, apresentar características como: revascularização da sua submucosa, biocompatibilidade e rigidez estrutural para resistir ao colapso inspiratório. Para isso, pesquisaremos os segmentos de traquéia implantados no omento maior canino durante 28 dias, pertencentes a um dos três grupos de pesquisa: aloenxerto (grupo aloenxerto), implante conservado na glicerina (grupo glicerina) e auto-enxerto (grupo auto-enxerto).

2. 1 *Objetivos Principais*

2. 1.1 Avaliar a eficiência da revascularização indireta do implante e do enxerto de traquéia através da:

- distribuição dos vasos funcionais pela sua submucosa;
- contagem do número de vasos corados na sua submucosa.

2. 1. 2 Verificar a presença de antigenicidade, descrevendo as alterações vasculares responsáveis pelo diagnóstico e prognóstico da rejeição nos implantes e nos enxertos de traquéia, compreendendo a (s):

- arterite aguda;
- arterite crônica.

2. 1. 3 Analisar a manutenção das propriedades da cartilagem do implante e do enxerto traqueal, observando-se a (s):

- resistência à deformação;
- características histológicas dos anéis cartilagosos.

2. 2 *Objetivos Secundários*

2. 2. 1 Quantificar a intensidade da infiltração pelas células mononucleares no implante e no enxerto de traquéia.

2. 2. 2 Verificar a regeneração ou a descamação do epitélio respiratório do implante e do enxerto de traquéia.

2. 2. 3 Descrever a presença de sinais que sugiram infecção da traquéia implantada, pela identificação de:

- exsudato leucocitário presente na sua luz;
- infiltração leucocitária do seu interstício.

2. 2. 4 Detalhar as características histológicas dos implantes de traquéia conservados em glicerina a 99 %.

2. 2. 5 Examinar os implantes e os enxertos de traquéia, macroscopicamente, em relação à (ao):

- obstrução da luz;
- conteúdo da luz;
- aderência ao omento maior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. Grillo HC, Dignan EF, Miura T. Extensive resection and reconstruction of mediastinal trachea without prosthesis or graft: an anatomical study in man. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1964;48:741-3.
2. Wanamaker JR, Eliachar L. An overview of treatment options for lower airway obstruction. *Otolaryngol Clin N Am* 1995;28:751-69.
3. Grillo HC. Tracheal replacement. *Ann Thorac Surg* 1990;49:864-5.
4. Grillo HC, Donahue DM, Mathisen DJ, Wain JC, Wright CD. Postintubation tracheal stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:486-93.
5. Forte V. O que mudou no tratamento dos tumores da traquéia nas últimas duas décadas. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço* 1987;11:11-22.
6. Mulliken JB, Grillo HC. The limits of tracheal resection with primary anastomosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968;55:418-21.
7. Montgomery WW. Supra hyoid release for tracheal anastomosis. *Arch Otolaryngol* 1974;99:255-60.
8. Cantrell JR, Folse JR. The repair of circumferencial defects of the trachea by direct anastomosis; experimental evaluation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1961;42:589-94.
9. Pinsker KL, Montefusco C, Kamhotz SL, Hagstrom JWC, Gliedman ML, Veith FJ. Improved bronchial anastomotic healing secondary to maintenance or restoration of brochial arterial circulation by microsurgical techniques. *Surg Forum* 1980;319:230-2.
10. Salassa JR, Pearson BW, Payne WS. Gross and microscopical blood supply of the trachea. *Ann Thorac Surg* 1977;24:100-7.
11. Macchiarini P. Tracheal transplantation: beyond the replacement of a simple conduit. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1998;14:621-3.
12. Li J, Xu P, Cben H. Successful tracheal autotransplantation with two-stage approach using the greater omentum. *Ann Thorac Surg* 1997;64:199-202.

13. Grillo HC. Slide tracheoplasty for long-segment congenital tracheal stenosis. *Ann Thorac Surg* 1994;58:613-9.
14. Strome M, Stein J, Esclamado R, Hicks D, Lorenz RR, Braun W, et al. Laryngeal transplantation and 40-month follow-up. *N Engl J Med* 2001;344:1676-79.
15. Belsey R. Resection and reconstruction in the intrathoracic trachea. *Br J Surg* 1950;38:220-5.
16. Jacobs JR. Investigations into tracheal prosthetic reconstruction. *Laryngoscope* 1988;98:1239-43.
17. Neville WE, Solanowski PJ, Kotia GG. Clinical experience with the silicone tracheal prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;99:604-13.
18. Björk VO, Rodriguez LE. Reconstruction of trachea and its bifurcation. *J Thorac Surg* 1957;35:596-603.
19. Otaviano AG, Evora PR, Barbieri Neto J, Carneiro JJ, Sader AA. Prótese traqueal - estudo experimental em cães. *Rev Col Bras Cir* 1983;10:46-53.
20. Grillo HC. Circunferencial resection and reconstruction of mediastinal and cervical trachea. *Ann Surg* 1965;162:374-88.
21. Eurides D, Ronchi CPH. Restauração da traquéia de cães com segmento livre de peritônio muscular: estudo experimental. *Acta Cir Bras* 1994;9:195-200.
22. Dias AR, Assumpção IF, Jatene FB, Leone EC, Barros MM, Jatene AD. Implante heterólogo de dura-máter na traquéia. Estudo experimental. *AMB Rev Assoc Med Bras* 1981;27:99-102.
23. Delaere PR, Ziyang L, Pauwels P, Feenstra L. Experimental revascularization of airway segments. *Laryngoscope* 1994;104:736-40.
24. Martinod E, Zegdi R, Zakine G, Aupeple B, Fornes P, D'Audiffret A, et al. A novel approach to tracheal replacement: The use of an aortic graft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:197-8.

25. Kato R, Onuki AS, Watanabe M, Hashizume T, Kawamura M, Kikuchi K, et al. Tracheal reconstruction by esophageal interposition: an experimental study. *Ann Thorac Surg* 1990;49:951-4.
26. Laemmel A. Revascularização de enxerto heterotópico de traquéia com um segmento pediculado de seromuscular do intestino delgado. Estudo em cães [Dissertação de Mestrado]. São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo; 1997.
27. Neville WE, Bolanoski PJP, Scoltazadeh H. Homograft replacement of the trachea using immunosuppression. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1976;72:596-601.
28. Morrison R. Remarks on some functions of the omentum. *Br Med J* 1906;1:76-9.
29. Levashev YN, Akopov AL, Mosin IV. The possibilities of greater omentum usage in thoracic surgery. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1999;15:465-8.
30. Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ferman A, Luk SK, Cooper JD. Successful revascularization of totally ischemic bronchial autografts with omental pedicle flaps in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;84:204-10.
31. Delaere PR, Ziyang L, Feenstra L. Traqueal autograft revascularization and transplantation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:1130-6.
32. Normando Júnior GR, Lima OA, Júdice LF, Cunha VBC, Epaminondas WA. Emprego de artéria mamária interna na proteção de auto-enxerto brônquico: estudo experimental em cães. *Rev Para Med* 1998;12:8-13.
33. Normando Júnior GR, Lima OA, Júdice LF, Cunha VBC, Epaminondas WA. Emprego de músculo intercostal na proteção de auto-enxerto brônquico: estudo experimental em cães. *Rev Para Med* 1998;12:21-6.
34. Mello-Filho FV. Neovascularização da traquéia: método de preparo de segmento completo de traquéia com retalho muscular do esterno-hióideo [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo; 1994

35. Rose KG, Sesterhenn K, Wustrow F. Tracheal allotransplantation in man. *Lancet* 1979;1:433.
36. Pando-Serrano, RR. Comparação de auto-enxertos de traquéia intratorácica com envolvimento prévio ou imediato com epíloon pediculado em cães [Tese de Doutorado]. São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo; 1995.
37. Nakanishi R, Shirakusa T, Mitsudomi T. Maximum length of tracheal autografts in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:1081-7.
38. Balderman SC, Weinblatt G. Tracheal autograft revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;94:434-41.
39. Li J, Xu PZ, Chen HY, Yang ZQ, Zhang QL. Improvement of tracheal autograft survival with transplantation into the greater omentum. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1592-6.
40. Maksoud Filho JG. Transplante experimental de traquéia: revascularização pela omentopexia e efeito da imunossupressão [Tese de Doutorado]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 1997.
41. Nakanishi R, Shirakusa T, Hanagiri T. Early histopatologic features of tracheal allotransplant rejection: a study in non-immunosuppressed dogs. *Transplant Proc* 1994;26:3715-8.
42. Borro JM, Chirivella M, Vila C, Galan G, Prieto M, Paris F. Successful revascularization of large isolated tracheal segments. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1992;6:621-3.
43. Murai K, Oizumi H, Masaoka T, Fujishima T, Abiko M, Shiono S, et al. Removal of cartilage rings of graft and omentopexy for extended tracheal autotransplantation. *Ann Thorac Surg* 1996;50:102-5.
44. Ueda M, Yokomise H, Wada H, Hitomi S. Experimental tracheal transplantation for possible clinical application. *Transplant Proc* 1997;29:871-3.
45. Sung SW, Won T. Effects of basic fibroblast growth factor on early revascularization and epithelial regeneration in rabbit tracheal orthotopic transplantation. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1998;14:621-3.

46. Delaere PR, Poorten VV, Vanclooster C, Goeleven A, Hermans R. Results of larynx preservation surgery for advanced laryngeal cancer through tracheal autotransplantation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;126:1207-14.
47. Lenot B, Macchiarini P, Darteville P. Traqueal transplantation: experimental technique with revascularization and venous drainage. *Transpl Proc* 1995;27:1684-5.
48. Macchiarini P, Lenot B, Montpreville V, Dulmet E, Mazmanian GM, Fattal M, et al. Heterotopic pig model for direct revascularization and venous drainage of tracheal allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:1066-75.
49. Macedo A, Fadel E, Mazmanian GM, Montpréville V, German-Fattal M, Mussot S, et al. Heterotopic en bloc tracheobronchial transplantation with direct revascularization in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. In press 2002.
50. Liu Y, Nakamura T, Shimizu Y, Ueda H, Yoshitani M, Toba T, et al. Tracheal allotransplantation in beagle dogs without immunosuppressants. *Ann Thorac Surg* 2001;72:1190-4.
51. Demetris AJ, Duquesnoy RJ, Fung JJ, Murase N, Nalesnik M, Randhawa P, et al. Pathophysiology of chronic allograft rejection. 29 March 2000. <http://transplantation.medscape.com/Medscape/transplantation/ClinicalMgmt/CM.v02/public/index.CM.v02.html> (10 Aug 2000).
52. Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999;55:713-23.
53. Yokomise H, Inui K, Wada H, Goh T, Yagi K, Hitomi S, et al. High-dose irradiation prevents rejection of canine tracheal allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:1391-7.
54. Bujia J, Wilmes E, Hammer C, Kastenbauer E. Tracheal transplantation: demonstration of HLA class II subregion gene products on human trachea. *Acta Otolaryngol* 1990;110:149-54.
55. Liu Y, Nakamura T, Yamamoto Y, Matsumoto K, Sekine T, Ueda H, et al. Immunosuppressant-free allotransplantation of the trachea: the antigenicity of tracheal grafts

can be reduced by removing the epithelium and mixed glands from the grafts by detergent treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:108-14.

56. Ilberg CV. Reconstruction chirurgicale de la trachée par homogreffe de trachée conservée dans du cialit. *Ann Oto Laryngol* 1982;99:505-8.

57. Kushibe K, Nezu K, Nishizaki K, Takahama M, Taniguchi S. Tracheal allotransplantation maintaining cartilage viability with long-term cryopreserved allografts. *Ann Thorac Surg* 2001;71:1666-9.

58. Lane BP, Habicht GS, Jasper GS. Lymphocyte-epitelium interaction during rejection of nonisogeneic rat tracheal grafts. *Am J Pathol* 1977;186:71-7.

59. Delaere P.R., Ziyang L., Hermans R., Sciot R., Feenstra L. Experimental Tracheal Allograft Revascularization and Transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:728-37.

60. Montovani JC, Prado RG, Bacchi CE. Transplante de traquéia. Estudo experimental em cobaias. *Rev Paul Med* 1987;105:112-5.

61. Yokomise H, Inui K, Wada H, Hasegawa S, Ohno N, Hitomi S. Long-term cryopreservation can prevent rejection of canine tracheal allografts with preservation of graft viability. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:930-4.

62. Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, Andou A, Date H, Moriyama S. Origin of regenerated epithelium in cryopreserved tracheal allotransplantation. *Ann Thorac Surg* 1998;66:205-8.

63. Tojo T, Kitamura S, Gojo S, Kushibe K, Nezu K, Taniguchi S. Epithelial regeneration and preservation of tracheal cartilage after tracheal replacement with cryopreserved allograft in the rat. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116: 624-27.

64. Maddox E, Zhan M, Mundy GR, Drohan WN, Burgess WH. Optimizing human demineralized bone matrix for clinical application. *Tissue Eng* 2000;6:441-8.

65. Marrangoni AG. Homotransplantation of tracheal segments preserved by lyophilization. An experimental study. *J Thorac Surg* 1950;21:398-401.

66. Keshishian J, Blades B, Beattie Jr. EJ. Tracheal reconstruction. *J Thorac Surg* 1956;32:707-27.
67. Pinto MA. Bioprótese traqueal - estudo experimental em cães [Dissertação de Mestrado]. Santa Maria (RS). Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria; 1991.
68. Jacobs JP, Quintessenza JA, Andrews T, Burke RP, Spektor Z, Delius RE, et al. Tracheal allograft reconstruction: the total North American and worldwide pediatric experiences. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1043-52.
69. Kirklin JK, Smith D, Novick W, Naftel DC, Kirklin JW, Pacifico AD, et al. Long term function of cryopreserved aortic homografts: a ten-year study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:154-66.
70. Deschamps C, Trastek VF, Ferguson JI, Martin WJ, Colby TV, Pairolero PC, et al. Cryopreservation of canine trachea: functional and histological changes. *Ann Thorac Surg* 1989;47:208-12.
71. Kunachak S, Kulapaditharom B, Vajaradul Y, Rochanawutanon M. Cryopreserved, irradiated tracheal homograft transplantation for laryngotracheal reconstruction in human beings. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:911-6.
72. Moriyama H, Sasajima T, Hirata S, Yamazaki K, Yatsuyanagi E, Kubo Y. Revascularization of canine cryopreserved tracheal allografts. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1701-6.
73. Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, Yasumoto K. Effect of cryopreservation period on rat tracheal allografts. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:1010-5.
74. Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H. Maximal period of cryopreservation with the Bicell biofreezing vessel for rat trachealisografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:1070-6.

75. Pigossi N, Raia A, Lex A, Gama AH, Simonsen O, Haddad J, et al. Estudo experimental e clínico sobre o emprego, como implante, da dura-máter homogênea conservada em glicerina a temperatura ambiente. *Ver Ass Med Brasil* 1971;17:263-78.

76. Lenot B. De la greffe de trachee conservee a la transplantation tracheale: etude d'un modele experimental [Diplome D'Etudes Approfondies]. Paris (IF): Universite de Franche Comte de Besancon. Universite de Bourgogne; 1992.

77. Gabrielli MFR. Transplante autógeno de cartilagem hialina de costela, conservada em glicerina, para o processo malar de ratos: estudo histológico [Tese de Doutorado]. São Paulo (SP): Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista; 1985.

78. Honadel TE, Killian GJ. Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol. *Cryobiology* 1988;25:331-7.

79. Mabrut JY, Adham M, Bourgeot JP, Eljaafari A, DelaRoche E, Ducerf C, et al. Mechanical and histological characteristics of human trachea before and after cryopreservation: an opportunity for tracheal tissue banking. *Transplant Proc* 2001;33:609-11.

RESUMO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Objetivos: Avaliar o aloenxerto traqueal canino conservado na glicerina em relação à antigenicidade, à malacia e à revascularização.

Metodologia: segmentos de traquéia cervical com seis anéis cartilagosos (2,4 cm a 3,1 cm) foram distribuídos aleatoriamente entre três grupos de estudo: auto-enxerto (n = 21), aloenxerto (n = 18) e glicerina (implantes conservados na glicerina a 99 %; n = 22). Implantamos dois desses segmentos traqueais, um de cada grupo, no omento maior de cães e, após 28 dias, injetamos o látex na aorta canina, antes da coleta dos segmentos. Analisamos esses implantes traqueais em relação ao número de setores com vasos funcionais, ao número de vasos na submucosa preenchidos com látex, ao escore de arterite aguda, à incidência de rejeição aguda, ao escore de lesão cartilaginosa e ao teste de resistência à deformação (malacia).

Resultados: O grupo auto-enxerto demonstrou uma maior média de vasos corados do que o grupo glicerina ($p = 0,029$). Também o grupo auto-enxerto mostrou uma maior média de setores com vasos funcionais do que os grupos aloenxerto ($p = 0,013$) e glicerina ($p = 0,005$). O grupo aloenxerto apresentou uma maior média do escore de arterite aguda que o grupo auto-enxerto ($p = 0,001$) e mais rejeição aguda que o grupo glicerina ($p = 0,039$). Não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao escore de lesão cartilaginosa. Nenhum segmento traqueal demonstrou malacia.

Conclusão. o implante de traquéia glicerinado apresentou baixa antigenicidade, rigidez da parede, porém mostrou uma revascularização incompleta.

palavras-chave

transplante traqueal, revascularização, rejeição

3 INTRODUÇÃO

A traqueoplastia é o tratamento cirúrgico mais utilizado nas doenças traqueais benignas ou malignas⁽¹⁾. Ela compreende a ressecção circunferencial com posterior reconstrução mediante a anastomose término-terminal. Contudo, a reconstrução de defeitos circunferenciais maiores de 60 % da traquéia ainda é um problema sem solução definitiva.

O substituto ideal da traquéia para ser empregado na reconstrução de ressecções extensas na via aérea, deve possuir rigidez, a fim de evitar a malacia, e aporte sanguíneo adequado, para permitir o revestimento do segmento traqueal pelo epitélio respiratório, sem estimular a reação imunológica⁽²⁻³⁾. A utilização de próteses e de tecidos autógenos para a substituição traqueal apresentam resultados contraditórios e difíceis de reproduzir⁽²⁾.

Pesquisas iniciais de Vacanti et al.⁽⁴⁾, utilizando a engenharia de tecidos, conseguiram criar uma estrutura equivalente aos anéis cartilagosos a partir de uma suspensão contendo condrócitos e de um polímero sintético biodegradável.

O melhor substituto da traquéia, pelos critérios fisiológico e anatômico, seria o seu próprio aloenxerto, pois apresentaria a estrutura semi-rígida necessária e poderia mais facilmente servir de substrato para os fenômenos consecutivos de revascularização e de reepitelização, permitindo a atividade ciliar na mucosa respiratória regenerada e evitando a estase de secreções⁽⁵⁾.

Em um serviço de referência em cirurgia torácica⁽²⁾, o número de pacientes com indicação de transplante traqueal é de um até dois casos por ano. A maioria dos pacientes já transplantados, possuía estenoses congênita ou pela intubação prolongada, tratadas anteriormente e sem sucesso com cirurgia⁽⁶⁻⁹⁾. Os pacientes portadores de policondrite recorrente, de Wegener, de traqueobroncopatia osteocondróplástica e de neoplasias de baixo grau de malignidade são outras doenças menos freqüentes, cujo os pacientes poderiam se beneficiar do transplante⁽³⁾.

O aloenxerto traqueal representa o transplante de um órgão não essencial, o que significa o início de uma nova era, individualizada pelo destaque concedido à qualidade de vida⁽⁹⁾.

A aplicabilidade clínica rotineira dos transplantes de traquéia, entretanto, passa necessariamente pela solução de três problemas: a revascularização, a rejeição e a conservação dos enxertos^(5, 10).

A isquemia do enxerto traqueal é a principal causa de fracasso dos transplantes^(8, 11). Assim, é necessária a revascularização desse enxerto, através dos retalhos de omento maior⁽⁵⁾, de fáscia torácica lateral⁽¹²⁾, de músculo⁽⁸⁾ ou das anastomoses vasculares imediatas do bloco de transplante cervicotorácico⁽¹³⁾.

A arterite caracteriza a rejeição aguda da traquéia, resultando na trombose da microcirculação ao nível da submucosa e, conseqüentemente, em necrose isquêmica do epitélio respiratório, do interstício e, por último, da cartilagem⁽¹⁴⁻¹⁵⁾.

No entanto, o aloenxerto traqueal produz um estímulo antigênico menor se comparado a outros órgãos sólidos⁽¹⁶⁾. Essa reação imunológica mais branda relaciona-se principalmente à ausência da circulação precoce de sangue do receptor no aloenxerto, dificultando o reconhecimento antigênico, uma vez que o suprimento sangüíneo só aparece após quatro dias⁽¹⁵⁾ da implantação, quando iniciam as microanastomoses vasculares entre o omento maior, ou outro carreador vascular, e o enxerto⁽¹⁶⁾.

A descamação do epitélio respiratório, no qual se encontra o Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II, assim como a degeneração dos condrócitos no aloenxerto de traquéia, são efeitos dos métodos de conservação, que reduzem a antigenicidade traqueal⁽¹⁷⁻¹⁸⁾. Assim, além de reduzir o estímulo alogênico, outra propriedade importante para esses métodos é permitir a manutenção da estrutura do tecido a fim de constituir um banco de traquéias^(17, 19-20).

A criopreservação da traquéia é o método de conservação mais estudado^(17, 19-20). Porém, as divergências em relação ao seu efeito sobre a rejeição crônica, à variabilidade do

tempo limite de criopreservação, que oscila entre 3 meses e 24 meses, e à vitalidade dos condrócitos suscitam dúvidas sobre a utilidade desse meio de conservação a longo prazo.

Por isso, surgiu a necessidade da pesquisa de um outro meio de conservação que possuísse fácil aplicabilidade e tempo ilimitado de armazenamento do segmento traqueal. Esse fato nos estimulou para a pesquisa da utilização da glicerina, um triálcool de fácil aquisição e manipulação, com propriedades antissépticas e conservantes⁽²¹⁾.

Testou-se a capacidade conservante da glicerina em vários tecidos, salientando-se os trabalhos com a dura-máter⁽²¹⁾ e a traquéia⁽²²⁾. Esses trabalhos mostraram as qualidades da glicerina em reduzir a resposta antigênica e manter a estrutura dos tecidos.

Baseamo-nos nesses resultados e conceitos para formular a seguinte hipótese: 1) o segmento traqueal conservado em glicerina a 99 %, implantado no omento maior de cães, apresentaria uma revascularização semelhante ao auto-enxerto, mantendo a estrutura rígida e, conseqüentemente, a luz da traquéia; 2) haveria uma melhor tolerância imunológica do que o aloenxerto.

Para tanto, adaptamos o método de conservação na glicerina de Pigossi et al.⁽²¹⁾ para a traquéia, modificamos a técnica experimental do seu implante no omento maior e avaliamos a revascularização da submucosa a partir da injeção de corante microvascular, conforme Nakanishi et al.⁽²³⁾, para comparar o implante glicerinado ao aloenxerto e ao auto-enxerto traqueais, testando as hipóteses acima formuladas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa experimental, randomizada, cega e controlada foi desenvolvida no Hospital de Clínica Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sessenta e um segmentos traqueais caninos, com seis anéis cartilagosos, constituíram a amostra desta pesquisa e formaram os seguintes grupos de estudo:

Auto-enxerto (n = 21);

Aloenxerto (n = 18);

Glicerina (n = 22).

Estes segmentos traqueais originaram de 51 cães mestiços, adultos, de ambos os sexos, com adequado controle sanitário, fornecidos pelo Canil do Centro de Zoonoses da Secretaria Municipal da Saúde de Porto Alegre. Os animais pesaram entre 6,5 Kg a 12 Kg (o peso médio dos cães foi de $9,497 \pm 1,975$ Kg, não existindo diferença estatística entre os três grupos, com $p = 0,915$) e foram designados, aleatoriamente, a um dos seguintes destinos (Fig. 1):

(A) 21 cães, como doadores dos auto-enxertos; além de receptor do auto-enxerto (grupo auto-enxerto), cada animal recebeu um aloenxerto, ou um implante conservado na glicerina;

(B) 20 cães, como doadores dos aloenxertos (para os grupos aloenxerto e glicerina);

(C) 10 cães, como receptores; cada animal recebeu um aloenxerto e um implante conservado na glicerina.

Alojamos e manipulamos os cães de acordo com a Resolução Normativa número 196/96 do Conselho Nacional de Saúde⁽²⁴⁾ e Raymundo⁽²⁵⁾. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Pesquisa e de Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e protocolada sob número 99411.

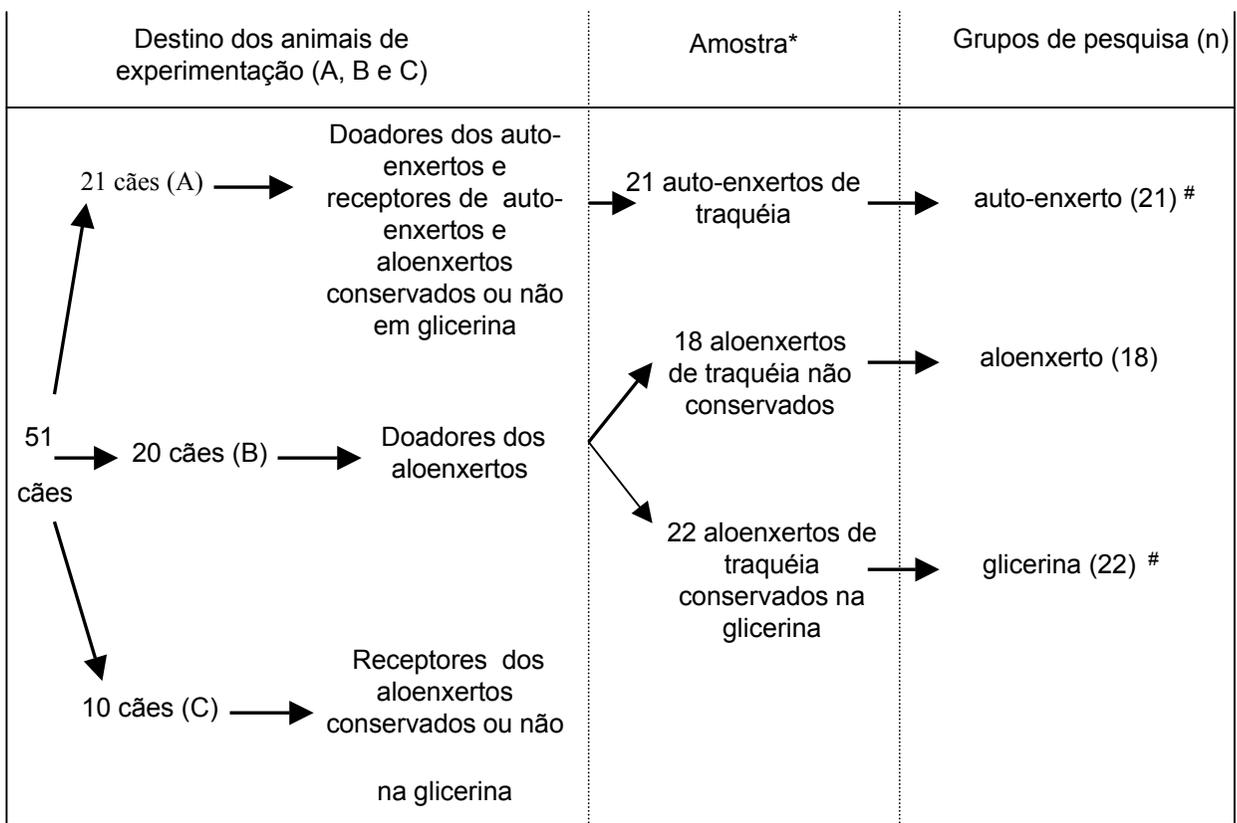


Fig. 1. Origem da amostra e dos grupos de pesquisa (auto-enxerto, aloenxerto e glicerina) a partir dos 51 cães.

Um cão com implantação dos grupos auto-enxerto e glicerina morreu, por isso não incluímos esses dois segmentos de traquéia na análise dos resultados.

* Segmentos de traquéia constituídos por seis anéis cartilagosos.

4. 1 *Protocolo experimental.* Os animais foram pré-medicados com sulfato de atropina SC (0,044 mg/Kg), acepromazina IM (0,2 mg/Kg) e anestesiados com tiopental sódico IV (15 mg/Kg). Após a intubação orotraqueal com tubo 7 mm (Rüschelit[®], Rüsch, Montevideo, Uruguai) mantivemos a anestesia pelo uso do halotano IN (0,5 % a 1 %) com o cão respirando espontaneamente uma mistura de ar ambiente e oxigênio (3 L/min). A adequação da ventilação e da oxigenação era aferida por oximetria de pulso. Um acesso vascular periférico era obtido mediante punção venosa com cateter 20 G (Jelco[®], Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil).

Exceto os animais do destino B, todos receberam ampicilina IV (20 mg/Kg) durante a indução anestésica. Não houve emprego de qualquer droga imunossupressora.

4. 2 *Coleta dos aloenxertos.* Nos 20 cães doadores de aloenxertos (destino B) realizamos uma incisão cervical na linha média após a eutanásia, mediante sobredose de tiopental sódico IV (100 mg/Kg). Empregando técnica asséptica, dissecamos e excisamos a traquéia cervical. Cada traquéia originou dois segmentos que possuíam seis anéis cartilagosos, isto é, 2,4 cm a 3,1 cm de comprimento^(5, 11). Após a ressecção de suas adventícias (Fig. 2), colocamos 18 desses segmentos traqueais em solução fisiológica a 0,9% até sua implantação no omento maior (*grupo aloenxerto*). Outros 22 segmentos traqueais foram incluídos em frascos de vidro, herméticamente fechados, contendo glicerina bi-destilada a 99 % (*grupo glicerina*) (Fig. 3).

Mantivemos os segmentos traqueais do grupo glicerina estocados durante no mínimo dois meses e no máximo seis meses, em temperatura ambiente⁽²¹⁾. No momento de seu uso, esses implantes glicerizados foram reidratados com solução fisiológica a 0,9 % durante 30 min antes da sua implantação no omento maior (Fig. 3).

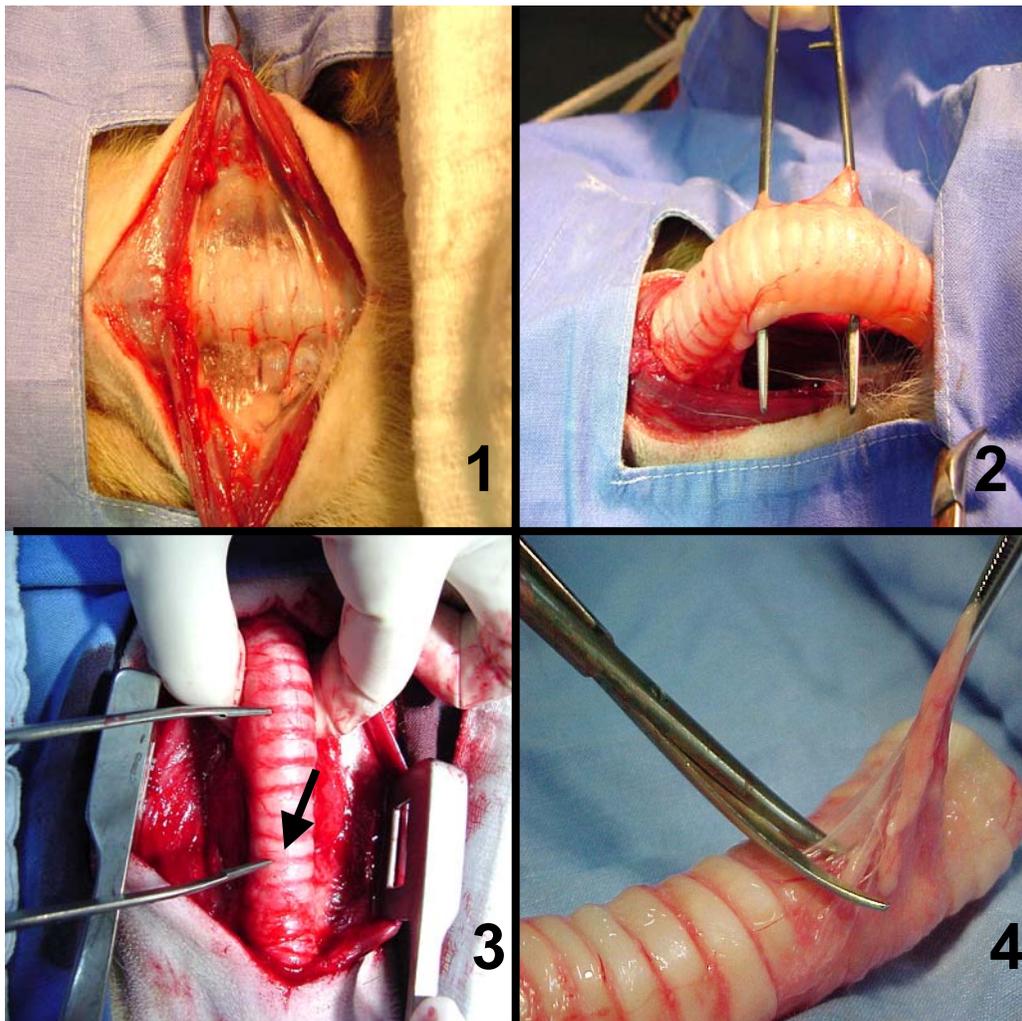


Fig. 2. Fotos da coleta dos segmentos traqueais. Foto 1, exposição do segmento traqueal a ser coletado. Foto 2, dissecação da parede posterior da traquéia, afastando-a de sua posição próxima ao esôfago. Foto 3, segmento traqueal, com seis anéis cartilagosos, que será coletado como auto-enxerto. Quinta cartilagem apontada na seta. Foto 4, dissecação e ressecção da adventícia traqueal durante a preparação do implante que será conservado na glicerina.

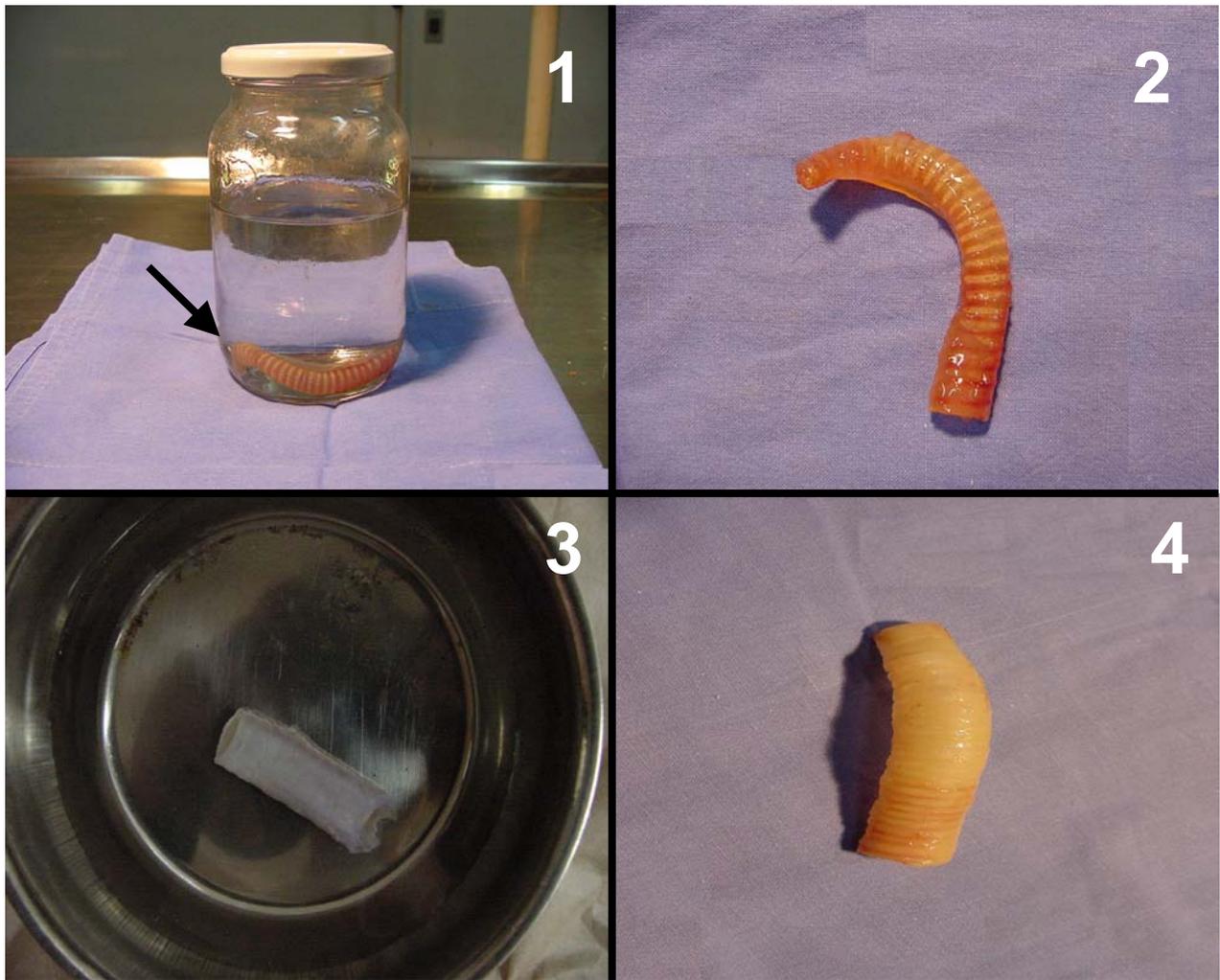


Fig. 3. Fotos do armazenamento e da hidratação da traquéia glicerinada. Foto 1, traquéia (seta) imersa na glicerina a 99 %, e armazenada em temperatura ambiente no frasco de vidro hermeticamente fechado. Foto 2, traquéia glicerinada antes da hidratação. Foto 3, traquéia glicerinada mergulhada no soro fisiológico para hidratação, numa cuba metálica. Foto 4, traquéia glicerinada após a hidratação.

4. 3 *Coleta dos auto-enxertos.* Nos 21 cães doadores dos auto-enxertos e receptores de aloenxertos ou de implantes glicerinados, repetimos a mesma abordagem cervical dos animais anteriores. Nesses cães, a reconstrução imediata da via aérea seguiu os passos semelhantes àqueles realizados na prática clínica da traqueoplastia (resseção circunferencial e anastomose término-terminal mediante sutura contínua com fio de poliglactina 3-0 da Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) (Fig. 4). Suturamos a camada muscular cervical com fio poliglactina 3-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) e a pele com nylon 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil).

No mesmo tempo cirúrgico, procederam-se, nesses animais, às implantações no omento maior, de um auto-enxerto (grupo auto-enxerto) e de um aloenxerto (grupo aloenxerto), ou de um implante do grupo glicerina.

4. 4 *Implantação no omento maior.* Foi realizada em 31 cães, sendo 21 do destino A e 10 do destino C. Após a laparotomia mediana supra-umbilical de 10 cm, mobilizamos o omento maior para fora da cavidade peritoneal. Cada um dos dois segmentos de traquéia foi envolvido com o omento maior e fixado, com alguns pontos de fio de poliglactina 3-0, a 2 cm da grande curvatura gástrica e separado do outro implante ou enxerto por no mínimo 10 cm (Fig. 5). Suturamos a camada muscular da laparotomia com fio de poliglactina 0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) e a pele com fio de nylon 4-0.

Nesses 31 cães, a implantação aleatória dos 61 segmentos de traquéia formou três combinações entre os grupos de pesquisa (Tabela 1).

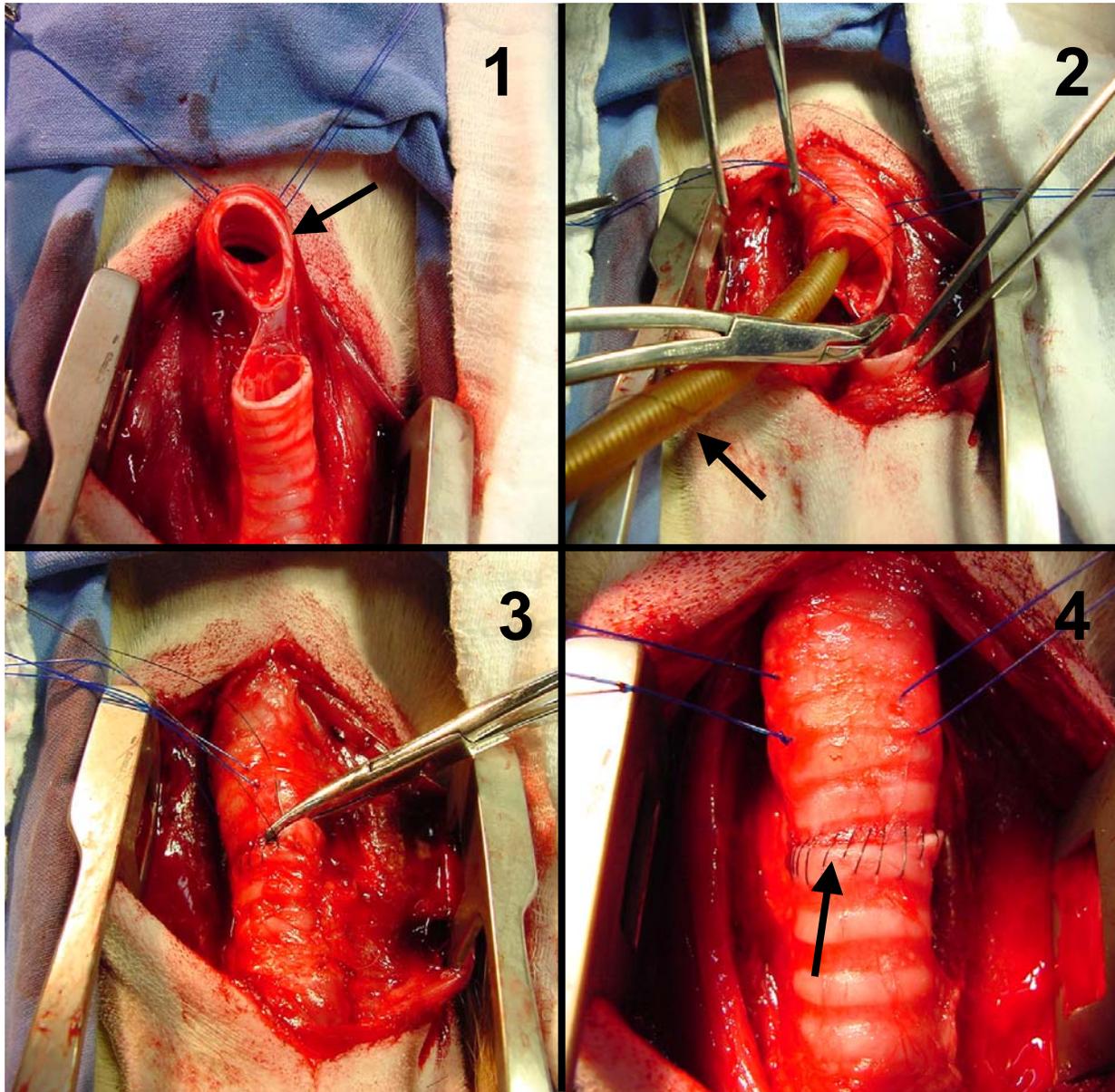


Fig. 4. Fotos da coleta do auto-enxerto e da traqueoplastia. Foto 1, incisão da traquéia no 10° anel cartilaginoso (seta). Foto 2, após a retirada do auto-enxerto com seis anéis cartilagosos, suturou-se inicialmente a parede posterior da traquéia, ventilando o cão, pelo campo operatório, com um tubo aramado (seta) na luz inferior do defeito traqueal. Foto 3, sutura da parede anterior da traquéia. Foto 4, anastomose término-terminal finalizada (seta).

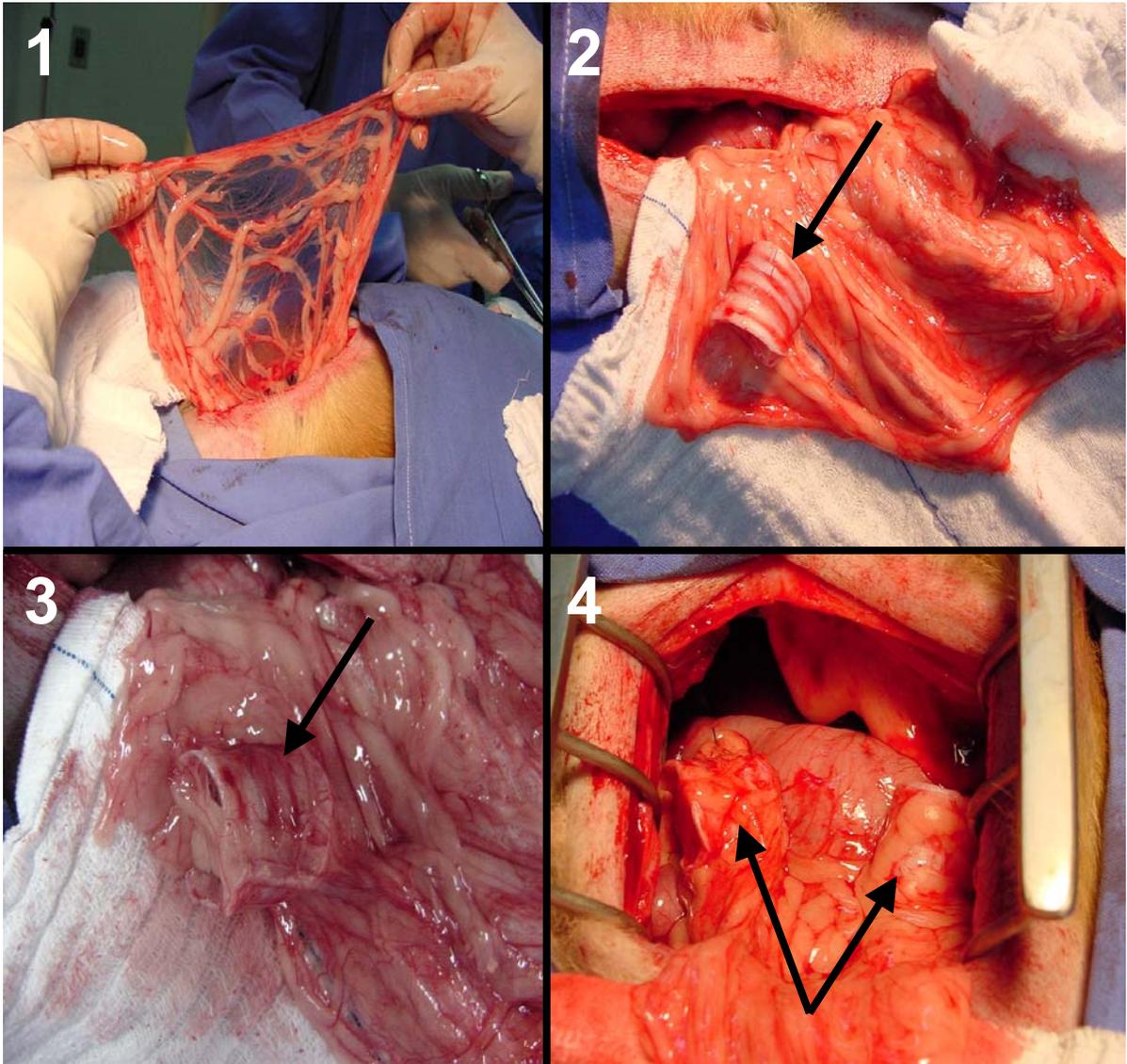


Fig. 5. Fotos das implantações dos segmentos traqueais (setas) no omento maior. Foto 1, omento maior mobilizado da cavidade peritoneal através da laparotomia. Foto 2, segmento traqueal pronto para ser envolvido pelo omento maior. Foto 3, segmento traqueal já implantado no omento maior. Foto 4, dois segmentos traqueais de grupos diferentes envolvidos pelo omento maior.

Tabela 1. Número total de cães com uma das três combinações de dois segmentos distintos de traquéia, provenientes dos grupos de pesquisa (auto-enxerto, aloenxerto e glicerina).

Destino dos cães	Combinação entre os grupos de pesquisa [@]		
	auto-enxerto+glicerina	auto-enxerto+aloenxerto	aloenxerto+glicerina
cães receptores (destino C)	-	-	9*
cães doadores e receptores (destino A)	12 [#]	9	-

* Não incluímos o cão que recebeu a implantação de apenas um segmento de traquéia do grupo glicerina.

[#] Um cão com essa combinação foi ao óbito, não sendo incluído nos resultados.

[@] Não houve diferença estatística do número de cães entre as três combinações ($p = 0,741$).

4. 5 Injeção do látex. Somente os últimos 34 segmentos de traquéia (17 animais) foram perfundidos com látex no 28° dia de implantação (excluímos os animais anteriores pela ausência do controle da pressão de perfusão). A massa de injeção empregada foi o látex⁽²⁶⁾ (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), na proporção de 100 mL para cada 50 mL de corante verde (Suviniil[®], São Bernardo do Campo, SP, Brasil), diluída a 50 % em solução fisiológica a 0,9 %. Escolhemos o látex, pois ele tem a mesma capacidade que o corante de silicone (Microfil[®])^(12, 15) para atingir os vasos na submucosa traqueal⁽²⁶⁾.

A técnica de injeção do látex contou com as seguintes etapas (Fig. 6): 1) anticoagulação com heparina sódica IV (300 U/Kg), dissecação e clampeamento da aorta torácica e infra-renal; 2) punção da aorta acima do tronco celíaco com cateter intravenoso (Jelco[®], Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) com 2,1 mm de diâmetro externo; 3) e injeção de 250 mL de soro fisiológico a 37 °C, seguida da infusão de 45 mL do látex sob pressão controlada de 150 mmHg.

4. 6 Coleta dos implantes e dos enxertos no omento maior. Após 28 dias de pós-operatório, anestesiámos novamente os animais dos destinos A e C com o protocolo já citado acima, colocamo-los em posição supina e intubamos os animais por via orotraqueal.

Depois da reabertura da laparotomia, complementada por uma nova incisão subcostal esquerda, fizemos a revisão da cavidade peritoneal e retiramos os segmentos traqueais implantados juntamente com a pequena porção de omento maior aderido. Após a realização do teste da resistência à deformação e da macroscopia, fixamos os segmentos traqueais em solução de formalina a 10 %.

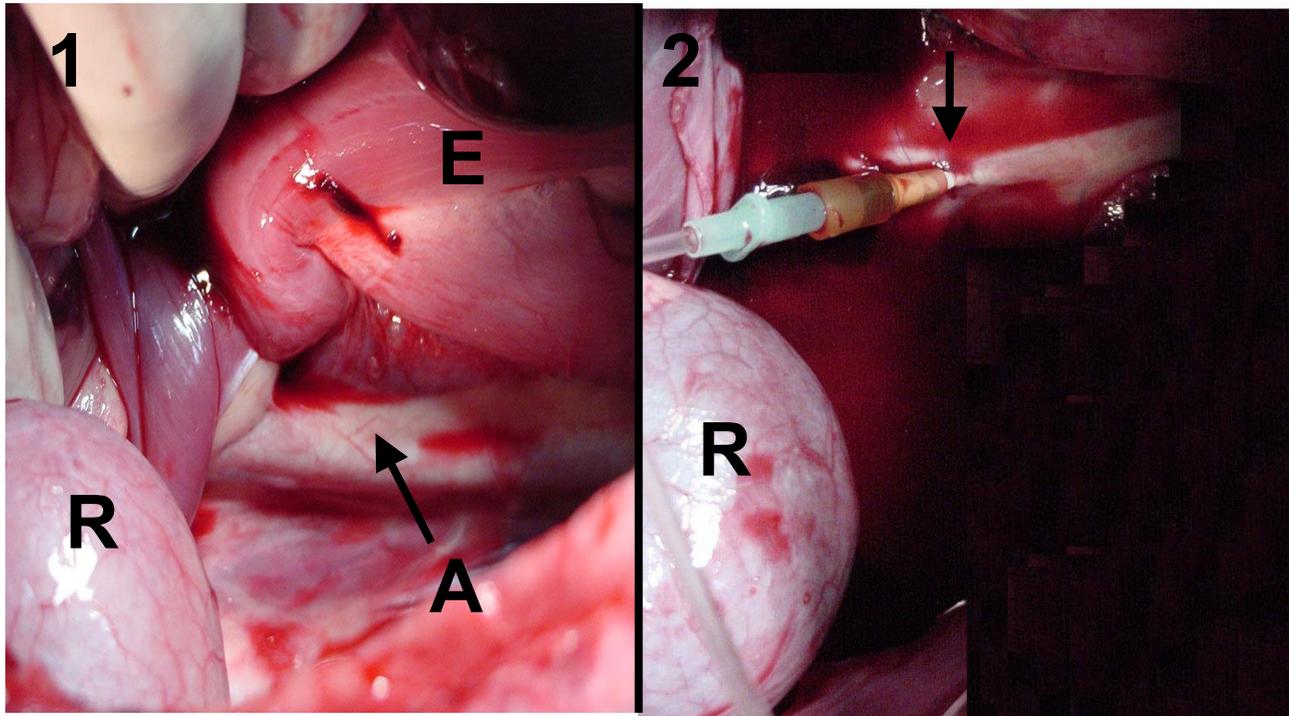


Fig. 6. Fotos do procedimento de infusão do látex pela aorta, antes da coleta dos segmentos traqueais no omento maior. Foto 1, dissecação do retroperitônio para identificação do segmento da aorta abdominal acima do tronco arterial celíaco (E = estômago, A = aorta, R = rim direito). Foto 2, punção da aorta (seta) para infusão do látex.

4. 7 *Macroscopia*. Após a revisão da cavidade peritoneal, verificamos no segmento traqueal se havia no mínimo 60 % da luz^(16-17, 23), assim como seu conteúdo, a consistência da cartilagem e a aderência ao omento maior.

4. 8 *Teste da resistência à deformação (Malacia)*. Modificamos a técnica descrita por Vacanti et al.⁽⁴⁾ para testar a resistência ao colapso dos últimos sete segmentos traqueais (um auto-enxerto, três aloenxertos e três implantes glicerizados). Um segmento, seccionado transversalmente de cada segmento traqueal, com 0,5 cm de comprimento, foi colocado no interior de um condom (Jontex[®], Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). A seguir, passamos um cateter de aspiração traqueal número 16 (Markmed, São Paulo, SP, Brasil) multiperfurado por dentro do condom e da luz do segmento traqueal e, através de uma seringa de 60 mL (Becton, Dickinson e Co, Franklin Lakes, NJ, USA) conectada ao cateter, desenvolvemos a pressão de - 200 mmHg (Fig. 7). Consideramos que só há malacia quando a parede traqueal colapsou durante a pressão negativa.

4. 9 *Análise histológica*. Após a secção transversal das peças de traquéia na sua porção média, os fragmentos resultantes foram incluídos em parafina e cortados com 5 µm de espessura, sendo corados pela hematoxilina-eosina. Para o estudo com o microscópio óptico, utilizamos objetivas de 4 X, 10 X e 40 X.

Revascularização indireta. Na submucosa traqueal, foram contados o número de vasos corados com látex. Quantificamos também a revascularização circunferencial da submucosa, dividindo a área de secção transversal da traquéia em quatro setores⁽¹²⁾ (Fig. 8), e valorizamos apenas os vasos funcionais (independente do preenchimento com látex), ou seja, endotélio com células nucleadas e ausência de trombos. Assim, os valores deste último parâmetro variaram de 0 a 4 setores (submucosa) com vasos funcionais.

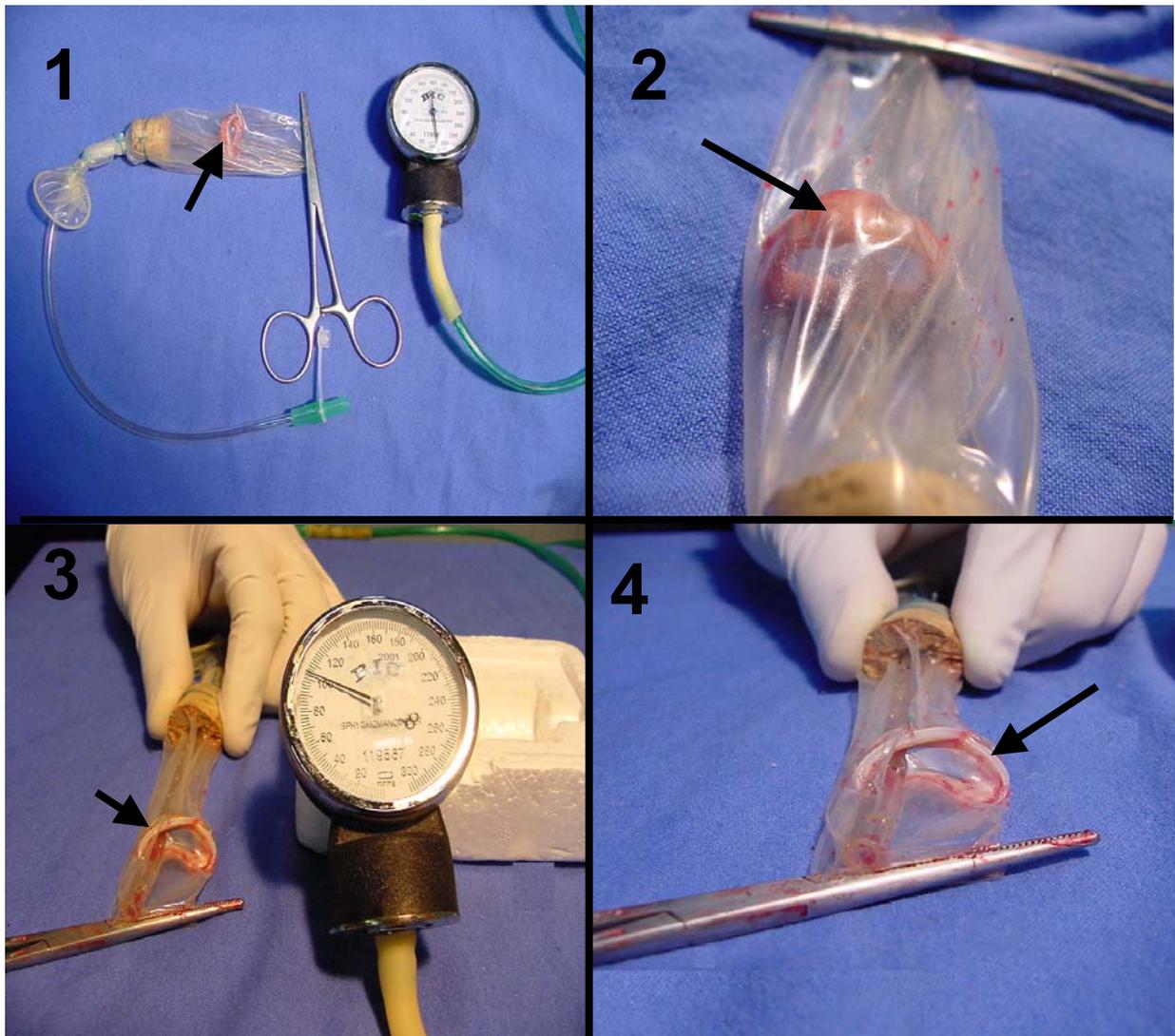


Fig. 7. Fotos do teste da resistência à deformação (malacia) dos segmentos traqueais. Setas indicam o segmento traqueal com 0,5 cm de comprimento. Fotos 1 e 2, utilizamos um manômetro aerógeno conectado a um cateter multiperfurado que passou através da luz do segmento traqueal, presente no interior de um preservativo vedado, no qual foi desenvolvido a pressão negativa de 200 mmHg. Fotos 3 e 4, o manômetro mostra a pressão negativa no interior colabado do preservativo, enquanto que o segmento traqueal manteve a sua luz, ou seja, não apresentou malacia.

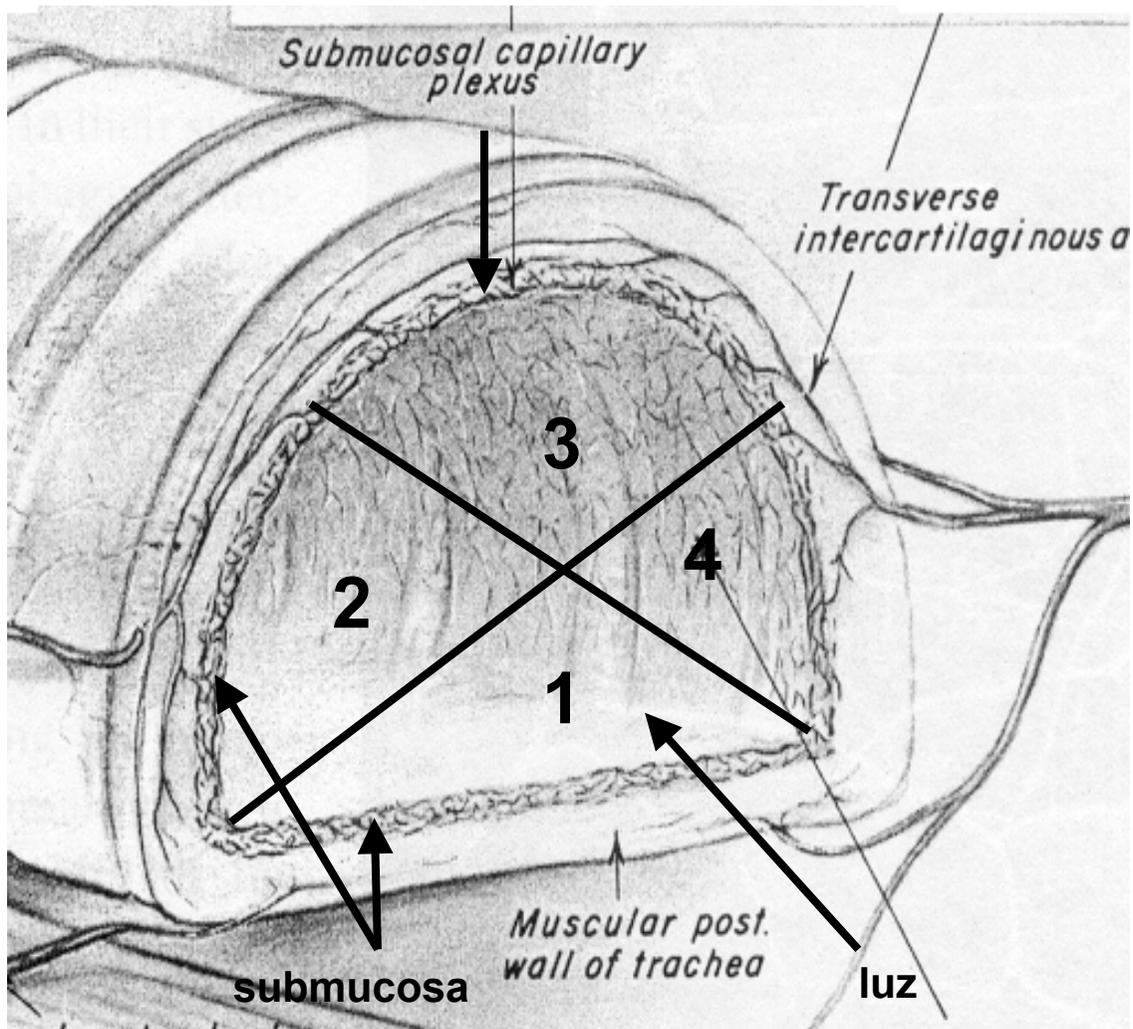


Fig. 8. Desenho do corte transversal da traquéia, dividida em quatro quadrantes, a fim de quantificar a revascularização circunferencial e o infiltrado mononuclear (desenho extraído de Salassa JR, Pearson BW, Payne S. Gross and microscopical blood supply of the trachea. Ann Thorac Surg 1977;24:100-7).

Excluimos da avaliação de revascularização indireta os segmentos de traquéia que, aos cortes histológicos, apresentavam desestruturação da mucosa, da submucosa, da cartilagem e da adventícia, impedindo a correta localização dos vasos.

Rejeição. O padrão de rejeição vascular da traquéia é semelhante àquele demonstrado por outros órgãos sólidos, como o rim e o coração^(14, 27). Assim, decidimos utilizar os critérios de Banff 97⁽²⁸⁾, aplicados no estudo da rejeição renal, para definir a presença e quantificar a intensidade das arterites aguda e crônica nas traquéias implantadas. A rejeição aguda vascular foi definida pela presença de arterite aguda em pelo menos um vaso do segmento traqueal examinado, na medida em que a sua identificação é reveladora de reação imunológica contra o enxerto⁽²⁸⁾.

A arterite aguda foi quantificada de acordo com a lesão vascular de maior intensidade, presente em pelo menos uma artéria no corte histológico examinado. Os valores relacionados às intensidades das lesões arteriais foram distribuídos segundo o escore de arterite aguda: 0, ausência de arterite (v0); 1, arterite intimal leve-moderada definida pela permeação da íntima por linfócitos (v1); 2, arterite intimal grave, verificada pela oclusão de no mínimo 25 % da luz da artéria por células mononucleares (v2); 3, arterite transmural, demonstrada pela perda da arquitetura vascular e pela necrose do endotélio e da camada média muscular, associada à infiltração da parede vascular por células mononucleares, polimorfonucleares, com alterações fibrinóides (v3). Além disso, avaliamos a relação entre a revascularização indireta (número de setores com vasos funcionais e o número de vasos corados na submucosa) e o escore de arterite aguda.

A presença de arterite crônica (cv) também foi valorizada. Os critérios empregados para definir a lesão vascular como crônica foram: espessamento fibroso da íntima arterial com delaminação ou descontinuidade da membrana elástica interna; e/ou presença de células espumosas e/ou mononucleares na íntima fibrosada, presente em pelo menos um vaso no corte histológico examinado.

Como a rejeição aguda está associada a infiltração de células mononucleares em pelo menos 26 % da área examinada do enxerto⁽²⁸⁾, dividimos o corte transversal do

segmento traqueal em quatro setores (Fig. 8) e examinamos a presença dessas células na adventícia traqueal, mediante o escore da infiltração de mononucleares: 0 para infiltração de mononucleares em até 25 % da área examinada, ou seja inflamação leve (um setor); 1 para infiltração de mononucleares em até 50 % da área examinada, ou inflamação moderada (dois setores); e o 2 para infiltração intensa dessas células, quando presentes em mais de 50 % da área examinada (três a quatro setores)^(14, 17, 28).

Escore de lesão cartilaginosa. No tocante à lesão cartilaginosa, avaliamos os sinais de isquemia ou degeneração da cartilagem traqueal segundo o escore modificado de Kumon et al.⁽²⁹⁾: grau 0, ausência de lesão isquêmica; grau 1, lesão isquêmica em menos de 50 % do anel cartilaginoso; grau 2, lesão isquêmica em 50 % ou mais do anel cartilaginoso; e grau 3, lesão isquêmica em todo o anel cartilaginoso. Assim, a cartilagem traqueal foi dita isquêmica quando ocorreu pelo menos uma das seguintes alterações: hialinização, metacromasia, fibrose ou reabsorção da matriz cartilaginosa, assim como cariólise nos condrócitos⁽³⁰⁾.

Epitélio respiratório. Quando mais de 50 % da circunferência da luz esteve sem mucosa, considerou-se o epitélio respiratório descamado. Também estudamos a relação dessa descamação com a inflamação na luz⁽¹⁴⁾.

Polimorfonucleares e inflamação na luz. A fim de aventar a possibilidade de infecção nos segmentos traqueais, avaliamos a ocorrência de infiltrado leucocitário, definido pela presença de células polimorfonucleares em mais de 25 % da área do interstício examinado^(14, 28). Também verificou-se a existência de exsudato leucocitário na luz do implante ou do enxerto.

Avaliação da estrutura da traquéia conservada na glicerina a 99 %. Descrevemos suas características histológicas procurando avaliar as condições de preservação da cartilagem, do epitélio respiratório e das glândulas presentes na submucosa.

4. 10 Análise estatística. Foram estudadas as diferenças (aplicando teste estatístico) entre os três grupos de pesquisa em relação aos seguintes fatores: presença de

polimorfonucleares, escore de infiltração de mononucleares, escore de lesão cartilaginosa, inflamação na luz, número de vasos corados na submucosa, número de setores com vasos funcionais, peso dos animais, rejeição e o escore de arterite aguda.

Os dados avaliados estatisticamente foram apresentados em médias, desvio padrões e proporções, conforme as variáveis de interesse. Nas verificações das hipóteses de nulidades, utilizamos o teste exato de Fisher e o teste do Qui-Quadrado na comparação de proporções. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado nas comparações de médias, quando o teste de Levene indicou heterogeneidade de variância entre as amostras; quando ocorreu o contrário, utilizamos o teste de ANOVA. Também aplicamos o teste de Dunn para comparações múltiplas quando o teste de Kruskal-Wallis apresentou $p < 0,05$.

Realizaram-se o teste de Spearman no estudo da correlação entre a revascularização e a arterite aguda, e o teste exato de Fisher para avaliar a associação entre o exsudato leucocitário da luz e descamação do epitélio respiratório.

O critério de determinação da significância foi o nível de 5 % ($\alpha \leq 0,05$).

Realizamos os cálculos estatísticos com o programa SPSS® 10.0 (SPSS Science, Chicago, IL, USA).

5 RESULTADOS

Analizamos os resultados de 20 auto-enxertos, 18 aloenxertos e 21 implantes glicerizados, pois um cão (grupos auto-enxerto e glicerina) não sobreviveu à anestesia, e em outro animal, implantamos apenas o segmento traqueal do grupo glicerina, faltando o segmento traqueal do grupo aloenxerto no momento do experimento. Os primeiros 14 cães pertenceram ao projeto piloto que definiu o melhor método de infusão e de diluição do látex.

Não houve diferença estatística no número total de cada uma das três combinações possíveis entre os segmentos traqueais dos três grupos, com $p = 0,741$ (Tabela 1).

Os principais resultados estão descritos na Tabela 2.

5. 1 Macroscopia. Não ocorreram casos de infecção de ferida operatória e de aderências entre a parede e as vísceras abdominais. Apenas um cão apresentou abscesso restrito ao local de implantação do auto-enxerto de traquéia.

Ao exame macroscópico, 88,13 % dos segmentos traqueais possuíam algum material na luz, semelhante a coágulo (glicerina), ou muco-purulento (aloenxerto e auto-enxerto) (Fig. 9). O omento maior bloqueava a luz, porém sem entrar no interior dos segmentos de traquéia. Dois aloenxertos apresentaram estenoses (Fig. 10), com 50 % da luz obstruída pela fibrose, confirmada histologicamente. Todos os segmentos traqueais mostraram-se aderidos intimamente ao omento maior. Nenhum implante ou enxerto apresentou consistência de tecidos moles.

5. 2 Teste da resistência à deformação. Quanto à resistência ao colapso imposta pela pressão negativa (200 mmHg), nenhum dos sete segmentos traqueais examinados (um auto-enxerto, três aloenxertos e três glicerinas) apresentou malacia.

Tabela 2. Avaliação histológica e presença de malacia nos segmentos traqueais, após 28 dias de implantação no omento maior.

Achados histológicos/grupos de pesquisa	auto-enxerto	aloenxerto	glicerina
Malacia	0 %	0 %	0 %
Número de vasos corados na submucosa ^{a T}	29,20 ± 43,25	3,11 ± 7,27	1 ± 3,46
Número de setores com vasos funcionais ^{a \$ T}	3,79 ± 0,63	2 ± 1,53	2,05 ± 1,56
Rejeição aguda ^{\$ T @}	0 %	66,7 %	28,57 %
Escore de arterite aguda ^{a \$}	0	0,83 ± 0,71	0,29 ± 0,46
Arterite crônica	0 %	5,6 %	9,5 %
Escore de lesão cartilaginosa ^a	0,95 ± 1,1	1,11 ± 1,08	1,38 ± 1,47

^a Resultados foram descritos como média ± desvio padrão

Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos:

@ aloenxerto # glicerina

\$ auto-enxerto # aloenxerto

T auto-enxerto # glicerina

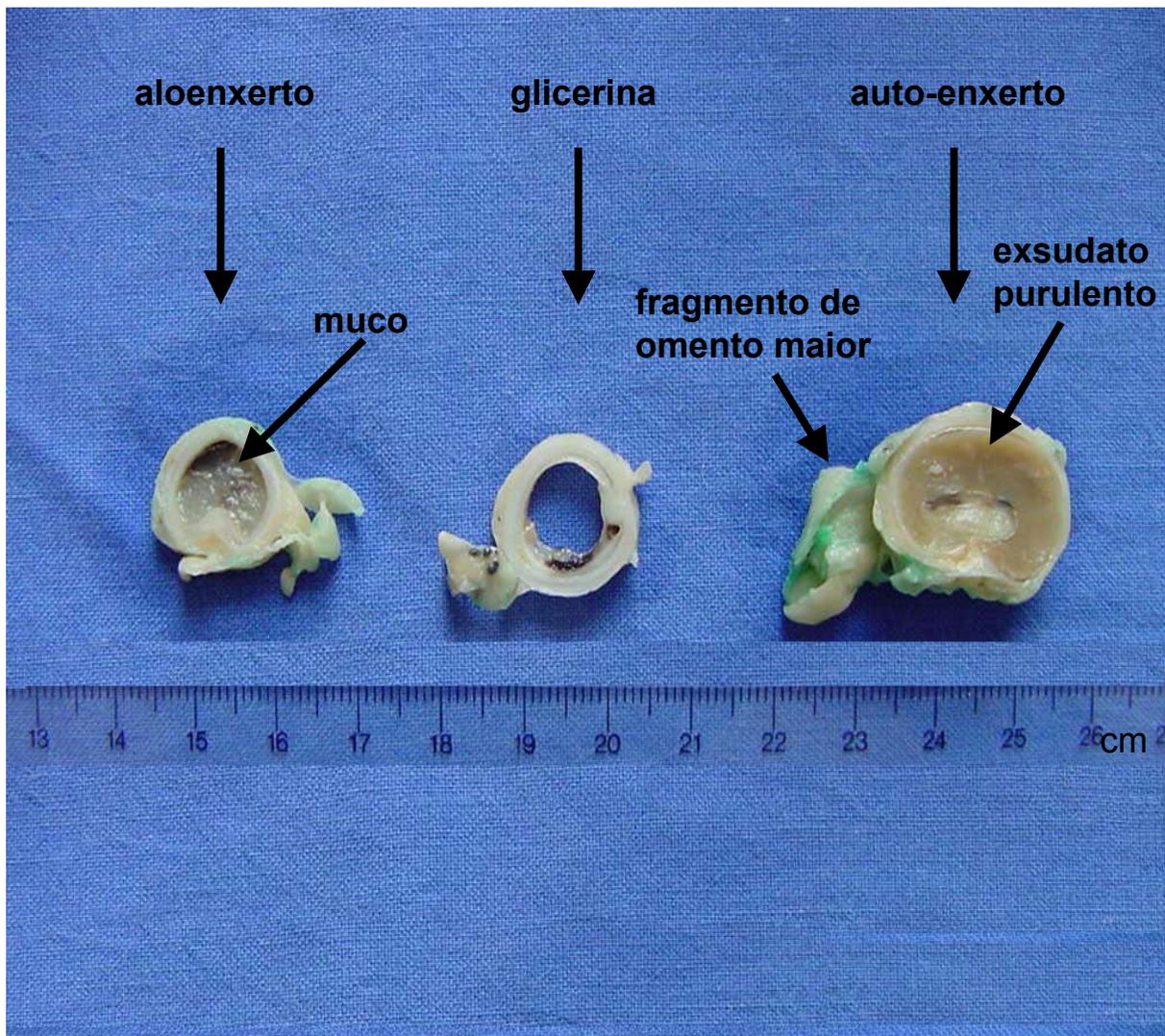


Fig. 9. Foto do corte transversal dos segmentos de traquéia dos três grupos de pesquisa, coletados após 28 dias no omento maior. Observar no auto-enxerto, o látex de cor verde no fragmento de omento maior aderido, e o exsudato purulento na luz.

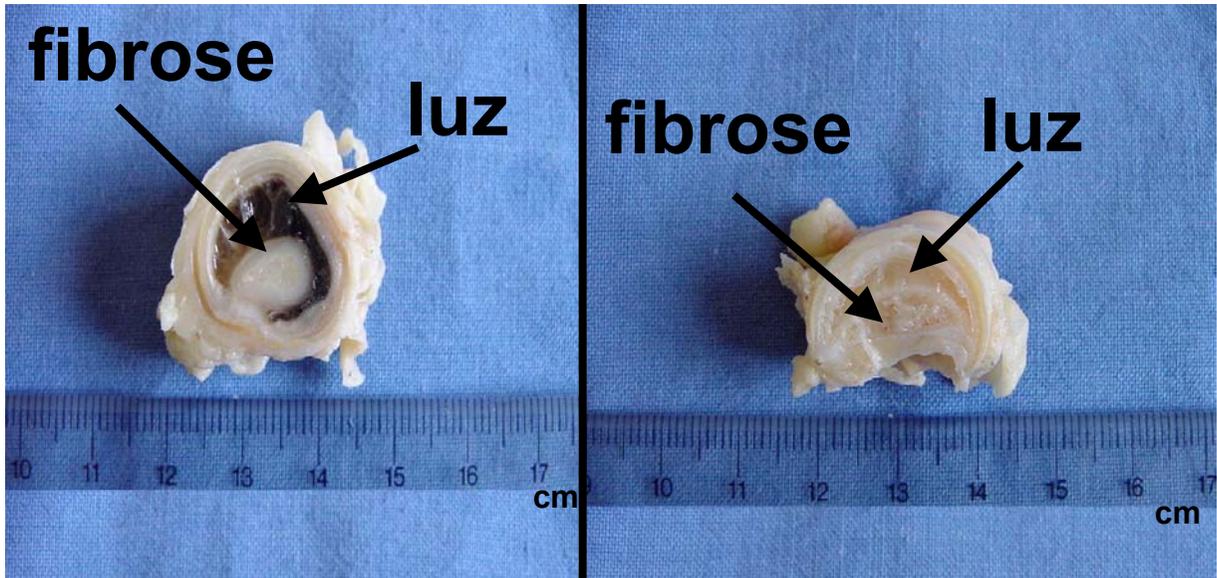


Fig. 10. Fotos de dois segmentos de traquéia do grupo aloenxerto, mostrando obstruções de pelo menos 50 % da luz pela fibrose.

5. 3 Análise histológica.

Revascularização indireta. Entre os 34 segmentos traqueais perfundidos com látex, excluímos dois aloenxertos e um auto-enxerto da análise final. Assim, verificamos o número de vasos corados com látex em 10 auto-enxertos, em 9 aloenxertos e em 12 implantes glicerizados. O grupo auto-enxerto teve uma maior média de vasos corados do que o grupo glicerina ($p = 0,029$), porém não foi estatisticamente superior à média verificada no grupo aloenxerto (Figs. 11-13).

Analisamos o número de setores com vasos funcionais da submucosa, em 53 segmentos traqueais (excluímos um auto-enxerto e cinco aloenxertos). O grupo auto-enxerto mostrou uma maior média de setores com vasos funcionais - o que representou 94,75 % da circunferência traqueal - sendo superior às médias dos grupos aloenxerto ($p = 0,013$) e glicerina ($p = 0,005$) (Fig. 14).

Excluímos os seis segmentos traqueais citados, pois não apresentavam condições de avaliação correta da posição dos vasos, em razão da desestruturação da submucosa pela necrose extensa associada ao tecido de granulação, à fibrose e à infecção. Nenhum deles apresentava, no entanto, vasos corados com látex.

Rejeição. As incidências de rejeição aguda foram maiores nos grupos aloenxerto ($p = 0,001$) e glicerina ($p = 0,01$) quando comparados à ausência da rejeição no grupo auto-enxerto. Os implantes glicerizados mostraram a metade da frequência de rejeição que os aloenxertos ($p = 0,039$).

A média do escore de arterite aguda foi maior no grupo aloenxerto do que no grupo auto-enxerto ($p = 0,001$), porém não superior, estatisticamente, à média do grupo glicerina (Fig. 15).

No grupo glicerina, 28,57 % dos implantes apresentaram a arterite intimal leve-moderada (v1), e nenhum apresentou arterite grave (v2) ou transmural (v3). No grupo aloenxerto, 50 % dos segmentos traqueais mostraram arterite intimal leve-moderada (Fig. 16), e 16,7 % arterite intimal grave (v2) (Fig. 17).

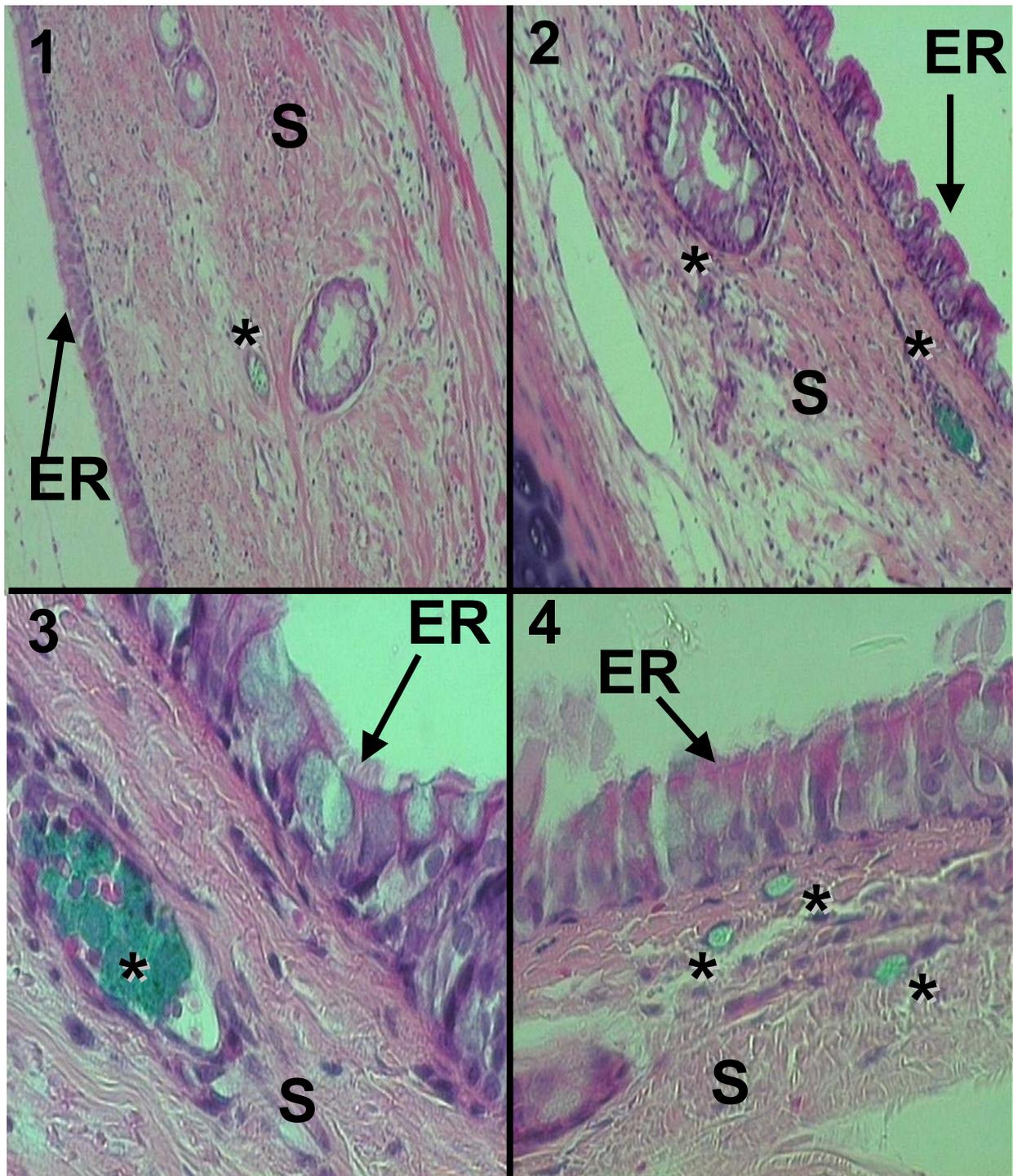


Fig. 11. Microfotografias do epitélio respiratório (ER) e da submucosa (S) de segmentos de traquéia do grupo auto-enxerto, após a implantação no omento maior dos cães número 32 (foto 1), 13 (fotos 2 e 3) e 20 (foto 4), durante 28 dias. Os vasos (*) da submucosa estão preenchidos com látex (hematoxilina-eosina; ampliação original: fotos 1 e 2 = 100 X, fotos 3 e 4 = 400 X).

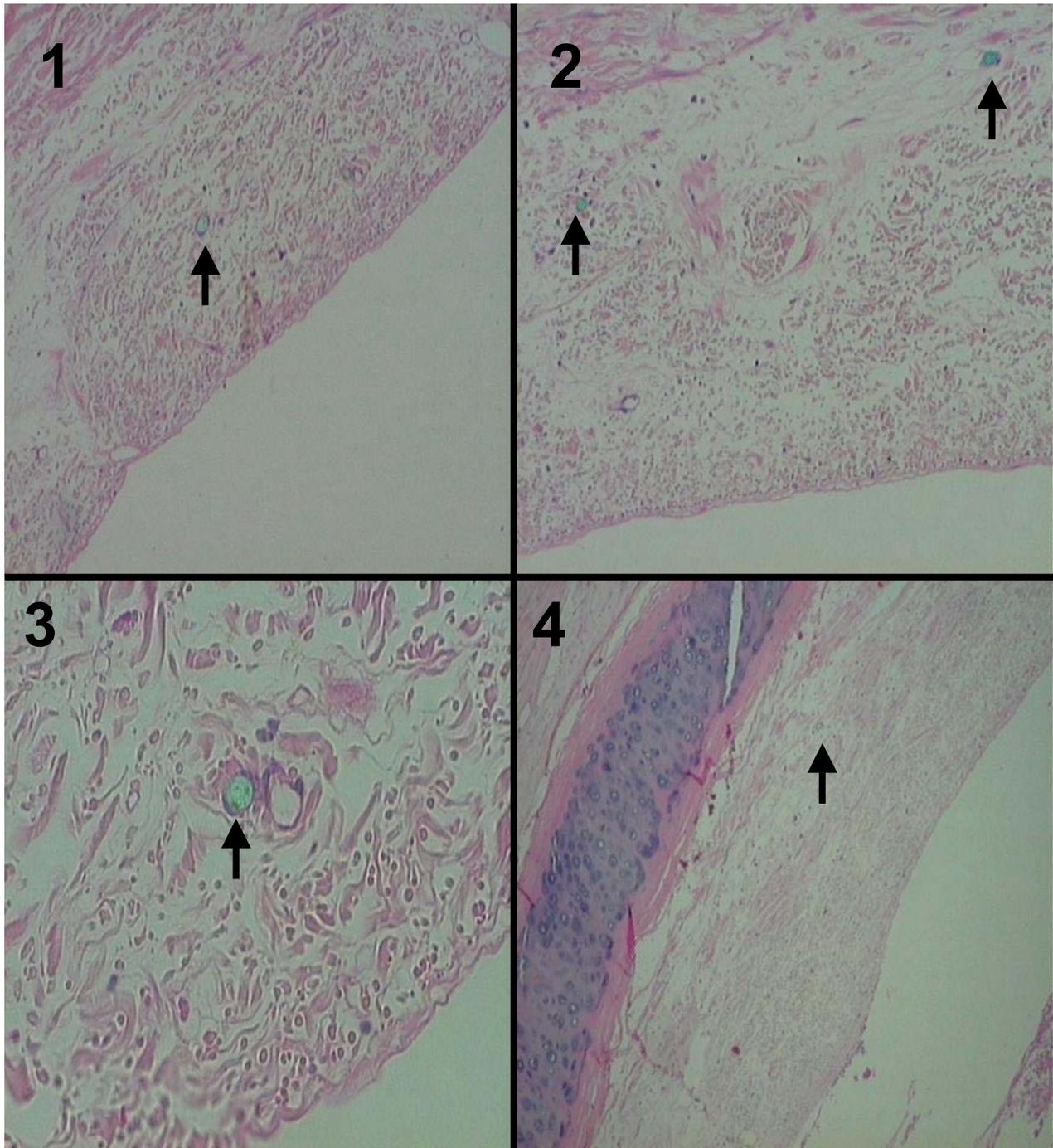


Fig. 12. Microfotografias do segmento traqueal glicerinado, após 28 dias de implantação no omento maior do cão número 20 . Revascularização da submucosa, com vasos preenchidos pelo látex verde (setas) (hematoxilina-eosina; ampliação original: fotos 1 e 2 = 100 X, foto 3 = 400 X, foto 4 = 40 X).

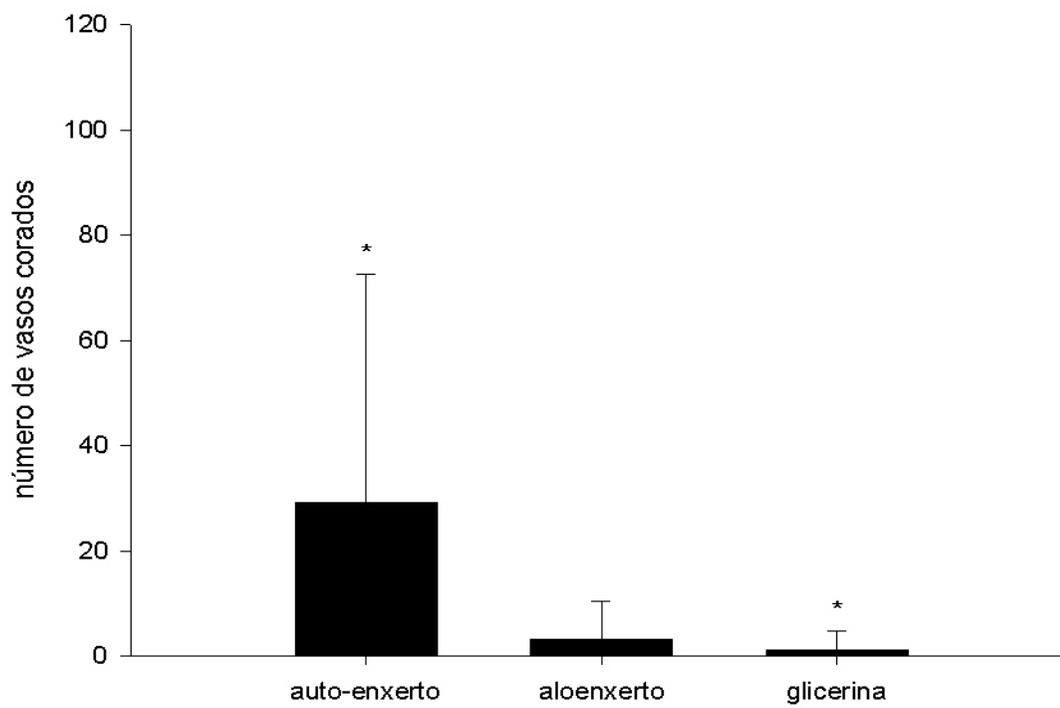


Fig. 13. Médias do número de vasos corados na submucosa dos grupos auto-enxerto, aloenxerto e glicerina. As pequenas barras verticais representam os desvios padrões nesses grupos. O símbolo (*) indica as médias dos grupos auto-enxerto e glicerina que foram estatisticamente diferentes ($p = 0,029$).

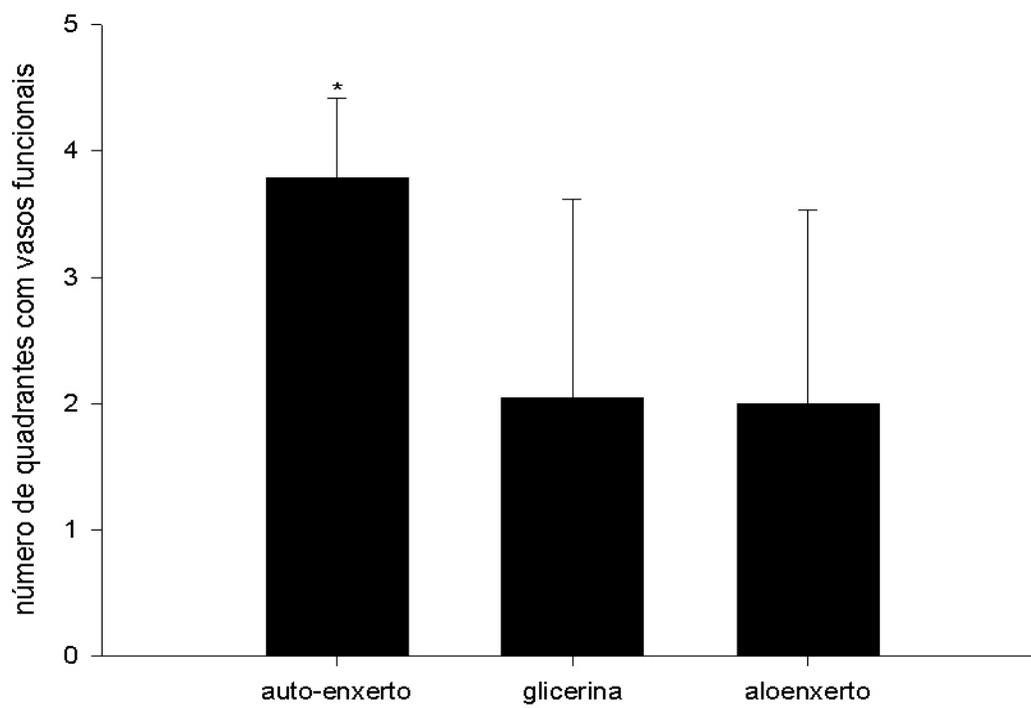


Fig. 14. Médias do número de quadrantes com vasos funcionais dos grupos auto-enxerto, aloenxerto e glicerina. As pequenas barras verticais representam os desvios padrões nesses grupos. O símbolo (*) indica a média do grupo auto-enxerto que foi estatisticamente maior em comparação às médias dos grupos glicerina ($p = 0,005$) e aloenxerto ($p = 0,013$).

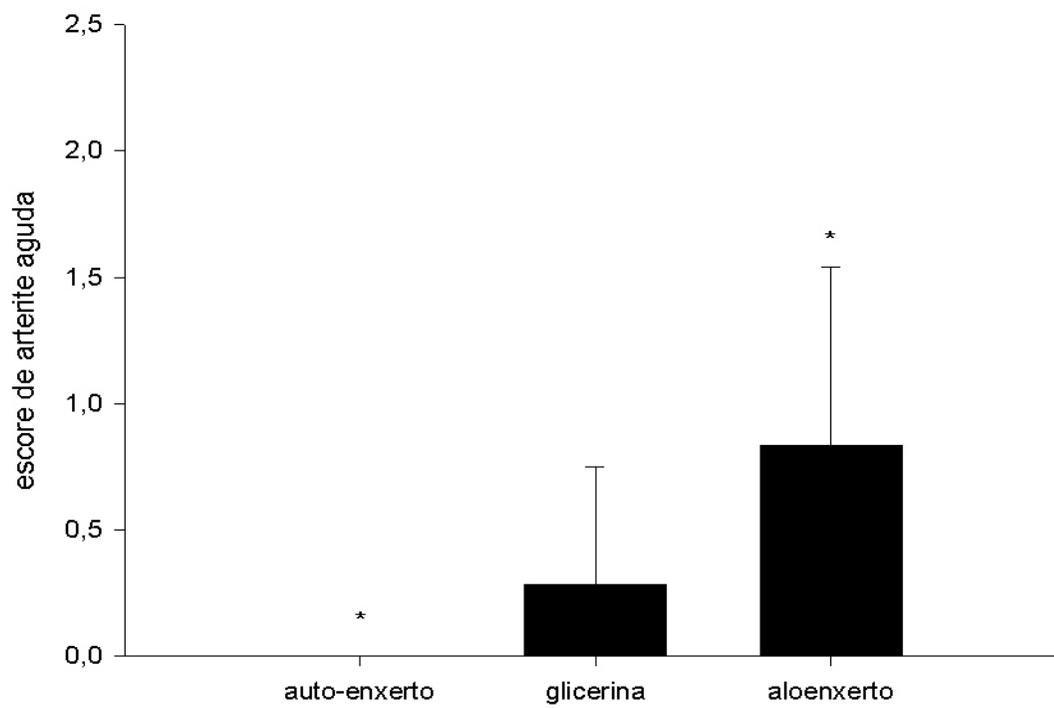


Fig. 15. Médias dos escores de arterite aguda dos grupos auto-enxerto, aloenxerto e glicerina. As pequenas barras verticais representam os desvios padrões nesses grupos. O símbolo (*) indica as médias dos grupos auto-enxerto e aloenxerto que foram estatisticamente diferentes ($p = 0,001$).

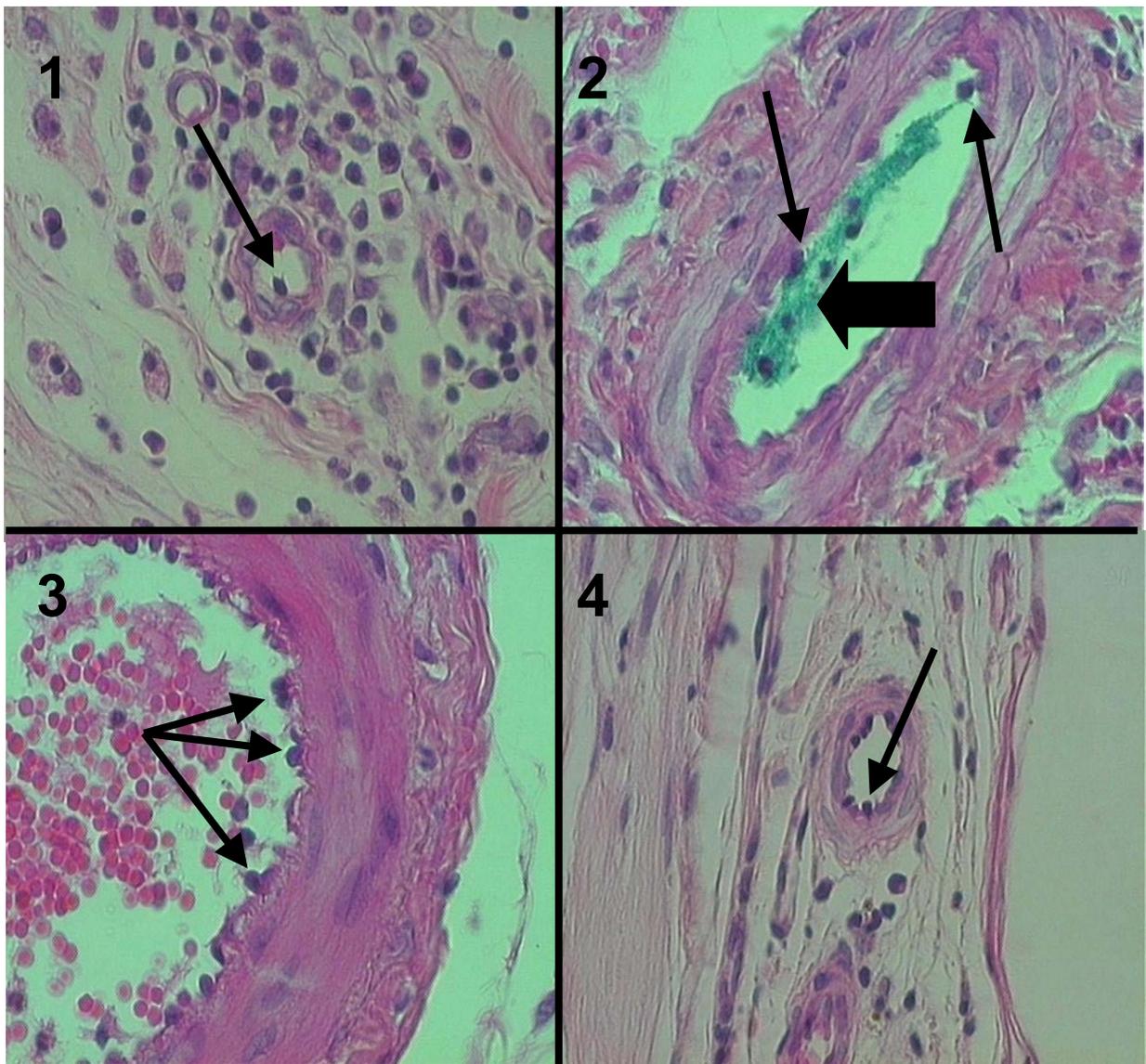


Fig. 16. Microfotografias da arterite intimal leve-moderada (V1) em segmentos de traquéia do grupo aloenxerto, após a implantação por 28 dias, no omento maior dos cães número 26 (fotos 1, 2 e 3) e 16 (foto 4). Setas finas indicam os linfócitos permeando a íntima dos vasos. Seta larga aponta o látex na luz arteriolar (hematoxilina-eosina; ampliação original: 400 X).

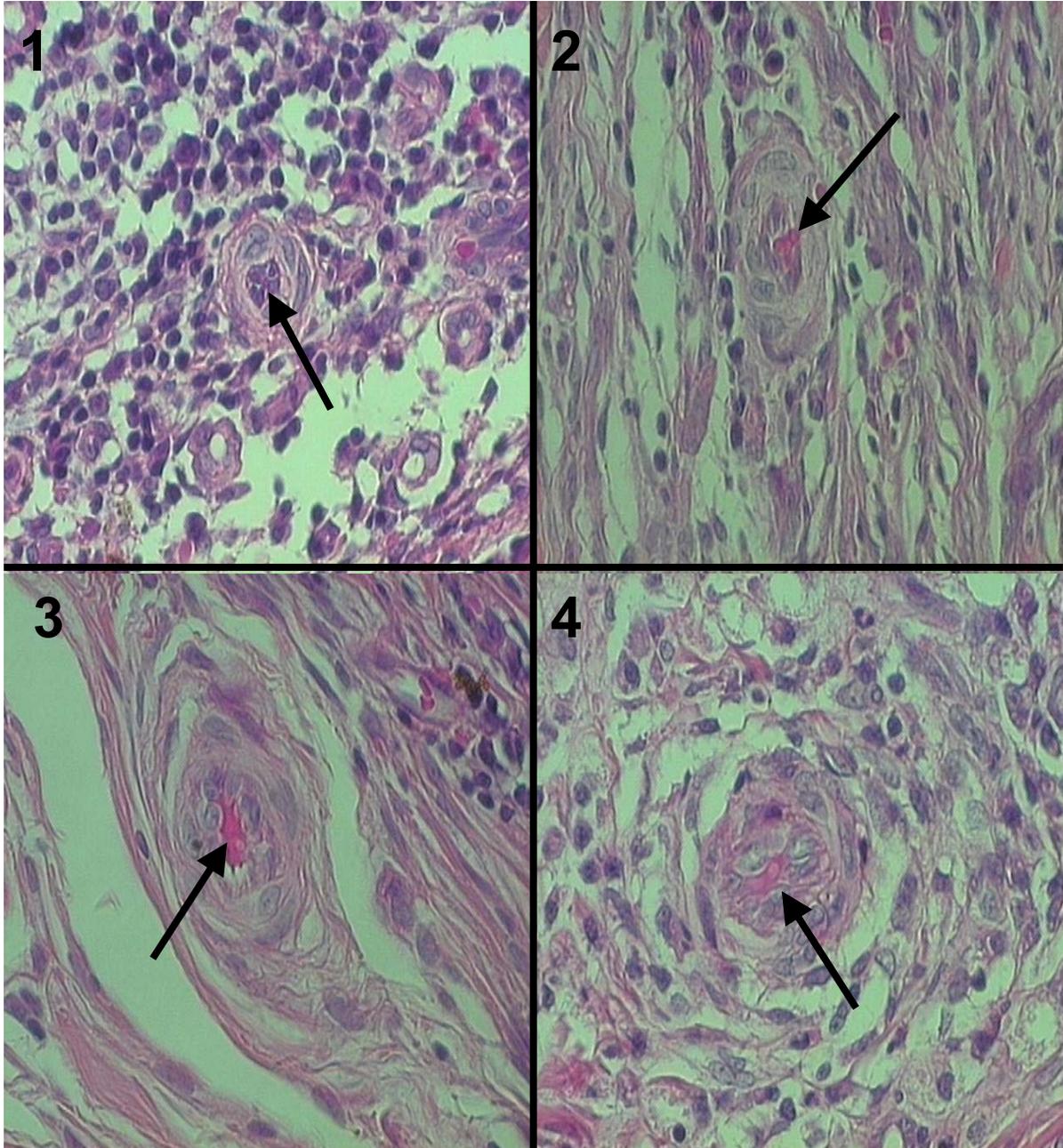


Fig. 17. Microfotografias da arterite intimal grave (V2) em segmentos de traquéia do grupo aloenxerto, após a implantação por 28 dias, no omento maior dos cães número 17 (foto 1), 25 (foto 2), 27 (foto 3) e 26 (foto 4). Setas apontam para a luz dos vasos parcialmente obstruídos pelas células mononucleares (hematoxilina-eosina; ampliação original: 400 X).

Quando analisamos a relação entre o número de setores com vasos funcionais e a intensidade da arterite aguda, constatamos uma correlação negativa de 0,308, estatisticamente significativa ($p = 0,025$) (Fig. 18). Contudo, não houve correlação significativa ($p = 0,259$) entre o número de vasos corados e a intensidade da lesão vascular aguda.

A arterite crônica esteve presente em apenas duas traquéias glicerizadas e em um aloenxerto (Fig. 19).

Todas as vasculites localizaram-se somente na adventícia traqueal.

O grupo aloenxerto apresentou a maior média do escore da infiltração de células mononucleares ($1,78 \pm 0,43$), quando comparado às médias dos grupos auto-enxerto ($0,60 \pm 0,75$) com $p = 0,000$ e glicerina ($0,71 \pm 0,72$) com $p = 0,001$ (Fig. 20). As médias dos grupos auto-enxerto e glicerina não apresentaram diferença estatística. Em 77,8 % dos aloenxertos, verificamos infiltrado de células mononucleares distribuindo-se em pelo menos 50 % do interstício examinado (em mais de um setor examinado).

Escore de lesão cartilaginosa. Não encontramos diferenças significantes entre os três grupos em relação às médias desses escores ($p = 0,646$) (Fig. 21). Nos três grupos, as médias ficaram baixas, à medida que a maioria das lesões atingiram menos de 50 % do anel cartilaginoso. Além disso, não houve sinais de isquemia cartilaginosa em 44,1 % dos segmentos traqueais (Fig. 22). Entre as lesões focais isquêmicas e degenerativas, destacamos como a mais freqüente a hialinização da matriz cartilaginosa.

Epitélio respiratório. O epitélio respiratório regenerou-se em 80 % das traquéias auto-enxertadas (Fig. 11), mas naqueles com epitélio descamado (20 % desses enxertos), verificou-se inflamação na luz, porém sem associação significativa ($p = 0,0941$). Em contrapartida, todos os segmentos traqueais dos grupos aloenxerto e glicerina tiveram descamação do epitélio respiratório.

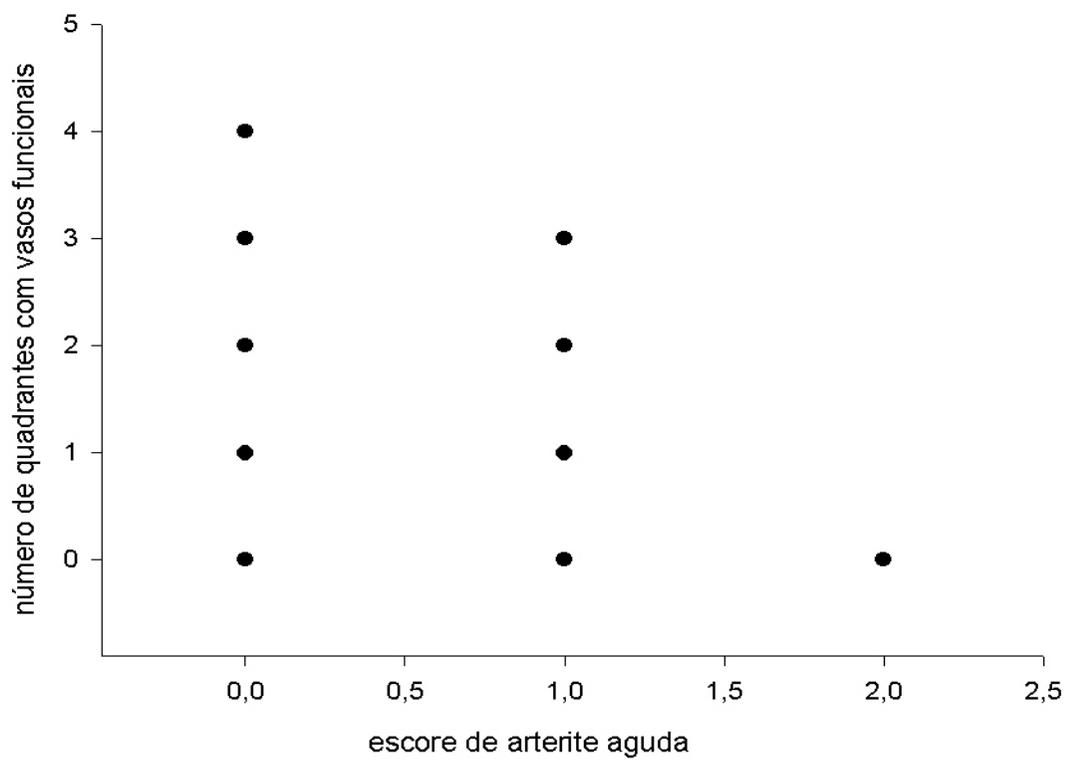


Fig. 18. Correlação entre o número de quadrantes com vasos funcionais e o escore de arterite aguda ($r_s = - 0,308$; $p = 0,025$).

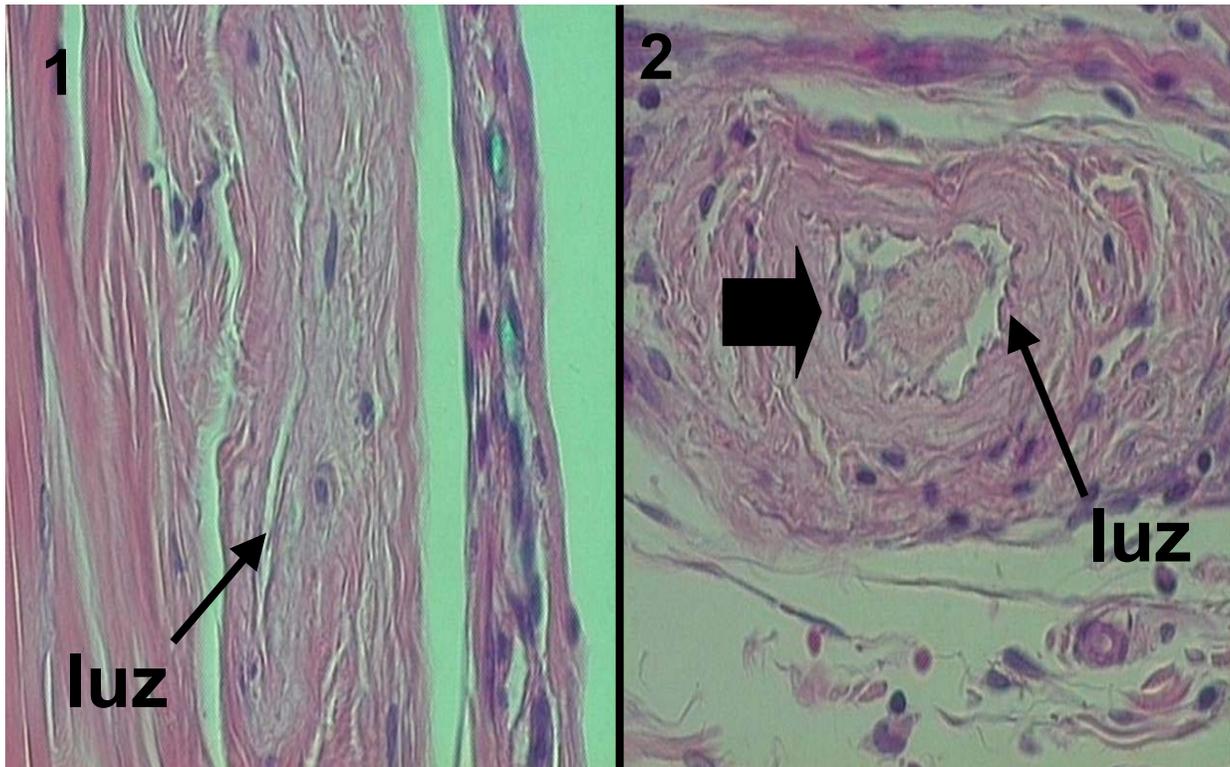


Fig. 19. Microfotografias da arterite crônica (CV) no segmento traqueal do grupo glicerina, implantado por 28 dias no cão número 19. Seta larga aponta para células mononucleares permeando a íntima do vaso (hematoxilina-eosina; ampliação original: 400 X).

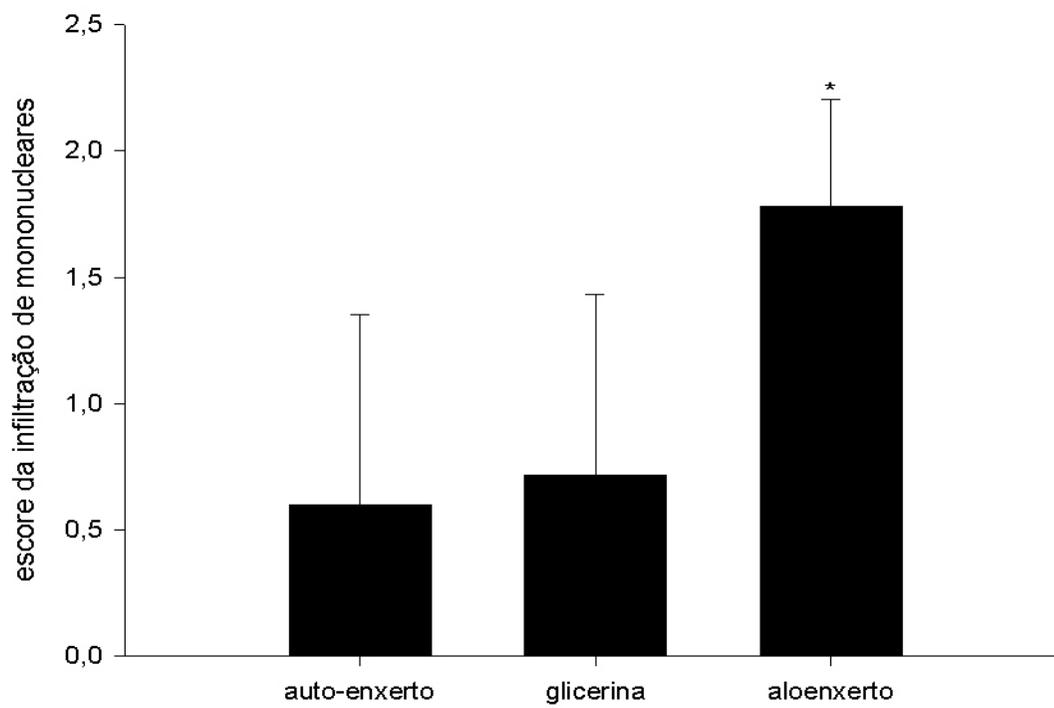


Fig. 20. Médias dos escores da infiltração de mononucleares nos grupos autoenxerto, aloenxerto e glicerina. As pequenas barras verticais representam os desvios padrões. O símbolo (*) indica a média do grupo aloenxerto que foi estatisticamente maior em comparação às médias dos grupos auto-enxerto ($p = 0,000$) e glicerina ($p = 0,001$).

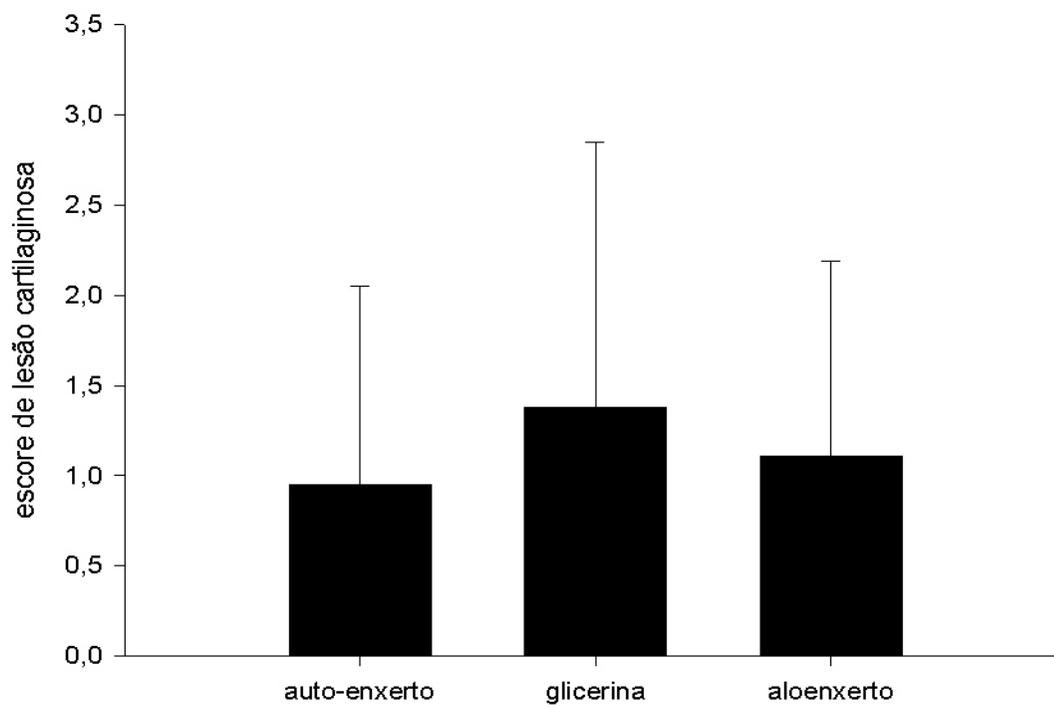


Fig. 21. Médias dos escores de lesão cartilaginosa dos grupos auto-enxerto, aloenxerto e glicerina. As pequenas barras verticais representam os desvios padrões nesses grupos ($p = 0,646$).

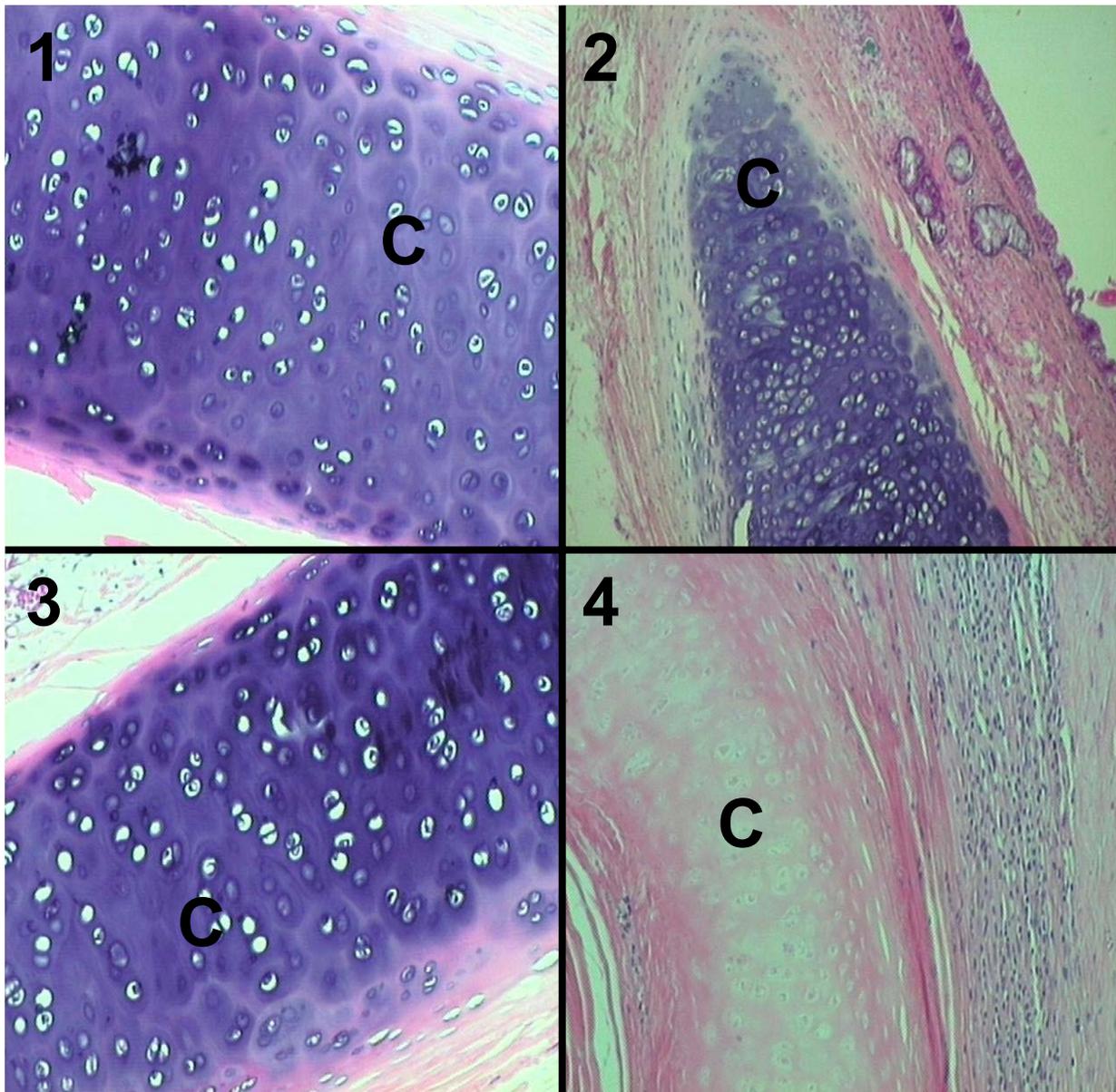


Fig. 22. Microfotografias dos anéis cartilagosos (C), de quatro segmentos traqueais dos grupos: foto 1 = glicerina (ampliação 100 X), foto 2 = auto-enxerto (ampliação 40 X), fotos 3 e 4 = aloenxerto (ampliação 100 X) (hematoxilina-eosina). Observar hialinização da matriz e cariólise nos condrócitos da foto 4. Fotos 1 a 3 apresentam cartilagens sem lesões isquêmicas. Os segmentos traqueais foram implantados, durante 28 dias, no omento maior dos cães número 12 (foto 1), 13 (foto2), 14 (foto3) e 24 (foto 4).

Polimorfonucleares. Os segmentos traqueais dos grupos auto-enxerto e aloenxerto apresentaram com maior frequência o infiltrado leucocitário (30 % nos auto-enxertos e 33,3 % nos aloenxertos) do que os implantes glicerinados (0 %) com $p = 0,0063$.

Inflamação na luz. Novamente, foi mais comum a existência de exsudato leucocitário na luz dos auto-enxertos (55 %) e dos aloenxertos (38,9 %) que nos implantes glicerinados (4,8 %) com $p = 0,002$.

Traquéia conservada na glicerina. As traquéias glicerinadas, após a hidratação e antes de sua implantação, apresentavam a forma e consistência semelhantes à traquéia fresca. Ao exame histológico, todos os implantes mantiveram a arquitetura traqueal, o arcabouço das glândulas na submucosa e os núcleos dos condrócitos (Fig. 23). Na cartilagem, a alteração mais freqüente foi a hialinização da matriz. Os vasos da adventícia das traquéias glicerinadas mostraram-se preenchidos com látex.

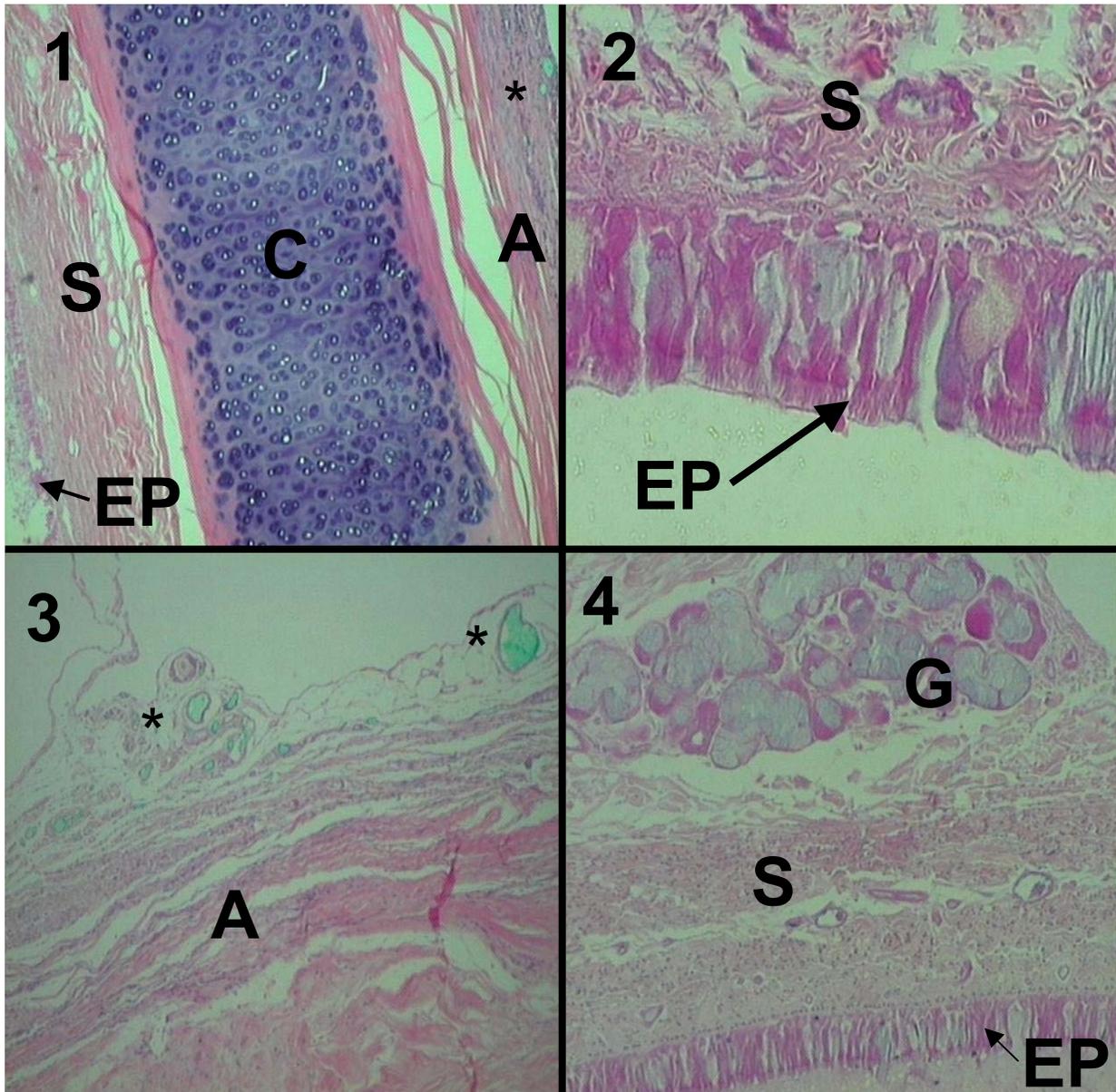


Fig. 23. Microfotografias dos segmentos de traquéia glicerizadas, implantadas, durante 28 dias, no omento maior dos cães número 19 (foto 1), 12 (foto 2), 20 (foto 3) e 11 (foto4). Submucosa (S), cartilagem (C), adventícia (A), epitélio respiratório (EP), glândulas da submucosa (G), vaso preenchido com látex verde (*) (hematoxilina-eosina; ampliação original: fotos 1 e 3 = 40 X, foto 2 = 400 X, foto 4 = 100 X).

6 DISCUSSÃO

Ao controlarmos o fenômeno de reação antigênica com a inclusão de um grupo auto-enxerto, poderemos conceder à arterite aguda a responsabilidade pela falta de revascularização. Assim, justifica-se a clara superioridade da revascularização do grupo auto-enxerto nos dois parâmetros medidos, ou seja, o número de setores com vasos funcionais e de vasos corados. Trabalhos publicados por Nakanishi et al.⁽²³⁾ e por Delaere et al.⁽¹²⁾ mostraram essa mesma revascularização plena nos auto-enxertos. Contudo, quando avaliamos isoladamente o número de vasos corados, houve diferença significativa somente em comparação ao grupo glicerina.

Já no grupo aloenxerto, no qual a resposta antigênica esteve em sua plenitude, fomos obrigados a descartar duas traquéias (da avaliação do número de vasos corados), pois houve a dificuldade de localizar os vasos em meio à necrose isquêmica secundária à rejeição. Desta forma, selecionamos, para a análise do número de vasos corados na submucosa, aloenxertos com uma melhor tolerância imunológica e, por conseguinte, com vascularização mais preservada. Isto aumentou falsamente a média nesse parâmetro e, dessa forma, explicou a falta de diferença estatística em relação aos auto-enxertos, sugerindo uma melhor revascularização do que o grupo glicerina.

Todavia, com uma maior quantidade de segmentos traqueais incluídos na quantificação do número de setores com vasos funcionais, corrigiu-se a aparente superioridade da vascularização nos aloenxertos em comparação às traquéias glicerinadas. Esses dois grupos igualmente demonstraram vasos funcionais em apenas metade dos quatro setores num corte transversal, menor estatisticamente à revascularização circunferencial quase completa dos auto-enxertos.

Nickeleit et al.⁽³¹⁾, demonstraram que a gravidade da vasculite aguda foi o principal fator prognóstico para a funcionalidade do enxerto renal. Nos grupos aloenxerto e glicerina de nosso estudo, a menor revascularização da submucosa justifica-se pela correlação estatisticamente significante entre um menor número de vasos funcionais e a maior

intensidade da arterite aguda. Assim, a maior consequência dessa associação negativa será a estenose devido à necrose do aloenxerto, conforme demonstrado por Tojo et al.⁽³²⁾, e à falta provável de reepitelização (no transplante ortotópico) da traquéia glicerizada por inexistência de um arcabouço vascular.

Entretanto, a vasculite aguda foi de baixa intensidade no grupo glicerina, não explicando completamente a ausência de revascularização. Verificamos na traquéia glicerizada a manutenção do arcabouço, associada à ausência de vitalidade celular. Assim, apenas o tecido de granulação responderia pelos neovasos observados, visto que, na falta de um endotélio com vitalidade celular, não há recanalização de vasos trombosados, como foi demonstrado por Delaere et al.⁽¹²⁾ em auto-enxertos, e por Moriyama et al.⁽³³⁾ em traquéias criopreservadas. Nosso estudo contemplou 28 dias de revascularização indireta, o que talvez foi insuficiente para uma melhor penetração de vasos no arcabouço glicerizado. Traquéias conservadas em glutaraldeído a 2 % apresentaram os primeiros vasos funcionais, na submucosa, só após 45 dias⁽³⁴⁾, o que reforça a premissa em favor da lenta revascularização existente nos tecidos desvitalizados.

Em 66,7 % dos aloenxertos houve rejeição aguda; o que é mais que o dobro da incidência verificada nos implantes glicerizados e muito semelhante aos 50 % de vasculite observada em transplantes de outros órgãos⁽³⁵⁾.

Os linfócitos responsáveis pela lesão vascular da rejeição aguda acumulam-se na luz dos capilares na submucosa através dos vasos recanalizados nos primeiros 10 dias de implantação do aloenxerto⁽¹⁵⁾. Delaere et al.⁽¹⁵⁾ observaram, nesses vasos, uma arterite com espessamento intimal, e Nakanishi et al.⁽¹⁴⁾ descreveram perivasculite na adventícia, com 28 dias de transplante. Entretanto, não há outros estudos que descrevem, detalhadamente, a intensidade e o tipo da vasculite na rejeição traqueal. No presente estudo, os aloenxertos apresentaram maior incidência das arterites intonais leve-moderada (v1) e grave (v2). A relevância desse achado denota uma maior gravidade da rejeição, levando à falha do enxerto pela estenose^(14-15, 17, 28, 32), como verificado na obstrução da luz pela fibrose em dois de nossos aloenxertos. Nakanishi et al.⁽¹⁴⁾ não referiram estenoses nos aloenxertos

implantados durante 28 dias. O curto tempo de implantação, se comparado aos 78 dias de transplante no trabalho com 100 % de obstrução dos enxertos⁽³²⁾, explica o número reduzido de estenoses no presente trabalho.

A arterite crônica é uma lesão obstrutiva e imunologicamente indolente, mas progressiva, que compromete a função do órgão transplantado⁽³⁶⁾. Moriyama et al.⁽³³⁾ descreveram sinais dessa rejeição crônica (trombose vascular) em traquéias criopreservadas, após três meses de enxerto. Transplantes de outros órgãos, apresentaram 30 % de arterite crônica durante seguimentos longos de até cinco anos⁽³⁶⁾. Portanto, a incidência da lesão vascular crônica no nosso trabalho (três segmentos traqueais) pode estar subestimada.

O componente celular da rejeição aguda é definido pela infiltração de células mononucleares em mais de 25 % do interstício examinado, conforme os critérios de Banff 97⁽²⁸⁾. Em diversos trabalhos, 20 % a 80 % dos aloenxertos traqueais apresentavam essa infiltração^(14, 16, 27). No presente trabalho, 77,8 % dos aloenxertos exibiram essa infiltração de células mononucleares característica de reação antigênica. Nas traquéias glicerizadas e nas auto-enxertadas, os infiltrados mononucleares foram mais tênues, ou seja, sem características antigênicas. Os infiltrados mononucleares dos auto-enxertos estiveram provavelmente relacionados à isquemia durante os primeiros dias de implantação, conforme sugestão de Nakanishi et al.⁽¹¹⁾. Infiltrados de células mononucleares com baixa intensidade, nos auto-enxertos, também foram relatados por Nakanishi et al.⁽¹⁷⁾.

A descamação da maior parte do epitélio respiratório⁽²²⁾ – no qual identificaram-se alopeptídios do Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II (MHC) ^(10, 15, 18) –, a ausência da recanalização imediata de um endotélio com vitalidade celular e antigênico, e a inexistência de células hematolinfóides alogênicas⁽³⁶⁾ - dificultando o reconhecimento dos antígenos pela via direta -, contribuíram para o menor estímulo antigênico, demonstrado nas traquéias glicerizadas de nosso trabalho, através da redução na intensidade da arterite aguda, da pequena incidência de rejeição e da inexistência do infiltrado mononuclear característico da reação antigênica.

No entanto, a arterite aguda e a crônica, presente em alguns implantes glicerizados, sugerem a permanência de algum estímulo antigênico proveniente da estrutura conservada como os núcleos dos condróctios, das glândulas da submucosa, ou até das pequenas áreas de epitélio respiratório não descamado.

A nutrição do condrócito baseia-se na difusão de solutos pela matriz da cartilagem, tornando-o mais resistente à isquemia^(26, 30). Portanto, a sua degeneração é um fenômeno lento, que necessita de dois a três meses para desenvolver alterações histológicas típicas da necrose, como cariólise, disfunção metabólica, destruição do pericôndrio e substituição por fibrose, resultando na malacia^(15, 17, 19, 26). Neste estudo, a hialinização da matriz cartilaginosa predominou entre as demais alterações, verificada também no trabalho de Delaere et al.⁽¹⁵⁾ a partir de 16 dias do transplante dos aloenxertos.

Essa maior resistência da cartilagem à isquemia está em concordância com nossos achados histológicos. Na maioria das cartilagens examinadas, verificamos apenas sinais restritos de lesão isquêmica (menos de 50 % do anel traqueal), em consonância com Nakanishi et al.⁽¹⁴⁾; que demonstraram em auto-enxertos uma limitada atrofia dos condróctios, e Kumon et al.⁽²⁹⁾ que apresentaram resultados parecidos também, utilizando um escore semelhante ao empregado em nosso trabalho. A avaliação mecânica pelo teste de resistência à deformação⁽⁴⁾ também ajusta-se aos achados histológicos, pois evidenciamos ausência de deformação estrutural da via aérea (malacia) na presença de uma pressão de – 200 mmHg. O período de 28 dias foi suficiente para o estabelecimento da revascularização pelo omento maior, explicando as ausências de malacia e degeneração mais dispersa e intensa na cartilagem dos aloenxertos e auto-enxertos.

Independente do tempo de conservação da traquéia na glicerina, em nosso trabalho, a maioria dos núcleos dos condróctios persistiram, não havendo sinais difusos de degeneração. Ao contrário de traquéias criopreservadas por períodos prolongados (dois a seis meses), quando ocorreram cariólise (degeneração) em 30 %⁽¹⁹⁾ até 90 %⁽¹⁷⁾ dos condróctios. Neste sentido, podemos supor que a criação de um banco de traquéias glicerizadas seria mais vantajoso, pela melhor conservação da estrutura cartilaginosa.

A importância em manter a vitalidade da cartilagem, durante o período de conservação de um segmento traqueal^(19-20, 29, 32-33) é contestada pelos bons resultados com segmentos de traquéia desvitalizados e preservados na acetona⁽⁶⁾ ou no glutaraldeído a 2 %⁽³⁴⁾. Também reforça essa assertiva, a redução da antigenicidade associada à degeneração dos condrócitos, sem a concomitância de malacia, em aloenxertos criopreservados por mais de seis meses⁽¹⁷⁾. Em contrapartida, a manutenção da viabilidade das traquéias criopreservadas por 60 dias contribuiu para a permanência do estímulo antigênico a partir do endotélio e dos condrócitos viáveis, levando à desestruturação e à fibrose desses aloenxertos pela provável rejeição crônica (após três meses do transplante)⁽³³⁾. Portanto, a redução da antigenicidade é a qualidade essencial de um método de conservação, no sentido de proporcionar funcionalidade ao segmento traqueal transplantado.

Conforme relatos de Delaere et al.⁽¹²⁾, a implantação do segmento traqueal no omento maior, por mais de 20 dias, pode levar à infecção e à falta de regeneração do epitélio, influenciando negativamente na função do substituto traqueal. Em nosso modelo, os 28 dias de implantação e a obstrução das extremidades dos segmentos traqueais pelo omento maior, possivelmente, contribuíram para o acúmulo de secreção na luz e infecção (infiltração de polimorfonucleares). Talvez essa inflamação tenha sido a responsável pela degeneração do epitélio respiratório em 20 % dos nossos auto-enxertos. A capacidade anti-séptica da glicerina⁽²¹⁾ explica a ausência da infiltração leucocitária e a quase inexistência de exsudato leucocitário na luz dos implantes glicerizados do nosso estudo, sendo uma qualidade essencial para os substitutos traqueais transplantados em pacientes imunossuprimidos. Também essa vantagem possibilita à traquéia glicerizada permanecer implantada no omento maior por mais de um mês, até atingir uma revascularização completa, com risco reduzido de infecção.

Se a arterite de baixa intensidade não comprometer a revascularização lenta da submucosa e se ocorrer a manutenção da rigidez de parede a longo prazo, poderemos concluir que a traquéia glicerizada com seis anéis cartilagosos será suficiente para

substituir a via aérea na maioria dos casos, pois, conforme declarado por Nakanishi et al.⁽¹¹⁾ “é possível a reconstrução de defeitos extensos na traquéia, sob algum grau de tensão nas anastomoses, utilizando um segmento traqueal menor que a ressecção”.

7 CONCLUSÃO

1. O auto-enxerto mostrou a mais completa revascularização.
2. Ao contrário do auto-enxerto, a neovascularização do implante glicerinado foi mais custosa, lenta e incompleta.
3. A menor intensidade da arterite aguda e a infiltração tênue pelas células mononucleares sugerem a redução na antigenicidade da traquéia glicerinada.
4. A traquéia glicerinada apresentou uma menor tendência à infecção durante a implantação no omento maior.
5. A inexistência de malacia comprovou a possibilidade de manter a rigidez da parede das traquéias glicerinadas, mesmo com a desvitalização da sua cartilagem.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em trabalhos futuros será importante, para a melhor caracterização de lesões vasculares menos evidentes na rejeição do aloenxerto de traquéia, a utilização de colorações especiais como a Prata de Jones, o PAS e o Tricrômico de Masson, a fim de evidenciar com maior clareza detalhes das artérias como a fibrose intimal, o alargamento do espaço subendotelial e a descontinuidade da membrana elástica. Também deve-se considerar o emprego de técnicas de imunohistoquímica para distinguir o tipo de linfócito presente nas várias manifestações de rejeição no enxerto traqueal.

O modelo de implantação dos aloenxertos traqueais no omento maior poderá ser útil para estudos sobre a imunossupressão no transplante de pulmão, visto que a bronquiólite obstrutiva humana tem características parecidas a rejeição traqueal⁽³⁷⁾.

O xenotransplante a partir de traquéias glicerizadas é um campo de pesquisa a ser explorado, pois poderá ampliar as aplicações do transplante traqueal.

É necessária a implantação da traquéia glicerizada por mais de 30 dias, no omento maior, para observarmos se a revascularização atingirá toda a circunferência traqueal, mas também se essa maior revascularização é acompanhada pelo aumento da antigenicidade.

Devem ser pesquisados também os efeitos da imunossupressão e da permanência dos núcleos nos condrócitos sobre a rejeição crônica da traquéia glicerizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

1. Grillo HC, Dignan EF, Miura T. Extensive resection and reconstruction of mediastinal trachea without prosthesis or graft: an anatomical study in man. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1964;48:741-3.
2. Grillo HC. Tracheal replacement. *Ann Thorac Surg* 1990;49:864-5.
3. Macchiarini P. Tracheal transplantation: beyond the replacement of a simple conduit. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1998;14:621-3.
4. Vacanti CA, Paige KT, Kim WS, Sakata J, Upton J, Vacanti JP. Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage. *J Pediatr Surg* 29;1994:201-5.
5. Li J, Xu PZ, Chen HY, Yang ZQ, Zhang QL. Improvement of tracheal autograft survival with transplantation into the greater omentum. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1592-6.
6. Jacobs JP, Quintessenza JA, Andrews T, Burke RP, Spektor Z, Delius RE, et al. Tracheal allograft reconstruction: the total North American and worldwide pediatric experiences. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1043-52.
7. Kunachak S, Kulapaditharom B, Vajaradul Y, Rochanawutanon M. Cryopreserved, irradiated tracheal homograft transplantation for laryngotracheal reconstruction in human beings. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:911-6.
8. Rose KG, Sesterbenn K, Wustrow F. Tracheal allotransplantation in man (letter). *Lancet* 1979;1:433.
9. Strome M, Stein J, Esclamado R, Hicks D, Lorenz RR, Braun W, et al. Laryngeal transplantation and 40-month follow-up. *N Engl J Med* 2001;344:1676-9.
10. Bujia J, Wilmes E, Hammer C, Kastenbauer E. Tracheal transplantation: demonstration of HLA class II subregion gene products on human trachea. *Acta Otolaryngol* 1990;110:149-54.
11. Nakanishi R, Shirakusa T, Mitsudomi T. Maximum length of tracheal autografts in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:1081-7.

12. Delaere PR, Ziyang L, Feenstra L. Traqueal autograft revascularization and transplantation. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1994;120:1130-6.
13. Macchiarini P, Lenot B, Montpreville V, Dulmet E, Mazmanian GM, Fattal M, et al. Heterotopic pig model for direct revascularization and venous drainage of tracheal allografts. J Thorac Cardiovasc Surg 1994;108:1066-75.
14. Nakanishi R, Shirakusa T, Hanagiri T. Early histopatologic features of tracheal allotransplant rejection: a study in non-immunosupressed dogs. Transplant Proc 1994;26:3715-8.
15. Delaere PR, Ziyang L, Hemans R, Sciot R, Feenstra L. Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg 1995;110:728-37.
16. Liu Y, Nakamura T, Shimizu Y, Ueda H, Yoshitani M, Toba T, et al. Tracheal allotransplantation in beagle dogs without immunosupressants. Ann Thorac Surg 2001;72:1190-4.
17. Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, Yasumoto K. Effect of cryopreservation period on rat tracheal allografts. J Heart Lung Transplant 2001;20:1010-5.
18. Liu Y, Nakamura T, Yamamoto Y, Matsumoto K, Sekine T, Ueda H, et al. Immunosupressant-free allotransplantation of the trachea, the antigenicity of tracheal grafts can be reduced by removing the epitheliurn and mixed glands from the grafts by detergent treatment. J Thorac Cardiovasc Surg 2000;120:108-14.
19. Kushibe K, Nezu K, Nishizaki K, Takahama M, Taniguchi S. Tracheal allotransplantation maintaining cartilage viability with long-term cryopreserved allografts. Ann Thorac Surg 2001;71:1666-9.
20. Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H et ai. Maximal period of cryopreservation with the Bicell biofreezing vessel for rat trachealisografts. J Thorac Cardiovasc Surg 1999;117:1070-6.

21. Pigossi N, Raia A, Lex A, Gama AH, Simonsen O, Haddad J, et al. Estudo experimental e clínico sobre o emprego, como implante, da dura-máter homogênea conservada em glicerina a temperatura ambiente. *Ver Ass Med Brasil* 1971;17:263-78.
22. Lenot B. De la greffe de trachee conservee a la transplantation tracheale: etude d'un modele experimental [Diplome D'Etudes Approfondies]. Paris (IF): Universite de Franche Comte de Besancon. Universite de Bourgogne; 1992.
23. Nakanishi R, Shirakusa T, Takachi T. Omentopexy for tracheal autografts. *Ann Thorac Surg* 1994;57:841-5.
24. Resolução Normativa número 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. 1996. www.saude.gov.br (10 Março 2002).
25. Rayrundo MM. Os deveres dos pesquisadores para com os animais de experimentação: uma proposta de auto-regulamentação [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre (RS): Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.
26. Goldberg M, Pearson FG. Pathogenesis of tracheal stenosis following tracheostomy with a cuffed tube: an experimental study in dogs. *Thorax* 1972;27:678-91.
27. Lane BP, Habicht GS, Jasper GS. Lymphocyte-epitelium interaction during rejection of nonisogeneic rat tracheal grafts. *Am J Pathol* 1977;86:71-7.
28. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999;55:713-23.
29. Kumon BC, Shiraishi T, Makihata S, Kawahara K, Shirakusa T. Cartilaginous injury limits cryopreservation of tracheal isograft. *Respirology* 2000;5:105-10.
30. Poster GA, Gurby AM, Roth SL. Skeletal System. In: Sternberg SS, editor. *Histology for Pathologists*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 107-26.
31. Nickeleit V, Vamvakes EC, Pascual M, Poletti BJ, Colvin RJ. The prognostic significance of significant arterial lesions in acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1998;7:1301-8.

32. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Kushibe K, Nezu K, Tanigushi S, et al. Tracheal replacement with cryopreserved tracheal allograft: experiment in dogs. *Ann Thorac Surg* 1998;66:209-13.
33. Moriyama H, Sasajima T, Hirata S, Yamazaki K, Yatsuyanagi E, Kubo Y. Revascularization of canine cryopreserved tracheal allografts. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1701-6.
34. Pinto MA. Bioprótese traqueal - estudo experimental em cães [Dissertação de Mestrado]. Santa Maria (RS): Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria; 1991.
35. Häyry P. Pathophysiology and diagnosis of acute rejection. *Transpl Proc* 1999;31:1789.
36. Demetris AJ, Duquesnoy RJ, Fung JJ, Murase N, Nalesnik M, Randhawa P, et al. Pathophysiology of chronic allograft rejection. 29 March 2000. <http://transplantation.medscape.com/Medscape/transplantation/ClinicalMgmt/CM.v02/public/index.x.CM.v02.html> (10 Aug 2000).
37. Yonan NA, Bishop P, El-Gamel A, Hutchinson IV. Tracheal allograft transplantation in rats: the role of immunosuppressive agents in development of obliterative airway disease. *Transplant Proc* 1998;30:2207-9.

GLOSSÁRIO

Com o objetivo de definir claramente o significado de alguns termos técnicos mais utilizados neste texto, criamos este Glossário baseado no Dicionário Médico Stedman (25ª Edição, 1996).

Aloenxerto – enxerto transplantado entre indivíduos geneticamente não idênticos da mesma espécie.

Alogênico – pertencente a uma espécie ou raça diferente, ou pertencente a diferentes constituições genéticas dentro da mesma espécie

Auto-enxerto – tecido transferido por enxertia em um nova posição no corpo do mesmo indivíduo.

Autógeno – tecido ou órgão originado do mesmo organismo.

Cariólise – apagamento ou destruição aparente do núcleo de uma célula, e perda da afinidade de sua cromatina por corantes básicos.

Enxerto – qualquer tecido ou órgão livre (não ligado) para transplante.

Heterógeno – tecido ou órgão originado de organismo de espécie diferente do indivíduo receptor.

Homotransplante – enxerto transplantado entre indivíduos geneticamente não idênticos da mesma espécie.

Implante – enxertar ou inserir. Qualquer material inserido (sem vitalidade celular) ou enxertado em tecidos.

Implantação – enxerto ou inserção de tecido.

Luz – espaço no interior de uma estrutura tubular.

Neovascularização – proliferação de vasos sanguíneos no tecido que normalmente não os contém.

Ortotópico – transplante de tecido ou órgão para sua posição anatômica normal.

Protético – relativo a uma prótese ou a uma parte artificial.

Segmento traqueal – enxerto ou implante de traquéia composto de seis anéis cartilagosos.

Transplante – tecido ou órgão no enxerto e no transplante. Transferir de uma parte para outra. Implante em uma parte de um tecido ou órgão retirado de outra parte ou de outro indivíduo.

REJECTION AND INDIRECT REVASCULARIZATION OF GLYCERIN-PRESERVED TRACHEAL IMPLANT

Maurício G. Saueressig¹, Maria Isabel A. Edelweiss², Alexandre Heitor Moreschi¹, Adriano G. Melos³, Gilberto V. Barbosa¹, Amarílio V. de Macedo Neto¹

¹ Serviço de Cirurgia Torácica. Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Serviço de Patologia. Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Hospital de Clínicas Veterinária. Rua Bento Gonçalves, 9090, CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Corresponding Author

Maurício G. Saueressig,

Rua Ramiro Barcelos, 2171, ap. 21

CEP: 90035-007

Porto Alegre – RS – Brazil.

Abstract

Objective: To evaluate antigenicity, malacia and revascularization in glycerin-preserved canine tracheal allografts.

Methodology: Segments of cervical trachea with six cartilage rings (2.4 to 3.1 cm) were randomly distributed in three study groups: autograft (21), allograft (18) and glycerin-preserved (22). We implanted two segments from different groups in the greater omentum of dogs. After 28 days, latex was injected in the canine aorta before the segments were harvested. We evaluated number of quadrants with functional vessels, number of vessels dyed in the submucosa, acute arteritis score, incidence of acute rejection, cartilage lesion score, and malacia (test of resistance to deformation).

Results: The autograft group had a larger number of dyed vessels than the glycerin-preserved group ($p = 0.029$). The autograft group also had a higher average number of quadrants with functional vessels than the allograft group ($p = 0.013$) and the glycerin-preserved group ($p = 0.005$). The allograft group had a higher mean score for acute arteritis than the autograft group ($p = 0.001$) and more acute rejection than the glycerin-preserved group ($p = 0.039$). The cartilage lesion score did not show any significant difference between groups. Malacia was not observed in any tracheal segment.

Conclusion: The glycerin-preserved tracheal implant had low antigenicity and good rigidity, but showed incomplete revascularization.

Key words: tracheal transplant, revascularization, rejection

Introduction

Tracheoplasty is the most common surgical treatment of benign and malignant tracheal diseases. However, there is still no definitive solution for the problem of reconstruction of defects larger than 60 % of the trachea⁽¹⁾.

The best anatomical and physiological replacement of the trachea is its own allograft⁽²⁾ since the use of prostheses and autografts to replace the trachea has shown contradictory results that are difficult to reproduce⁽³⁾.

The routine use of tracheal transplants depends on the solution of three problems: revascularization, rejection and preservation of grafts^(2,4).

Tracheal graft ischemia is the main cause of transplant failure^(5,6). Therefore, the graft has to be revascularized with flaps of the greater omentum⁽²⁾, lateral thoracic fascia⁽⁷⁾, muscle⁽⁵⁾, or direct vascular anastomosis with en bloc cervicothoracic exenteration⁽⁸⁾.

Arteritis characterizes acute vascular rejection of the trachea and results in thrombosis of microcirculation in the submucosa and, consequently, in ischemic necrosis of the respiratory epithelium, of the interstitium and, finally, of the cartilage^(9,10).

The denudation of respiratory epithelium, where major histocompatibility complex (MHC) class II is found, as well as the degeneration of chondrocytes in the tracheal allograft, are effects of the method of preservation, which reduces tracheal antigenicity^(11,12). Therefore, besides reducing the allogenic stimulus, another important property of these methods is the maintenance of the tissue structure and the formation of a trachea bank^(11,13,14).

Cryopreservation of tracheas is the most frequently studied preservation method^(11,13,14). However, disagreements about its effect on chronic rejection, about the variability of the length of time of cryopreservation, which ranges from three to 24 months, and the viability of chondrocytes raise questions about the long-term use of this preservation method.

For these reasons, another method of preservation that may be easily applicable and offer unlimited preservation time for the tracheal segment should be researched. This motivated us to research the use of glycerin, an easily obtained and manipulated trialcohol with antiseptic and preservative proprieties⁽¹⁵⁾.

We tested glycerin's preservation capacity in different tissues, especially in dura mater⁽¹⁵⁾ and the trachea⁽¹⁶⁾. Those studies demonstrated the qualities of glycerin in reducing the antigenic response and maintaining the structure of tissues.

These results and concepts formed the basis for the formulation of the following hypothesis: the tracheal segment preserved in 99 % glycerin and implanted in the omentum of dogs would present vascularization similar to an autograft, preserving tracheal lumen rigidity, and would present immunological tolerance better than an allograft.

Materials and Methods

This controlled blind randomized trial was conducted at Hospital de Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

The sample was composed of 61 canine tracheal segments of six cartilage rings each. They were divided into the following groups:

autografts (n = 21);

allografts (n = 18);

glycerin-preserved grafts (n = 22).

These tracheal segments were harvested from 51 adult mongrel dogs of both sexes kept under adequate sanitary control and provided by the kennel at Centro de Zoonoses, Secretaria Municipal de Saúde, Porto Alegre, Brazil. The animals weighed 9.497 ± 1.975 kg, and there was no statistically significant difference between groups ($p = 0.915$). They were randomly assigned to one of the three groups presented in Fig. 1.

We housed and handled the dogs in accordance with Normative Resolution 196/96 issued by the Conselho Nacional de Saúde⁽¹⁷⁾ (Brazilian Health Council). This trial was approved by the Research and Ethics in Health Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre under number 99411.

Protocol: The animals were premedicated with subcutaneous atropine sulphate (0.044 mg/kg) and intramuscular acepromazine (0.2 mg/kg), and anesthetized with intravenous thiopental sodium (15 mg/kg). After orotracheal intubation with a 7 mm tube (Rüschelit[®], Rüsch, Montevideo, Uruguay), anesthesia was maintained with inhaled halothane (0.5% to 1%) with the dogs spontaneously breathing a mixture of room air and oxygen (3 l/min).

All dogs except those in group B received intravenous ampicillin (20 mg/kg) during anesthesia induction. No immunosuppressive drug was used.

Allograft harvest: The 20 dogs donating allografts (group B) were killed with an overdose of intravenous thiopental sodium. After that, a cervical incision in the midline was made. We used an aseptic technique, and excised the cervical trachea. Each

trachea provided two six-ring segments 2.4 to 3.1 cm long each^(2,6). After resection of the adventitia, we placed 18 of these tracheal segments in 0.9 % saline solution until their implantation into the greater omentum (allograft group). A further 22 segments were placed in glass jars containing 99 % bidistilled glycerin (glycerin group), which were hermetically closed.

We stored the glycerin group tracheal segments at room temperature for two to six months⁽¹⁶⁾. At the time of implantation, the glycerin-preserved grafts were rehydrated with 0.9 % saline solution for 30 min before they were implanted into the greater omentum.

Autograft harvest: We repeated the same cervical approach used for the previous group in the 21 dogs donating autografts and receiving allografts or glycerin-preserved grafts. The immediate reconstruction of airways in these dogs followed steps similar to those followed for tracheoplasty in clinical practice.

During the same surgery, these animals received implantation of an autograft (autograft group) and an allograft, or a glycerin-preserved graft into the greater omentum.

Implantation into greater omentum: Implantation into the greater omentum was performed in 31 dogs, 21 from group A and 10 from group C. After a supra-umbilical median laparotomy of about 10 cm, we brought the greater omentum out of the peritoneal cavity. Each of the two segments of the trachea was wrapped with the greater omentum and fixed with a few stitches of 3-0 polyglactin suture 2 cm from the great gastric curvature and at least 10 cm from the other graft.

The random implantation of the 61 tracheal segments in these 31 dogs formed three combinations of research groups (Table 1).

Latex injection: The other 34 tracheal segments (17 animals) were perfused with latex on the 28th day of implantation. We used 100 ml latex⁽¹⁸⁾ (Labsynth, Diadema, SP, Brazil) for each 50 ml green dye (Suviniil[®], São Bernardo do Campo, SP, Brazil) diluted at 50 % in 0.9 % saline solution.

The latex injection technique had the following stages: 1) anticoagulation with intravenous sodium heparin (300 U/kg), dissection and clamping of thoracic and infrarenal aorta; 2) puncture of aorta above the celiac trunk with intravenous catheter (Jelco[®], Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brazil) with an external diameter of 2.1 mm; 3) injection of 250 ml saline solution at 37 °C followed by infusion of 45 ml latex under 150 mmHg pressure.

Harvest of grafts implanted into the greater omentum: Twenty-eight days after operation we anesthetized the dogs from groups A and C again. The laparotomy was reopened and the implanted tracheal segments were excised. Tests of resistance to deformation and macroscopic examination were carried out, and the tracheal segments were then fixed in 10 % formalin solution.

Test of resistance to deformation (malacia): We modified the technique described by Vacanti et al.⁽¹⁹⁾ to test the resistance to collapse of the last seven tracheal segments (one autograft, three allografts and three glycerin-preserved grafts). One segment was cross-sectioned from each tracheal segment and placed in a condom (Jontex[®], Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brazil). After that, we ran a multiperforated no. 16 tracheal aspiration catheter (Markmed, São Paulo, SP, Brazil) through the condom and the tracheal segment lumen. With a 60 ml syringe (Becton, Dickinson e Co, Franklin Lakes, NJ, USA) connected to the catheter, we applied a pressure of -200 mmHg. We considered that malacia only existed when the tracheal wall collapsed during negative pressure.

Histological analysis: The tracheal specimens were cross-sectioned in their middle portion, specimens included in paraffin, and 5 µm thick cross-sections prepared and stained with hematoxylin-eosin.

Indirect revascularization: We counted the number of latex stained vessels in the tracheal submucosa. We also quantified the circumferential revascularization of the submucosa by dividing the area of the transversal section in four equal sectors⁽⁷⁾, and counted only the functional vessels (independent of latex filling), that is, the endothelium

with nucleated cells and absence of thrombus. Therefore, the values of this parameter ranged from zero to four sectors with functional vessels.

We excluded from indirect revascularization analysis the tracheal segments that, at histological examination of sections, showed loss of structure of the mucosa, submucosa, cartilage and adventitia, since loss of structure would hinder the correct identification of vessels.

Rejection: The pattern of vascular rejection of the trachea is similar to that of other solid organs, such as the kidney and the heart^(9,20). Therefore, we decided to adopt the Banff 97⁽²¹⁾ criteria for assessment of renal rejection to define the presence and quantify the intensity of acute and chronic arteritis in the implanted tracheas. Acute vascular rejection was defined by the presence of acute arteritis in at least one vessel of the tracheal segment under examination, because such identification reveals immunological reaction against the graft⁽²¹⁾.

Acute arteritis was quantified according to the highest intensity vascular lesion present in at least one artery in the histological section under examination. The values of the intensity of arterial lesions were distributed according to the score of acute arteritis: 0, no arteritis (v0); 1, light-to-moderate intimal arteritis defined by permeation of the intima by lymphocytes (v1); 2, severe intimal arteritis, confirmed by the occlusion of at least 25 % of the artery lumen by mononuclear cells (v2); 3, transmural arteritis, shown by the loss of vascular architecture and by necrosis of the endothelium and the middle layer of muscle, associated with infiltration of the vascular wall by mononuclear, polymorphonuclear cells, with fibrinoid changes (v3). We also assessed the relation between indirect revascularization (number of quadrants with functional vessels and number of stained vessels in the submucosa) and score of acute arteritis.

The presence of chronic arteritis (CA) was also assessed. The criteria to define chronic vascular lesion were: fibrous thickening of the arterial intima with delamination or discontinuity of the internal elastic membrane; and/or the presence of foamy and/or

mononuclear cells in the fibrosed intima, observed in at least one vessel in the histological section under examination.

Cartilage lesion score: We assessed the signs of ischemia or degeneration of the tracheal cartilage according to the modified Kumon et al.⁽²²⁾ score; grade 0 – absence of ischemic lesion; grade 1 – ischemic lesion in up to 50 % of the cartilage ring; grade 2 – ischemic lesion in 50 % or more of the cartilage ring; and grade 3 – ischemic lesion in all cartilage ring. Tracheal cartilage was classified as ischemic when at least one of the following changes was observed: hyalinization, metachromasia, fibrosis or reabsorption of the cartilage matrix, or karyolysis in chondrocytes⁽²³⁾.

Polymorphonuclear cells and inflammation in the lumen: To investigate the possibility of infection in the tracheal segments, we assessed the presence of leukocyte infiltration, which was defined as the presence of polymorphonuclear cells in over 25 % of the area of the interstitium under examination^(9,21).

Statistical analysis: We used the Fisher exact test and the chi-square test for the comparison of proportions. The Kruskal-Wallis test was used for the comparison of means.

The Spearman rank correlation test was used to study the correlation between revascularization and acute arteritis.

Significance level was defined at 5 % ($\alpha \leq 0.05$).

Statistical calculations were performed with the SPSS[®] 10.0 (SPSS Science, Chicago, IL, USA).

Results

We evaluated the results of 20 autografts, 18 allografts and 21 glycerin-preserved grafts, since one dog (autograft and glycerin group) did not survive anesthesia, and another dog received the implant of only the tracheal segment from the glycerin group, as the tracheal segment from the allograft group was missing at the time of the study. Main results are presented in Table 2.

Macroscopic examination: Macroscopic examination showed that 88.13 % of the tracheal segments had some material in the lumen, similar to a clot (glycerin) or mucopurulent liquid (allograft and autograft). The greater omentum blocked the lumen but did not invade the interior of the tracheal segments. Two allografts presented stenosis with 50 % of the lumen obstructed by histologically-confirmed fibrosis. No tracheal segment had a soft tissue consistence.

Test of resistance to deformation (malacia): None of the seven tracheal segments examined (one autograft, three allografts and three glycerin-preserved grafts) presented malacia when tested for resistance to collapse under negative pressure (-200 mmHg).

Histological analysis

Indirect revascularization: Of the 34 tracheal segments perfused with latex, we excluded two allografts and one autograft from final analysis. Therefore, we studied the number of latex-stained vessels in ten autografts, nine allografts and 12 glycerin-preserved grafts. The autograft group had a higher mean number of stained vessels than the glycerin group ($p = 0.029$) (Fig. 2), but that number was not statistically higher than the mean for the allograft group.

We analyzed the number of quadrants with submucosal functional vessels in 53 tracheal segments (one autograft and five allografts were excluded). The autograft group had a higher mean number of quadrants with functional vessels than the allograft ($p = 0.013$) and the glycerin ($p = 0.005$) groups.

Rejection: The incidence of acute rejection was higher in the allograft ($p = 0.001$) and glycerin ($p = 0.01$) groups when compared with the absence of rejection in the autograft group. Glycerin-preserved grafts showed a frequency rate of rejection that was half the rate for the allografts ($p = 0.039$).

The mean acute arteritis score in the allograft group was higher than in the autograft group ($p = 0.001$), but not statistically higher than the mean for the glycerin group (Fig. 3).

In the glycerin group, 28.57 % of the implants had mild-to-moderate intimal arteritis (v1), and none had severe (v2) or transmural (v3) arteritis. In the allograft group, 50 % of the tracheal segments had mild-to-moderate intimal arteritis (v1), and 16.7 % had severe intimal arteritis (v2) (Fig. 4).

The analysis of the relation between the number of quadrants with functional vessels and the intensity of acute arteritis revealed a negative correlation of 0.308, which was statistically significant ($p = 0.025$). However, there was no significant correlation ($p = 0.259$) between the number of stained vessels and the intensity of the acute vascular lesion.

Chronic arteritis was identified in only two glycerin-preserved tracheas and in one allograft (Fig. 4).

All vasculitis observed was located only in the tracheal adventitia.

Cartilage lesion score: We did not find any significant differences between the mean scores for the three groups ($p = 0.646$). Means were low for the three groups, and most lesions affected less than 50 % of the cartilage ring. The most frequent ischemic and focal degenerative lesion was the hyalinization of the cartilage matrix.

Polymorphonuclear cells: Leukocyte infiltration was more frequently found in the tracheal segments in the autograft and allograft groups (30 % in autografts and 33.3 % in allografts) than in the glycerin-preserved grafts (0 %) ($p = 0.0063$).

Glycerin-preserved trachea: The glycerin-preserved tracheas presented form and consistence similar to fresh tracheas after hydration and before implantation.

Histological examination showed that all the implants preserved the tracheal architecture, the gland structure in the submucosa, and the nuclei of the chondrocytes (Fig. 2). The adventitia vessels in the glycerin-preserved tracheas were filled with latex.

Discussion

As the antigenic reaction was controlled with the inclusion of an autograft group, we may suggest that acute arteritis is responsible for the lack of revascularization. Therefore, the obviously better revascularization in the autograft group in both parameters measured may be justified. However, there was a significant difference in the comparison with the glycerin group when we examined the number of stained vessels separately.

We selected allografts with a better immunological tolerance, and a consequently better preserved vascularization, for the analysis of the number of stained vessels in the submucosa. This resulted in an artificially higher mean for this parameter and may therefore explain the lack of statistically significant differences from the autografts, and suggest a better revascularization than in the glycerin group.

However, this apparently superior vascularization in the allografts in comparison with the glycerin-preserved tracheas was corrected when we included a higher number of tracheal segments in the quantification of the number of quadrants with functional vessels. These two groups had functional vessels in only half of the quadrants in a cross section, which was statistically lower than the almost complete circumferential revascularization of the autografts.

Nickeleit et al.⁽²⁴⁾ showed that the severity of acute vasculitis was the main prognostic factor for the functionality of the renal graft. In the allograft and glycerin groups in our study, the lower revascularization of the submucosa is justified by the statistically significant correlation between a lower number of functional vessels and the higher intensity of acute arteritis.

However, acute vasculitis showed low intensity in the glycerin group, which does not fully explain the lack of revascularization. In the glycerin-preserved tracheas, we observed the maintenance of the structure associated with the absence of cell viability. Therefore, only the granulation tissue would respond for the new vessels observed, since there is no recanalization of thrombosed vessels in the absence of an endothelium

with cell viability, as was demonstrated by Delaere et al.⁽⁷⁾ in autografts and by Moriyama et al.⁽²⁵⁾ in cryopreserved tracheas. We studied indirect revascularization for 28 days, which may have been too short a period of time for a better penetration of vessels in the glycerin-preserved structures. Tracheas preserved in 2 % glutaraldehyde showed the first functional vessels in the submucosa only after 45 days⁽²⁶⁾, which reinforces the premise in favor of slow revascularization in devitalized tissues.

There was acute rejection in 66.7 % of the allografts, which is more than twice the incidence rate observed in the glycerin-preserved grafts and very similar to the 50 % vasculitis observed in transplants of other organs⁽²⁷⁾.

Delaere et al.⁽¹⁰⁾ observed arteritis with intimal thickening in the submucosal vessels of allografts in the 8th day after transplantation, and Nakanishi et al.⁽⁹⁾ described perivasculitis in the adventitia 28 days after implantation. However, there are no other studies that describe in detail the intensity and the type of vasculitis in tracheal rejection. In our study, allografts had a higher incidence of mild-to-moderate intimal (v1) and severe (v2) arteritis. The relevance of this finding indicates more severe rejection and leads to failure of graft by stenosis^(9-11,21,28), as was observed in the obstruction of the lumen by fibrosis in two of our allografts. The short period of implantation, when compared to the 78 days in the study with 100 % obstruction of the grafts⁽²⁹⁾, explains the reduced number of graft stenosis in our study.

Chronic arteritis is an obstructive and immunologically indolent lesion that compromises the function of the transplanted organ⁽²⁹⁾. Moriyama et al.⁽²⁵⁾ described signs of this chronic rejection (vascular thrombosis) in cryopreserved tracheas three months after transplantation. Transplantation of other organs revealed 30 % chronic arteritis in periods as long as five years⁽²⁹⁾. Therefore, the incidence of chronic vascular lesion in our study (three tracheal segments) may be underestimated.

The denudation of most of the respiratory epithelium⁽¹⁶⁾, – where allopeptides from MHC class II^(4,10,12) were identified – the absence of immediate recanalization of antigenic endothelium with cell viability, and the inexistence of allogenic

hematolymphoid cells⁽²⁹⁾ – which hinder the direct recognition of antigens – contributed to a lower antigenic stimulation, which was shown in the glycerin-preserved tracheas in our study by the reduction in the intensity of acute arteritis, the low incidence of rejection, and the inexistence of the mononuclear infiltrate characteristic of antigenic reactions.

However, acute and chronic arteritis, seen in some glycerin-preserved grafts, suggest that the persistence of the antigenic stimulus originated in the preserved structures, such as the chondrocyte nuclei, the submucosal glands or even the small areas of no denudation of respiratory epithelium.

Chondrocyte nutrition is based on the diffusion of solutes by the cartilage matrix, which makes it more resistant to ischemia^(19,20). Therefore, its degeneration is slow and takes two to three months to develop histological changes typical of necrosis, such as karyolysis, metabolic dysfunction, destruction of the perichondrium and replacement by fibrosis, resulting in malacia^(10,11,13,18).

Our histological findings confirm the higher resistance of cartilage to ischemia. In this study, the hyalinization of the cartilage matrix was the predominant change, also reported by Delaere et al.⁽¹⁰⁾ 16 days after the transplantation of allografts. In most of the cartilages examined we observed only restricted signs of ischemic lesion (less than 50 % of the tracheal ring), in agreement with findings by Nakanishi et al.⁽⁹⁾, who reported a limited atrophy of chondrocytes and destruction of the perichondrium in allografts. The mechanical evaluation by the test of resistance to deformation⁽¹⁹⁾ also confirms our histological findings, since we demonstrated the absence of structural deformation of the airways (malacia) under a pressure of –200 mmHg.

In our study, most chondrocyte nuclei were preserved no matter how long the trachea was preserved in glycerin, and there were no diffuse signs of degeneration, unlike in tracheas cryopreserved for prolonged periods of time (two to six months), when karyolysis (degeneration) occurs in 30 - 90 % of the chondrocytes. We may thus

suggest that a bank of glycerin-preserved tracheas may be more advantageous because of the better preservation of the cartilage structure.

The importance of preserving the viability of the cartilage during the period of preservation of a tracheal segment^(13,14,22,25,29) is challenged by the good results obtained with devitalized tracheal segments preserved in acetone⁽³⁰⁾ or in 2 % glutaraldehyde⁽²⁵⁾, which is further supported by the reduction of antigenicity associated with the degeneration of chondrocytes with concurrent malacia in allografts cryopreserved for longer than six months⁽¹¹⁾. On the other hand, retention of viability of tracheas cryopreserved for 60 days contributes to the preservation of the antigenic stimulus from the endothelium and of viable chondrocytes, which results in loss of structure and fibrosis of these allografts probably due to chronic rejection (three months after transplantation)⁽²⁵⁾.

Delaere et al.⁽⁷⁾ reported that the implantation of the tracheal segment into the greater omentum for longer than 20 days may lead to infection and to the lack of regeneration of the epithelium, negatively influencing the function of the tracheal implant. In our study, the 28 days of implantation and the obstruction of the extremities of the tracheal segments by the greater omentum may have contributed to the accumulation of secretion in the lumen and to infection (infiltration of polymorphonuclear cells). The antiseptic characteristic of glycerin⁽¹⁵⁾ explains the absence of leukocyte infiltration in the glycerin-preserved implants in our study; This advantage also allows the glycerin-preserved trachea to remain in the greater omentum for over one month until full revascularization is achieved, with a reduced risk of infection.

Conclusion

1. Autografts had the most complete revascularization.
2. Unlike the autograft, the new vascularization of the glycerin-preserved graft was more difficult, slower and incomplete.
3. The lower intensity of acute arteritis suggests that antigenicity is reduced in the glycerin-preserved trachea.
4. The glycerin-preserved trachea had a lower rate of infection while implanted into the greater omentum.
5. The inexistence of malacia confirmed the possibility of preserving lumen rigidity of the glycerin-preserved trachea even with the devitalization of its cartilage.

Acknowledgement

This study was supported by grants from FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). We are grateful for the editorial support provided by the Graduate Research Group at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

References

1. Grillo HC, Dignan EF, Miura T. Extensive resection and reconstruction of mediastinal trachea without prosthesis or graft: an anatomical study in man. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1964;48:741-3.
2. Li J, Xu PZ, Chen HY, Yang ZQ, Zhang QL. Improvement of tracheal autograft survival with transplantation into the greater omentum. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1592-6.
3. Grillo HC. Tracheal replacement. *Ann Thorac Surg* 1990;49:864-5.
4. Bujia J, Wilmes E, Hammer C, Kastenbauer E. Tracheal transplantation: demonstration of HLA class II subregion gene products on human trachea. *Acta Otolaryngol* 1990;110:149-54.
5. Rose KG, Sesterbenn K, Wustrow F. Tracheal allotransplantation in man (letter). *Lancet* 1979;1:433.
6. Nakanishi R, Shirakusa T, Mitsudomi T. Maximum length of tracheal autografts in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:1081-7.
7. Delaere PR, Ziyang L, Feenstra L. Traqueal autograft revascularization and transplantation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:1130-6.
8. Macchiarini P, Lenot B, Montpreville V, Dulmet E, Mazmanian GM, Fattal M, et al. Heterotopic pig model for direct revascularization and venous drainage of tracheal allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:1066-75.
9. Nakanishi R, Shirakusa T, Hanagiri T. Early histopathologic features of tracheal allotransplant rejection: a study in non-immunosuppressed dogs. *Transplant Proc* 1994;26:3715-8.
10. Delaere PR, Ziyang L, Hemans R, Sciote R, Feenstra L. Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:728-37.

11. Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, Yasumoto K. Effect of cryopreservation period on rat tracheal allografts. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:1010-5.
12. Liu Y, Nakamura T, Yamamoto Y, Matsumoto K, Sekine T, Ueda H, et al. Immunosuppressant-free allotransplantation of the trachea, the antigenicity of tracheal grafts can be reduced by removing the epithelium and mixed glands from the grafts by detergent treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:108-14.
13. Kushibe K, Nezu K, Nishizaki K, Takahama M, Taniguchi S. Tracheal allotransplantation maintaining cartilage viability with long-term cryopreserved allografts. *Ann Thorac Surg* 2001;71:1666-9.
14. Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H et al. Maximal period of cryopreservation with the Bicell biofreezing vessel for rat trachealisografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:1070-6.
15. Pigossi N, Raia A, Lex A, Gama AH, Simonsen O, Haddad J, et al. Estudo experimental e clínico sobre o emprego, como implante, da dura-máter homogêna conservada em glicerina a temperatura ambiente. *Ver Ass Med Brasil* 1971;17:263-78.
16. Lenot B. De la greffe de trachee conservee a la transplantation tracheale: etude d'un modele experimental [Diplome D'Etudes Approfondies]. Paris (IF): Universite de Franche Comte de Besancon. Universite de Bourgogne; 1992.
17. Resolução Normativa número 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. 1996. www.saude.gov.br (10 Março 2002).
18. Goldberg M, Pearson FG. Pathogenesis of tracheal stenosis following tracheostomy with a cuffed tube: an experimental study in dogs. *Thorax* 1972;27:678-91.
19. Vacanti CA, Paige KT, Kim WS, Sakata J, Upton J, Vacanti JP. Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage. *J Pediatr Surg* 29;1994:201-5.
20. Lane BP, Habicht GS, Jasper GS. Lymphocyte-epitelium interaction during rejection of nonisogeneic rat tracheal grafts. *Am J Pathol* 1977;86:71-7.

21. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999;55:713-23.
22. Kumon BC, Shiraishi T, Makihata S, Kawahara K, Shirakusa T. Cartilaginous injury limits cryopreservation of tracheal isograft. *Respirology* 2000;5:105-10.
23. Poster GA, Gurby AM, Roth SL. Skeletal System. In: Sternberg SS, editor. *Histology for Pathologists*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 107-26.
24. Nickeleit V, Vamvakes EC, Pascual M, Poletti BJ, Colvin RJ. The prognostic significance of significant arterial lesions in acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1998;7:1301-8.
25. Moriyama H, Sasajima T, Hirata S, Yamazaki K, Yatsuyanagi E, Kubo Y. Revascularization of canine cryopreserved tracheal allografts. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1701-6.
26. Pinto MA. Bioprótese traqueal - estudo experimental em cães [Dissertação de Mestrado]. Santa Maria (RS): Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria; 1991.
27. Häyry P. Pathophysiology and diagnosis of acute rejection. *Transpl Proc* 1999;31:1789.
28. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Kushibe K, Nezu K, Tanigushi S, et al. Tracheal replacement with cryopreserved tracheal allograft: experiment in dogs. *Ann Thorac Surg* 1998;66:209-13.
29. Demetris AJ, Duquesnoy RJ, Fung JJ, Murase N, Nalesnik M, Randhawa P, et al. Pathophysiology of chronic allograft rejection. 29 March 2000. <http://transplantation.medscape.com/Medscape/transplantation/ClinicalMgmt/CM.v02/public/index.CM.v02.html> (10 Aug 2000).
30. Jacobs JP, Quintessenza JA, Andrews T, Burke RP, Spektor Z, Delius RE, et al. Tracheal allograft reconstruction: the total North American and worldwide pediatric experiences. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1043-52.

Tabela 1. Número total de cães com uma das três combinações de dois implantes distintos de traquéia, provenientes dos grupos de pesquisa (auto-enxerto, aloenxerto e glicerina).

Destino dos cães	Combinação entre os grupos de pesquisa [@]		
	auto-enxerto+glicerina	auto-enxerto+aloenxerto	aloenxerto+glicerina
cães receptores (destino C)	-	-	9*
cães doadores e receptores (destino A)	12 [#]	9	-

* Não incluímos o cão que recebeu a implantação de apenas um segmento de traquéia do grupo glicerina.

[#] Um cão com essa combinação foi ao óbito, não sendo incluído nos resultados.

[@] Não houve diferença estatística do número de cães entre as três combinações ($p = 0,741$).

Tabela 2. Avaliação histológica e presença de malacia nos segmentos traqueais, após 28 dias de implantação no omento maior.

Achados histológicos/implantes traqueais	auto-enxerto	aloenxerto	glicerina
Malacia	0 %	0 %	0 %
Número de vasos corados na submucosa ^{a T}	29,20 ± 43,25	3,11 ± 7,27	1 ± 3,46
Número de quadrantes com vasos funcionais ^{a \$ T}	3,79 ± 0,63	2 ± 1,53	2,05 ± 1,56
Rejeição aguda ^{\$ T @}	0 %	66,7 %	28,57 %
Escore de arterite aguda ^{a \$}	0	0,83 ± 0,71	0,29 ± 0,46
Arterite crônica	0 %	5,6 %	9,5 %
Escore de lesão cartilaginosa ^a	0,95 ± 1,1	1,11 ± 1,08	1,38 ± 1,47

^a Resultados foram descritos como média ± desvio padrão

Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos:

[@] aloenxerto # glicerina

^{\$} auto-enxerto # aloenxerto

^T auto-enxerto # glicerina