

**ARTUR EUGÊNIO DE AZEVEDO PEREIRA**

**Avaliação morfo-funcional do sistema  
mucociliar de traquéia de rato submetida a  
diferentes métodos de preservação em  
modelo de isquemia experimental**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção de  
Título de Doutor em Ciências

Programa de: Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes

**SÃO PAULO**

**2011**

## *DEDICATÓRIA*

*A Alvino Luiz Pereira e Maria Evane de Azevedo Pereira, meus pais.*

*O grande amor que tenho por vocês, e o grande orgulho que tenho de vocês me fazem, de fato, feliz. Devo-lhes tudo.*

*Muito obrigado.*

*A Carla Rameri A. Silva de Azevedo, minha esposa.*

*Seu amor, companheirismo e compreensão são meu porto seguro.*

*Amo-te muito.*

*A Alexandre Igor de Azevedo Pereira e Augusto César de Azevedo Pereira, meus irmãos mais novos, que me dão sempre a grande alegria de participar de suas vidas.*

*A Alvino Luiz Pereira Jr. (in memoriam), meu irmão mais velho, que vibrava comigo a cada pequena conquista que eu obtinha. Em dimensões diferentes, vibremos mais uma vez.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, que me ilumina sempre.*

*À minha grande família Azevedo (avós - in memoriam, tios e tias, primos e primas), por me acolher sempre, nos bons e maus momentos, e por me incentivar a buscar o sonho do doutoramento.*

*Ao amigo e mentor Geraldo Antônio de Medeiros, por me iniciar na Cirurgia Torácica e por me ensinar a tentar ser cada vez melhor.*

*Ao amigo e colega Juarez Ritter, pela amizade e pelo incentivo nas minhas escolhas profissionais.*

*Ao Prof. Paulo Manuel Pêgo Fernandes, meu orientador, pela oportunidade que me deu ao me agregar ao LIM-61. A sua perseverança e sua visão da ciência me influenciarão sempre.*

*Ao Prof. Fábio Jatene, por coordenar, no Serviço de Cirurgia Torácica do HCFMUSP, uma equipe de alto gabarito, que me proporcionou um aprendizado valiosíssimo em Cirurgia Torácica.*

*A Hélio Minamoto, médico assistente do Serviço de Cirurgia Torácica do HCFMUSP, responsável pelo grupo de Traquéia, por permitir, com sua engenhosidade e paciência, que eu aprendesse um pouco com sua vasta experiência no tratamento de doenças traqueais.*

*A Ricardo Mingarini Terra, médico assistente do Serviço de Cirurgia Torácica do HCFMUSP, por me iniciar no difícil ambiente das publicações científicas.*

*Aos também Médicos Assistentes do Serviço de Cirurgia Torácica do HCFMUSP: Ricardo Beyruti, Ângelo Fernandez, José Ribas Milanez de Campos, Luis Miguel Melero Sancho, Miguel Lia Tedde, Eduardo Werebe, Marcos Naoyuki Samano, João Carlos das Neves Pereira e Pedro Henrique Xavier Nabuco de Araújo, por me proporcionarem base sólida no desempenho de minhas atividades profissionais.*

*Aos amigos e contemporâneos de residência médica em Cirurgia Torácica Alessandro Mariani, Nabor Bezerra Jr., Fernando Abrão e Israel de Medeiros, pelos anos de agradável convivência e muito aprendizado.*

*Ao amigo e pesquisador Rogério Pazetti, do LIM-61, pela ajuda na idealização desta pesquisa e, principalmente, pela sua paciência durante meu treinamento nos aparelhos de avaliação da depuração mucociliar.*

*À amiga e pesquisadora Karina Andriguetti, do LIM-61, pela grande ajuda na execução desta pesquisa. Sua disponibilidade e entusiasmo tornaram este trabalho possível.*

*Ao Dr. Mauro Canzian, médico patologista do InCor, que, apesar da agenda lotada, arranhou tempo para realizar ou interpretar as análises morfológicas à microscopia de luz e eletrônica.*

*À acadêmica Juliana Akemi Saka, pela inestimável ajuda na obtenção de grande parte dos dados desta pesquisa. Sua dedicação e eficiência são notáveis.*

*Aos amigos e colegas do LIM-61, Natália Nepomuceno, Paula Soares, Lucas Fernandes, Arteiro Menezes, Liliane Ruiz, Marcelo Zeviani, e ao Prof. Paulo Cardoso, pela oportunidade de com eles aprender muito sobre o dia-a-dia de como fazer ciência.*

*Ao Prof. Luiz Felipe Pinho Moreira, por sua disponibilidade em me facilitar a compreensão dos fundamentos da estatística.*

*Ao amigo Aristides Correia, pela grande ajuda no tratamento estatístico dos dados e no manejo do SPSS.*

*À Profª Élia Caldini, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da FMUSP, por sua ajuda no tratamento das peças para microscopia eletrônica; e à Profª Edna Haapalainen, do Centro de Microscopia Eletrônica da UNIFESP, pela obtenção das eletromicrofotografias.*

*Às amigas e colegas do Laboratório Anatômico Cirúrgico do Incor, Márcia Augusto e Eliana Ogata, e da Disciplina de Cirurgia Torácica, Sônia Esposito, Roseli Araújo e Rosângela Cruz, pelos momentos agradáveis de convívio e pela grande ajuda em tornar realidade esta pesquisa.*

*A Neusa Dini, Juliana Sobrinho e Eva de Oliveira, da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Torácica e Cardiovascular, por sempre tentarem facilitar a vida de nós, pós-graduandos.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento desta pesquisa.*

*“Aí nada fui, aí nada fiz, porque foi tudo a pesquisa experimental.”*

*Carlos Chagas.*

*“Ante a ciência está o Universo inteiro, apenas explorado; o céu, salpicado de sóis que se agitam num espaço infinito; o mar, com seus misteriosos abismos; a terra, guardando em suas entranhas o passado da vida e as páginas da história do homem; e o organismo humano, obra maior da criação, oferecendo-nos em cada célula uma incógnita e em cada vagido um tema de eterna meditação.”*

*Ramon y Cajal.*

## Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Estenose traqueal no adulto e seu tratamento .....	1
1.2	Possíveis indicações para o transplante traqueal .....	2
1.3	Transplante traqueal .....	3
1.4	Impedimentos ao transplante traqueal .....	4
1.4.1	Necessidade de imunossupressão prolongada .....	4
1.4.2	Vascularização do enxerto traqueal .....	9
1.5	Isquemia e preservação traqueal .....	12
1.5.1	Soluções de preservação .....	13
1.6	O epitélio respiratório e a depuração mucociliar .....	16
1.6.1	O líquido superficial das vias aéreas .....	17
1.6.2	As células ciliadas e o batimento ciliar .....	19
1.6.3	Ação da isquemia sobre a depuração mucociliar .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1	Gerais .....	21
2.2	Específicos .....	21
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1	Sacrifício e Obtenção das peças .....	22
3.2	Desenho do estudo .....	23
3.3	Avaliação funcional .....	27
3.3.1	Análise da velocidade de transporte mucociliar <i>in situ</i> .....	27
3.3.2	Medida da freqüência de batimento ciliar .....	28

3.4	Avaliação Morfológica .....	29
3.4.1	Microscopia de Luz.....	29
3.4.2	Microscopia eletrônica de transmissão.....	34
3.5	Análise Estatística.....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	Ação da isquemia fria sobre a depuração mucociliar .....	38
4.1.1	Avaliação funcional.....	38
4.1.2	Avaliação morfológica .....	40
4.2	Ação das soluções de preservação de uso tópico sobre a depuração mucociliar .....	42
4.2.1	Avaliação funcional.....	42
4.2.2	Avaliação morfológica .....	47
4.2.2	Microscopia eletrônica de transmissão.....	52
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
5.1	Avaliação funcional .....	60
5.1.1	Ação da isquemia fria à avaliação funcional.....	62
5.1.2	Ação das soluções de preservação de uso tópico à avaliação funcional .....	63
5.2	Avaliação morfológica à microscopia de luz.....	65
5.2.1	Ação da isquemia fria à microscopia de luz .....	66
5.2.2	Ação das soluções de preservação de uso tópico à microscopia de luz.....	67
5.3	Avaliação morfológica à microscopia eletrônica de transmissão ..	68
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

## Lista de Figuras

Figura 1:	Desenho do estudo.....	25
Figura 2:	Equipamentos utilizados para medida da velocidade de transporte mucociliar <i>in situ</i> e da freqüência de batimento ciliar. ....	28
Figura 3:	Captação da imagem a partir de lâmina corada com PAS pela câmara fotográfica digital. Imagem inserida no programa de computador analisador de imagem para quantificação do percentual de área corada .....	33
Figura 4:	Determinação da coloração alvo pelo pesquisador, com o uso do programa de computador analisador de imagem.....	33
Figura 5:	Delimitação do epitélio respiratório pelo pesquisador, com uso do programa de computador, para quantificação do percentual de área corada .....	33
Figura 6:	Velocidade de transporte mucociliar <i>in situ</i> (em mm/min) quanto ao tempo de isquemia.....	38
Figura 7:	Freqüência de batimento ciliar (em Hz) quanto ao tempo de isquemia .....	39
Figura 8:	Percentagem de área corada por azul de alciano quanto ao tempo de isquemia.....	40
Figura 9:	Percentagem de área corada por PAS quanto ao tempo de isquemia .....	41
Figura 10:	Velocidade de transporte mucociliar <i>in situ</i> (em mm/min) após 6 horas de isquemia.....	42
Figura 11:	Velocidade de transporte mucociliar <i>in situ</i> (em mm/min) após 10 horas de isquemia.....	43
Figura 12:	Velocidade de transporte mucociliar <i>in situ</i> (em mm/min) após 16 horas de isquemia.....	43
Figura 13:	Velocidade de transporte mucociliar <i>in situ</i> (em mm/min) após 24 horas de isquemia.....	44
Figura 14:	Freqüência de batimento ciliar (em Hz) após 6 horas de isquemia .....	45
Figura 15:	Freqüência de batimento ciliar (em Hz) após 10 horas de isquemia .....	45

Figura 16: Freqüência de batimento ciliar (em Hz) após 16 horas de isquemia .....	46
Figura 17: Freqüência de batimento ciliar (em Hz) após 24 horas de isquemia .....	46
Figura 18: Percentagem de área corada por azul de alciano após 6 horas de isquemia.....	48
Figura 19: Percentagem de área corada por azul de alciano após 10 horas de isquemia.....	48
Figura 20: Percentagem de área corada por azul de alciano após 16 horas de isquemia.....	49
Figura 21: Percentagem de área corada por azul de alciano após 24 horas de isquemia.....	49
Figura 22: Percentagem de área corada por PAS após 6 horas de isquemia .....	50
Figura 23: Percentagem de área corada por PAS após 10 horas de isquemia .....	51
Figura 24: Percentagem de área corada por PAS após 16 horas de isquemia .....	51
Figura 25: Percentagem de área corada por PAS após 24 horas de isquemia .....	52
Figura 26: Grupo Controle. Células ciliadas, calciformes e basais com morfologia habitual.....	53
Figura 27: Grupo LPD-24h. Células ciliadas, calciformes e basais.....	54
Figura 28: Grupo HTK-24h. Células ciliadas e calciformes .....	56
Figura 29: Grupo HTK-24h. Imagem em maior aumento da célula necrótica .....	57
Figura 30: Grupo Salina-24h. Células ciliadas com baixa densidade ciliar .....	58

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Graduação da integridade epitelial após 6 horas de isquemia.....	72
Tabela 2: Graduação da integridade epitelial após 10 horas de isquemia.....	72
Tabela 3: Graduação da integridade epitelial após 16 horas de isquemia.....	73
Tabela 4: Graduação da integridade epitelial após 24 horas de isquemia.....	73
Tabela 5: Graduação da inflamação subepitelial após 6 horas de isquemia.....	74
Tabela 6: Graduação da inflamação subepitelial após 10 horas de isquemia.....	74
Tabela 7: Graduação da inflamação subepitelial após 16 horas de isquemia.....	75
Tabela 8: Graduação da inflamação subepitelial após 24 horas de isquemia.....	75
Tabela 9: Dados individuais obtidos em todas as análises.....	76

## Resumo

Pereira AEA. *Avaliação morfo-funcional do sistema mucociliar de traquéia de rato submetida a diferentes métodos de preservação em modelo de isquemia experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 101p. 91p.

**INTRODUÇÃO:** O transplante traqueal continua um desafio. Contudo, avanços nas técnicas de revascularização dos enxertos traqueais e no conhecimento da imunobiologia da traquéia, indicam que esta técnica pode ser utilizada com frequência no futuro próximo. A depuração mucociliar (DM) é o mecanismo de defesa inato mais importante das vias aéreas. A traquéia age como um órgão de defesa devido à DM. A DM ocorre por ação do batimento ciliar do epitélio respiratório que impele o muco que atapeta as vias respiratórias, carreando substâncias nocivas. Idealmente, a DM deve ser preservada em enxertos traqueais passíveis de utilização para transplante traqueal. Nosso intuito foi: 1) avaliar os efeitos da isquemia fria sobre a DM; e 2) avaliar a ação de soluções de preservação administradas por via tópica na manutenção da DM após isquemia fria. **MÉTODOS:** De 109 ratos Wistar foram obtidos 217 segmentos traqueais. Os segmentos foram distribuídos entre três grupos experimentais e um grupo Controle. Cada segmento foi submergido em LPD-glicose (grupo LPD), histidina-triptofano-cetoglutarato (grupo HTK) ou solução salina (grupo Salina). Avaliou-se a DM após 6,10,16 ou 24 horas de isquemia fria. No grupo Controle os segmentos foram analisados imediatamente após a extração, não havendo isquemia fria, nem submersão em soluções. A velocidade de transporte mucociliar (VTM) foi medida através de microscópio de luz, pela observação do movimento das partículas de muco na superfície dos segmentos traqueais. A frequência de batimento ciliar (FBC) foi obtida pela sincronização entre o movimento ciliar observado pelo microscópio de luz e um estroboscópio. Em seguida, os segmentos foram corados com hematoxilina-eosina para analisar a integridade epitelial (IE) e a inflamação subepitelial (IS). Foi realizada análise quantitativa do muco intracelular por um programa de computador após coloração com azul de alciano (MI-AA) e PAS (MI-PAS). As amostras mais significativas foram analisadas qualitativamente por microscopia eletrônica de transmissão (ME). Foram realizadas duas análises: 1) grupo Controle e tempos de isquemia; e 2) grupo Controle e soluções de preservação (agrupado pelo tempo de isquemia). **RESULTADOS:** 1) grupo Controle e tempos de isquemia: O grupo controle foi melhor que os grupos submetidos a isquemia fria quanto à VTM ( $p=0,0001$ ) e FBC ( $p=0,012$ ). Contudo, não houve diferença na IE, IS e MI entre o grupo Controle e os demais grupos. 2) grupo Controle e soluções de preservação: O grupo controle apresentou melhor VTM que os grupos LPD, HTK e Salina após isquemia de 6h ( $p=0,001$ ), 16h ( $p=0,009$ ) e 24h ( $p=0,001$ ). O grupo controle apresentou melhor FBC que os grupos LPD, HTK e Salina após isquemia de 24h ( $p=0,001$ ). Não houve diferença entre os grupos na IE e IS. O grupo Controle apresentou melhor MI-AA que os grupos LPD após 16h ( $p=0,02$ ) e HTK após 24h de isquemia ( $p=0,04$ ). Não houve diferença entre os grupos à MI-PAS. À ME, o grupo Salina apresentou maiores alterações secundárias à isquemia do que os demais grupos. **CONCLUSÕES:** 1) A isquemia fria piora a DM; e 2) O uso de soluções de preservação administradas por via tópica não contribui para manutenção da DM após isquemia fria.

**Descritores:** 1.Traquéia 2.Depuração mucociliar 3.Transplante de órgãos 4.Preservação de órgãos 5.Soluções para preservação de órgãos 6.Isquemia fria 7.Mucosa respiratória.

## Summary

Pereira AEA. *Morphological and functional evaluation of the tracheal mucociliary clearance of rats submitted to different methods of preservation after cold ischemia* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 101p. 91p.

**INTRODUCTION:** Tracheal transplantation is a challenging problem. Recent advances in graft revascularization, and reepithelialization renewed the interest on airway transplantation. Mucociliary clearance (MC) is the most important innate defense mechanism of the respiratory system. MC works by mucous transport carried out by ciliary beating function of the airway epithelium. Trachea acts as a defense organ in the respiratory system through the MC. Ideally, MC should be preserved in tracheal grafts used for transplantation. Preservation solutions improve organ preservation by decreasing ischemic injury. The purpose of the study was: 1) to evaluate the effects of cold ischemia on MC; and 2) to evaluate the impact of topically-applied preservation solutions on MC after cold ischemia. **METHODS:** From 109 male Wistar rats we obtained 217 tracheal segments. The segments were allocated to one of four groups. Segments were submerged in LPD-glucose (LPD group), histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK group), or saline solution (Saline group), and stored at 4 °C. MC was analyzed after 6, 10, 16 or 24h of ischemia. Control group have only segments that were analyzed right after extraction, not submitted to cold ischemia or submersion in preservation solutions. The mucociliary transport velocity (MTV) was measured by observation of mucous particle under the surface of the segments, through a light microscope. Ciliary beating frequency (CBF) was achieved by synchronization between cilia movement and a stroboscope flashlight. Tracheas were stained with hematoxylin-eosin in order to analyze the epithelial integrity (EI) and the subepithelial inflammation (SI). A quantitative analysis of the intracellular mucus stained with alcian blue (IM -AB) and PAS (IM-PAS) was achieved by a software. The most significant samples of the tracheal segments were qualitatively analyzed by transmission electronic microscopy (TEM). Two analyses were made: 1) Control group and ischemic time; and 2) Control group and preservation solutions. **RESULTS:** 1) Control group and ischemic time: Control group had better VTM ( $p=0,0001$ ) and CBF ( $p=0,012$ ) than the groups submitted to cold ischemia. However, there was no difference among Control group and the other groups on EI, SI, IM-AB, and IM-PAS. 2) Control group and preservation solutions: Control group showed better MTV than the LPD, HTK, and Saline groups after 6h ( $p=0,001$ ), 16h ( $p=0,009$ ) and 24h ( $p=0,001$ ) of cold ischemia. Control group showed better CBF than the LPD, HTK, and Saline groups after 24h of ischemia ( $p=0,001$ ). There was no difference among groups on EI and SI. Control group showed better IM-AB than both the LPD group after 16h of cold ischemia ( $p=0,02$ ), and the HTK group after 24h of cold ischemia ( $p=0,04$ ). There was no difference among the groups on IM-PAS. TEM showed more findings of ischemic lesion on Saline group. **CONCLUSIONS:** 1) Cold ischemia impairs MC; and 2) Topically-applied preservation solutions do not ameliorate MC after cold ischemia.

Descriptors: 1.Trachea 2.Mucociliary clearance 3.Organ Transplantation 4.Organ preservation 5.Organ preservation solutions 6.Cold ischemia 7.Respiratory mucosa.

# **1 INTRODUÇÃO**

---

## **1.1 Estenose traqueal no adulto e seu tratamento**

A intubação traqueal é um procedimento freqüentemente utilizado para manutenção da adequada ventilação, em pacientes com insuficiência respiratória das mais variadas causas. Apesar do óbvio benefício, a intubação traqueal pode acarretar problemas sérios para os sobreviventes dos quadros de insuficiência respiratória. Uma das complicações mais importantes da intubação traqueal é a estenose traqueal inflamatória.

Dentre as doenças traqueais que necessitam de tratamento invasivo, a estenose traqueal inflamatória é a mais comum. O quadro clínico da estenose traqueal é variável e depende fundamentalmente do grau de obstrução ao fluxo aéreo. Comumente os pacientes apresentam dispnéia que costuma ser progressiva, podendo evoluir para insuficiência respiratória e óbito (Grillo, 2004b). A grande maioria dos pacientes portadores de estenose traqueal pode ser submetida a tratamento cirúrgico definitivo. O tratamento padrão consiste em ressecção da área de estenose, seguida de anastomose traqueal término-terminal no mesmo tempo cirúrgico (Wright et al., 2004). Esta técnica apresenta bons resultados e é largamente empregada em todo o mundo.

## 1.2 Possíveis indicações para o transplante traqueal

Apesar de efetivo para a maioria dos pacientes portadores de estenose traqueal, o tratamento cirúrgico não está indicado em alguns casos. Os pacientes que apresentam estenose traqueal longa, isto é, que acomete mais que 50% do comprimento total da traquéia, na maioria das vezes, não são passíveis de tratamento cirúrgico definitivo. Além disso, entre 2,7 e 10,5% dos pacientes que são submetidos a ressecção traqueal evoluem com recidiva da estenose no local da anastomose término-terminal, impossibilitando uma nova ressecção traqueal (Friedel et al., 2003; Wright et al., 2004; Abbasidezfouli et al., 2007). Embora pouco comuns, alguns tipos de lesões traqueais traumáticas também não são passíveis de tratamento cirúrgico definitivo. A esta lista de doenças traqueais irressecáveis ainda se incluem as neoplasias traqueais extensas e algumas doenças reumatológicas que podem acometer a traquéia difusamente, como a granulomatose de Wegener e a policondrite recidivante (Grillo, 2004c). Os pacientes nessas condições são geralmente submetidos a intervenções paliativas, como a dilatação traqueal, a traqueostomia definitiva e o uso de próteses traqueais. Apesar de temporariamente efetivos, alguns desses métodos estão associados a elevados índices de complicações (Terra et al., 2007). Além disso, os pacientes submetidos a tratamentos paliativos são comumente obrigados a se submeter a múltiplos procedimentos, devido a nova estenose ou desgaste da prótese (Carretta et al., 2009).

A quantidade de pacientes com doenças traqueais que não estariam aptos a um tratamento definitivo é considerada pequena, embora não seja insignificante. A partir de dados do DATASUS foi estimado que, no Brasil, cerca de 200 pacientes por ano poderiam estar incluídos nessa condição (Pêgo-Fernandes e Azevedo-Pereira, 2009). Para esses pacientes o transplante traqueal seria uma solução definitiva.

### **1.3 Transplante traqueal**

O transplante traqueal vem sendo tentado desde o final do século XIX e começo do século XX (Burket, 1918). Vários pesquisadores, ludibriados pela aparente simplicidade técnica do procedimento, têm tentado estabelecer um método efetivo de transplante traqueal (Grillo, 2004d). Além dos aloenxertos traqueais, vários outros tipos de enxertos, materiais e dispositivos têm sido utilizados como substitutos traqueais, com resultados pouco animadores (Grillo, 2002). O primeiro relato de alotransplante traqueal em humanos foi publicado em 1979 (Rose et al., 1979). A traquéia do doador foi inicialmente implantada no músculo esternocleidomastoideo do receptor, sendo definitivamente transplantada após três semanas. Apesar do sucesso inicial, nenhuma informação sobre o seguimento no longo prazo foi disponibilizada. Desde então, alguns relatos de transplante traqueal em humanos foram esporadicamente publicados. As abordagens utilizadas variaram desde o uso de aloenxerto de aorta até técnicas complexas com

uso de engenharia de tecidos (Wurtz et al., 2006; Macchiarini et al., 2008; Delaere et al., 2010).

Apesar dos relatos de caso, não existe, até o presente, um método padrão de transplante traqueal que possa ser aplicado na prática clínica (Grillo, 2002; Kucera et al., 2007). Isto se deve fundamentalmente a dois grandes obstáculos: 1) a necessidade de imunossupressão prolongada para manter a viabilidade do enxerto; e 2) a dificuldade em prover vascularização adequada ao enxerto após o implante.

## **1.4 Impedimentos ao transplante traqueal**

### **1.4.1 Necessidade de imunossupressão prolongada**

#### **1.4.1.1 Antigenicidade traqueal**

Ao contrário do que se pensava no passado, a traquéia apresenta uma forte atividade antigênica, com imunização sistêmica semelhante à ocorrida com outros órgãos sólidos (Beigel e Müller-Ruchholtz, 1984). Shaari et al. (1998) estudaram a distribuição dos antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *human leukocyte antigen*) classe I e II, responsáveis pelo reconhecimento imune, em vários tecidos traqueais. Os autores observaram que a mucosa traqueal e os condrócitos eram os tecidos que mais expressavam HLA. O pericôndrio apresentava expressão fraca e irregular, enquanto a matriz cartilaginosa não expressava HLA. Como a maioria dos

condrócitos permanece isolada na matriz cartilaginosa, a mucosa traqueal foi implicada como o tecido traqueal imunogenicamente mais importante.

Fernández et al. (2004) estudaram a função imunogênica do epitélio respiratório em um modelo de transplante traqueal. Utilizando transplantes seqüenciais ortotópicos e heterotópicos em ratos com complexo de histocompatibilidade principal (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) sabidamente diferentes, eles demonstraram que a resposta imune é desencadeada primariamente pelo epitélio traqueal.

Além da forte expressão de antígenos HLA classe I e II, a ação de um tipo de célula apresentadora de antígeno, conhecida como célula dendrítica, também está implicada na forte atividade antigênica do epitélio traqueal. As células dendríticas são encontradas em vários órgãos sólidos. No trato respiratório, as células dendríticas formam uma rede celular estreitamente ligada ao epitélio respiratório e à submucosa das vias aéreas (Upham e Stick, 2006). Após o transplante de órgãos sólidos, as células dendríticas presentes nos enxertos atuam na apresentação de antígenos do doador ao sistema imune do receptor, favorecendo a rejeição imune (Gould e Auchincloss Jr., 1999; Cleven et al., 2005).

#### **1.4.1.2 Desvantagens da imunossupressão prolongada**

A necessidade de imunossupressão após o transplante traqueal tem sido uma importante limitação para a utilização clínica desta modalidade terapêutica. Uma vez que as drogas imunossupressoras utilizadas após transplantes não tem ação apenas na resposta imunológica ao enxerto, mas

comprometem a resposta do sistema imune de forma não-seletiva, existe uma incidência elevada de infecções oportunistas em usuários dessas medicações (McNell et al., 2003). Além disso, outros efeitos colaterais dos imunossupressores, como nefrotoxicidade, osteoporose, hipertensão arterial e diabetes, entre outros, aumentam significativamente os riscos da imunossupressão prolongada (Lu et al., 2006). Desta feita, os efeitos deletérios da terapia de imunossupressão prolongada são muito mais graves do que os problemas enfrentados com a utilização de próteses traqueais em humanos (Grillo, 2004d). Esta constatação torna indefensável o uso de imunossupressão prolongada após o transplante traqueal (Grillo, 2002; Birchall e Macchiarini, 2008).

#### **1.4.1.3 Reepitelização e antigenicidade traqueal**

Apesar da forte antigenicidade do epitélio respiratório, algumas evidências recentes têm apontado para a possibilidade de que a imunossupressão crônica não seja fundamental após o transplante traqueal. Esta possibilidade foi inicialmente sugerida pelos achados de Ikonen et al. (2000). Esses autores desenvolviam um modelo de transplante traqueal ortotópico alogênico em ratos, sem uso de imunossupressão, para estudo da bronquiolite obliterante, uma grave complicação tardia do transplante pulmonar. Neste estudo, os autores demonstraram que a região do enxerto apresentava sinais de um processo agudo de rejeição nos primeiros dias após o transplante. Contudo, a este processo se seguia uma substituição do epitélio respiratório do doador pelo

epitélio do receptor na região do enxerto dos ratos sobreviventes. Essa substituição epitelial estava associada à diminuição do infiltrado inflamatório do enxerto no pós-operatório tardio.

Ito et al. (2002) também evidenciaram a substituição epitelial em um modelo de transplante traqueal ortotópico e heterotópico, seqüencial, em ratos alogênicos. Foi observado que a substituição do epitélio respiratório do doador pelo epitélio do receptor ocorria cerca de 15 dias após o transplante. Também foi demonstrado que ratos tratados com tacrolimus, um fármaco imunossupressor largamente empregado em pacientes transplantados, evoluíam para rejeição do enxerto. Os autores atribuíram esse fato à inibição do processo de substituição epitelial pelo tacrolimus. De fato, Ito et al. (2004) observaram uma sobrevida elevada de ratos submetidos a transplante traqueal ortotópico alogênico nos quais a imunossupressão com tacrolimus teve o início retardado para 10 dias após o transplante.

Genden et al. (2003a) utilizaram um modelo experimental semelhante ao de Ito et al. (2002), e também evidenciaram a substituição do epitélio respiratório do doador pelo epitélio do receptor, em enxertos traqueais ortotópicos implantados em ratos alogênicos. Esses autores denominaram o fenômeno de reepitelização. Genden et al. (2003a) observaram ainda que nos enxertos traqueais heterotópicos não houve reepitelização, favorecendo a hipótese de que as células epiteliais do receptor se originam da própria via aérea. O uso de ciclosporina A (outro fármaco imunossupressor muito utilizado clinicamente) pareceu favorecer o processo de reepitelização, ao contrário do que foi observado com o tacrolimus. Genden et al. (2003b)

---

demonstraram que quando o transplante traqueal ortotópico é seguido de imunossupressão com ciclosporina A, o tempo necessário para reepitelização é menor do que aquele observado em ratos transplantados sem imunossupressão. Também foi evidenciado que a reepitelização ocorre inicialmente na parede posterior do enxerto traqueal, progredindo a partir daí para toda a sua circunferência (Genden et al., 2003b).

Dada a evidência da reepitelização, foi aventada a possibilidade de que a imunossupressão prolongada poderia ser dispensável em indivíduos submetidos a transplante traqueal ortotópico. Nessa condição, a imunossupressão talvez fosse necessária apenas por um período curto após o transplante. Para testar essa hipótese, Cleven et al. (2005) utilizaram um modelo de transplante traqueal ortotópico e heterotópico, seqüencial, em ratos alogênicos. A imunossupressão foi mantida com ciclosporina A por 50 dias após o transplante, seguida por um período de mais 50 dias sem imunossupressão. Os autores observaram que não houve evidências de rejeição crônica nessas condições, apesar de um aumento na resposta específica de linfócitos T citotóxicos.

O fenômeno da reepitelização, apesar de ainda incompletamente compreendido, deu um novo alento à possibilidade de utilização clínica do transplante traqueal. Uma vez que o epitélio é o principal responsável pela imunogenicidade da traquéia, e uma vez que o epitélio do doador é substituído progressivamente pelo epitélio do receptor, não existiria mais a necessidade de imunossupressão prolongada após o transplante traqueal.

## **1.4.2 Vascularização do enxerto traqueal**

### **1.4.2.1 Anatomia da irrigação traqueal**

As evidências que se acumularam sobre a utilização de enxertos traqueais tornam clara a necessidade da vascularização do enxerto para o sucesso do transplante de via aérea (Grillo, 2002). Contudo, a vascularização do enxerto traqueal é dificultada pelas particularidades anatômicas da sua irrigação sanguínea. A irrigação da traquéia se dá de forma segmentar, não havendo ramo arterial ou venoso principal para o órgão. A metade proximal da traquéia é irrigada por três ramos traqueoesofágicos da artéria tireóidea inferior, dois dos quais também contribuem para a irrigação do esôfago. A artéria tireóidea superior também contribui, embora de forma menos importante, para a irrigação traqueal, uma vez que irriga o istmo da tireóide e também se anastomosa com a artéria tireóidea inferior. A metade distal da traquéia e a carina traqueal são irrigadas por ramos das artérias brônquicas (Grillo, 2004a).

### **1.4.2.2 Revascularização do enxerto traqueal**

A revascularização dos enxertos traqueais através dos tecidos adjacentes só costuma ocorrer 12 a 15 dias após o implante (Siegelman et al., 1977; Sung e Won, 2001). Este período de isquemia elevado torna inviável o implante de enxertos traqueais longos sem o uso de estratégias específicas de vascularização. Para contornar este problema, foram propostos vários métodos

de revascularização do enxerto traqueal. Estes métodos podem ser classificados em indiretos, diretos ou farmacológicos (Nakanishi, 2007).

Entre os métodos de revascularização indireta mais estudados estão a transposição muscular, o retalho de pleura e a transposição de omento (Rose et al., 1979; Morgan et al., 1982; Fell et al., 1985; Anderson e Miller, 1995). Dentre estes, o método que promove uma revascularização mais efetiva é a transposição de omento. Contudo, a irrigação sangüínea de enxertos traqueais ortotópicos através do omento só começa a ser efetiva após 4 a 5 dias (Hirata et al., 1992).

Alguns métodos de revascularização direta também foram descritos. A grande vantagem desses métodos é a óbvia revascularização imediata do enxerto. Macchiarini et al. (1995a e 1995b) descreveram modelos de transplante traqueal e esofágico, heterotópico e ortotópico, com revascularização arterial e venosa direta em porcos. Apesar do sucesso na revascularização no seguimento de 30 dias na maioria dos casos, a técnica empregada é considerada tecnicamente complicada, sendo dificilmente aplicável no contexto clínico (Pêgo-Fernandes e Azevedo-Pereira, 2009).

Entre os métodos de revascularização farmacológica estão o uso sistêmico de corticosteróides, associados ou não a prostaglandinas, e a aplicação tópica de fatores de angiogênese (Inui et al., 1993; Smith et al., 1994; Albes et al., 1994; Jadcuk, 1998). Olech et al. (1991) testaram pela primeira vez o uso tópico de uma substância angiogênica, o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF, do inglês *basic fibroblast growth factor*). Os autores associaram essa substância à transposição de omento, em um modelo de autotransplante traqueal heterotópico em coelhos. Neste

trabalho, os autores não observaram benefício no uso de bFGF. Contudo, Albes et al. (1994) realizaram um experimento semelhante, também em coelhos, utilizando uma base de cola de fibrina embebida com uma dose de bFGF cerca de 250 vezes maior do que a administrada por Olech et al.(1991). Com a dose maior de bFGF, foi evidenciado um aumento significativo na revascularização do enxerto 14 dias após o transplante. Mayer et al. (1991), utilizando um modelo de autotransplante traqueal heterotópico em ratos, também demonstraram melhora na revascularização precoce no grupo em que o bFGF era administrado continuamente através de uma minibomba osmótica. Sung e Won (2001), utilizando um modelo de autotransplante ortotópico em coelhos, demonstraram que o uso tópico isolado de bFGF melhora a revascularização precoce dos enxertos, quando comparado com a transposição de omento. Em um modelo de autotransplante de uma porção da parede anterior da traquéia em coelhos, Dodge-Khatami et al. (2001) também observaram melhora da revascularização dos enxertos com o uso de um fator de angiogênese. Neste caso, os enxertos eram previamente embebidos em uma solução composta por fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*).

O uso tópico de fatores de crescimento parece ser o método mais promissor de revascularização de enxertos traqueais. O uso dessas substâncias se compara em efetividade aos métodos de revascularização direta, com a vantagem de ser tecnicamente de muito mais fácil execução (Nakanishi, 2007).

## 1.5 Isquemia e preservação traqueal

Vários avanços foram obtidos nos últimos anos no âmbito da imunobiologia traqueal e dos métodos de revascularização do enxerto. Contudo, o transplante traqueal não será exeqüível clinicamente sem o conhecimento detalhado dos efeitos da isquemia sobre a funcionalidade do enxerto traqueal. Mormente no que diz respeito aos efeitos da isquemia sobre a depuração mucociliar.

Alguns autores acreditam que devido à sua estrutura anatômica e funcional, a traquéia apresentaria necessidades metabólicas menores do que a maioria dos outros órgãos sólidos (Nakanishi et al., 2000). Desta feita, o enxerto traqueal poderia ser submetido à isquemia durante períodos maiores do que aqueles suportados por outros órgãos. Entretanto, outros autores advertem que períodos de isquemia muito prolongados podem levar a necrose, estenose e deiscência do enxerto traqueal (Sung e Won, 2001). Por este motivo, a utilização de estratégias de preservação específicas seria fundamental para a manutenção da viabilidade do enxerto traqueal.

A principal função das estratégias de preservação de órgãos sólidos é prover o enxerto das condições necessárias para seu adequado funcionamento após o implante. Portanto, a preservação traqueal visa principalmente: 1) a manutenção das propriedades biomecânicas do enxerto, a fim de permitir a adequada condução de ar para a hematose; e 2) a manutenção da adequada depuração mucociliar até que se complete a reepitelização.

### 1.5.1 Soluções de preservação

Uma das estratégias utilizadas para diminuir os efeitos da isquemia e, principalmente, da lesão de isquemia-reperfusão sobre os órgãos sólidos é a administração de soluções de preservação (de Perrot et al., 2003). Três objetivos são almejados com o uso das soluções de preservação: a) o rápido resfriamento do enxerto, e a retirada de sangue e coágulos de sua vasculatura; b) a prevenção do edema celular e intersticial; e c) a prevenção da acidose celular excessiva (Panzera et al., 2005). Para alcançar esses objetivos, várias soluções foram desenvolvidas. Estas soluções podem ser classificadas em dois grupos principais, a saber, soluções do tipo intracelular e soluções do tipo extracelular (Kelly, 2000). As soluções de preservação do tipo intracelular apresentam alta concentração de potássio e baixa concentração de sódio. São exemplos de soluções do tipo intracelular a Euro-Collins e a solução da Universidade de Wiscosin. As soluções de preservação do tipo extracelular apresentam baixa concentração de potássio e alta concentração de sódio. Como exemplos de soluções do tipo intracelular podem ser citadas a LPD-glicose e a Celsior (Kelly, 2000; de Perrot et al., 2003).

A solução mais utilizada para preservação pulmonar e, conseqüentemente, de vias aéreas é a LPD-glicose. Esta solução é a única desenvolvida especialmente para pulmão. Suas vantagens principais são a baixa concentração de potássio e a presença de dextrano 40. Este polissacarídeo contribui para melhorar o fluxo na microcirculação pulmonar e preserva a

interface endotélio-epitélio, reduzindo a intensidade de extravasamento de água e proteínas quando da reperfusão (Keshavjee et al., 1992).

A partir de estudos sobre soluções de cardioplegia para uso em cirurgias cardíacas no final da década de 1970, foi desenvolvido outro tipo de solução de preservação, chamada solução Histidina-Triptofano-Cetoglutarato (HTK) (Bretschneider, 1980). Apesar de ser considerada como uma solução de preservação do tipo extracelular, a HTK apresenta baixas concentrações tanto de potássio como de sódio (Mühlbacher et al., 1999). A HTK também difere das outras soluções por dispor de histidina como sistema tampão e não de sais de bicarbonato ou fosfato (Mühlbacher et al., 1999). Alguns estudos clínicos mostraram equivalência da HTK em comparação com a solução da Universidade de Wisconsin no transplante hepático, renal e pancreático, havendo vantagem da HTK pelo menor custo (Becker et al., 2007; Feng et al., 2007; Klaus et al., 2007). Entretanto, poucos estudos avaliaram o uso de HTK em preservação pulmonar. Utilizando um modelo de isquemia morna em porcos, Luh et al. (2004) observaram melhora da lesão de isquemia-reperfusão quando a HTK foi utilizada em comparação com a Euro-Collins. Warnecke et al. (2002) também evidenciaram melhora na lesão de isquemia-reperfusão com a HTK quando comparada com a Euro-Collins em pulmões de porcos submetidos a períodos curtos de isquemia fria. Contudo, esses autores não observaram benefício da HTK em relação ao Celsior nesse modelo (Warnecke et al. 2002).

Apesar do conhecimento acumulado sobre as soluções de preservação no transplante pulmonar, o uso de soluções para preservação

específica de enxertos traqueais ainda é muito pouco estudado. Macchiarini et al. (1995a) estudaram o efeito da Euro-Collins, administrada por via intravascular, sobre enxertos traqueais em um modelo de transplante em porcos. Foi evidenciado que, os enxertos submetidos a um período de até 3 a 4 horas de isquemia fria, apresentavam o epitélio respiratório e a musculatura lisa preservados morfológicamente após o implante. Os mesmos autores também analisaram o efeito da preservação com Euro-Collins após tempos de isquemia mais prolongados sobre a viabilidade do enxerto traqueal em um modelo semelhante (Macchiarini et al., 1995b). Foi observado que, após serem submetidos a um período de isquemia fria de até 15 horas, os enxertos se mantinham viáveis. Contudo, todos os enxertos submetidos a isquemia por 24 horas evoluíram com necrose poucos dias após o implante.

O uso de soluções de preservação por via intravascular para a preservação de enxertos traqueais é factível, mas apresenta problemas técnicos semelhantes àqueles enfrentados para a vascularização direta do enxerto. A irrigação segmentar da traquéia torna a perfusão difícil de ser executada clinicamente. Por esse motivo, foi aventada a possibilidade de utilizar uma via tecnicamente mais fácil para a administração das soluções de preservação: a administração tópica. Teoricamente, duas características anatômicas da traquéia favorecem o uso tópico das soluções de preservação. Primeiro, a estrutura cartilaginosa semi-rígida mantém o lúmen traqueal aberto mesmo após a extração do enxerto, favorecendo a exposição contínua do epitélio traqueal. Segundo, a traquéia é um órgão

tubular, formado fundamentalmente por finas camadas de tecido epitelial, conjuntivo frouxo, cartilaginoso e muscular liso, perfazendo cerca de apenas 03 mm de espessura (Grillo, 2004a). Essa disposição anatômica tornaria possível a difusão, ao menos parcial, de substâncias presentes nas soluções de preservação para os tecidos traqueais.

A efetividade da estratégia de administração de soluções de preservação por via tópica deve ser testada pela avaliação do impacto desta estratégia na manutenção das funções do enxerto traqueal. Uma dessas funções, a depuração mucociliar, se mantém mesmo após a retirada do enxerto (Pazetti et al., 2007). Portanto, a avaliação morfológica e funcional do enxerto traqueal antes do implante seria não só possível como necessária.

## **1.6 O epitélio respiratório e a depuração mucociliar**

O epitélio respiratório é uma camada celular contínua, presente nas vias aéreas proximais e em suas ramificações até cerca da 23ª geração. Nas vias aéreas maiores, o epitélio respiratório é pseudoestratificado, tornando-se colunar ou cubóide nas pequenas vias aéreas. As células mais importantes do epitélio respiratório humano são as ciliadas, colunares, indiferenciadas, secretoras, de Clara e basais (Crystal et al., 2008). Dentre as funções do epitélio respiratório, duas delas podem ser apontadas como as mais importantes. Uma dessas funções é a manutenção da permeabilidade das vias aéreas, permitindo a condução adequada de ar entre o meio ambiente e os

alvéolos (Qu et al., 2005). A outra função é a defesa do sistema respiratório, pela ação da depuração mucociliar (Houtmeyers et al., 1999).

Diariamente, o ser humano inala cerca de 12.000 litros de ar do meio ambiente, carreando cerca de 25 milhões de partículas por hora para o interior das vias aéreas (Seaton et al., 1995). A fim de proteger o sistema respiratório dessa agressão contínua, o epitélio das vias aéreas desenvolveu um mecanismo inato chamado depuração mucociliar (Knowles e Boucher, 2002). Por meio da depuração mucociliar as partículas presentes no ar inalado se aderem ao muco presente na superfície do epitélio respiratório, são transportadas em sentido proximal para as vias aéreas superiores e, por fim, são expelidas, valendo-se da deglutição ou da tosse. A depuração mucociliar ocorre através de um mecanismo complexo, que envolve tanto a produção e a manutenção das propriedades físicoquímicas do muco, quanto a propulsão desse muco por meio do batimento ciliar (Randell et al., 2006).

### **1.6.1 O líquido superficial das vias aéreas**

O líquido superficial das vias aéreas é uma solução aquosa complexa, com cerca de 6 a 20 micrômetros de espessura, que está presente sobre o epitélio respiratório (Wu et al., 1996). É composto por cerca de 1% de sais inorgânicos; 0,5 a 1% de proteínas livres; 1 a 2% de glicoproteínas ricas em carboidratos chamadas mucinas; e 95% ou mais de água (Houtmeyers et al., 1999; Rogers, 2007). O líquido superficial das vias aéreas é formado por uma camada mais densa e superficial, chamada muco ou fase gel, e uma

camada menos densa e mais profunda, chamada líquido periciliar ou fase sol. O líquido superficial das vias aéreas possui as funções de umidificação do ar inalado; lubrificação do epitélio respiratório, permitindo o funcionamento ciliar adequado; inativação de agentes agressores exógenos, quer sejam partículas inorgânicas, gases ou microorganismos; e condução desses agentes agressores para fora das vias aéreas, por meio da depuração mucociliar (Rogers, 2007).

A camada de muco do líquido superficial das vias aéreas é composta principalmente de mucinas. As mucinas são macromoléculas ricamente glicosiladas, produzidas e secretadas pelas células caliciformes do epitélio respiratório, e pelas glândulas seromucosas presentes na submucosa das vias aéreas proximais (Knowles e Boucher, 2002; Rogers, 2007). São as mucinas que promovem a adesão dos agentes agressores orgânicos e inorgânicos ao muco, permitindo a depuração satisfatória das vias respiratórias. Além disso, a camada de muco parece funcionar como uma reserva de água para o líquido periciliar durante certas condições que diminuem a hidratação dessa camada, na tentativa de preservar a função propulsora do epitélio ciliado.

O líquido periciliar é a camada menos densa do líquido superficial das vias aéreas. Ele está disposto entre o epitélio respiratório e a camada de muco. Sua função principal é permitir o batimento adequado dos cílios presentes no epitélio, promovendo o transporte mucociliar efetivo. Outra função do líquido periciliar é manter a camada de muco afastada do epitélio respiratório, evitando que as mucinas presentes no muco adiram às mucinas

presentes na superfície celular epitelial, o que inibiria a depuração mucociliar provocada pela tosse (Randell et al., 2006).

O líquido superficial das vias aéreas considerado ideal possui um componente suficientemente elástico capaz de transferir o movimento dos cílios à camada de muco, e um componente deformável o suficiente para promover o deslocamento do muco a partir do batimento ciliar (Saldiva, 1990; Rivero et al., 2001).

### **1.6.2 As células ciliadas e o batimento ciliar**

As células ciliadas têm forma colunar e estão presentes em toda a extensão da árvore traqueobrônquica. Na traquéia, as células ciliadas são mais numerosas nas regiões do epitélio respiratório que repousam entre os anéis cartilagosos (Oliveira et al., 2003). Cada célula ciliada possui cerca de 200 cílios na superfície apical livre (Sleigh et al., 1988).

Os cílios são prolongamentos citoplasmáticos que funcionam como organelas móveis, medindo cerca de 6 micrômetros de comprimento por 0,2 micrômetros de diâmetro (Alexander et al., 1975). Cada cílio apresenta em seu cerne uma rede de nove pares de microtúbulos periféricos que envolvem um par central, formando um padrão básico 9 + 2. Os cílios se ancoram na célula ciliada por meio de uma estrutura denominada corpúsculo basal (Friedmann e Bird., 1971). Quimicamente, os cílios são formados por heterodímeros de alfa e beta-tubulina, dineína e mais outras 200 proteínas. É a hidrólise do ATP pela dineína que promove o batimento ciliar, no sentido proximal, sincrônico, numa

freqüência de 10 a 20 Hz (Sleigh et al., 1988). A depender da localização da célula ciliada na via aérea e da espécie do animal utilizado na avaliação, a quantidade de cílios por célula, o comprimento dos cílios e a freqüência de batimento ciliar podem variar (Joki et al., 1995).

O batimento ciliar apresenta duas fases: uma fase propulsiva, e uma fase de recuperação. Na fase propulsiva, o cílio se move no sentido proximal e sua extremidade penetra cerca de 0,5 micrômetros na camada de muco e a impele no mesmo sentido (Smith et al., 2008). Na fase de recuperação, o cílio se move no sentido distal, retornando para a posição inicial sem tocar na camada de muco, não havendo, desta forma, movimento efetivo de muco nesta fase (Smith et al., 2008).

### **1.6.3 Ação da isquemia sobre a depuração mucociliar**

A ação sobre a depuração mucociliar de vários agentes como temperatura, secção brônquica e fármacos é conhecida (Houtmeyers et al., 1999; Rivero et al., 2001; Pazetti et al., 2008). Contudo, existem poucos dados acerca dos efeitos da isquemia sobre a depuração mucociliar. Wagner et al. (1996) estudaram a ação da isquemia na depuração mucociliar em um modelo de hipoperfusão brônquica seletiva em ovelhas. Neste experimento foi evidenciada uma redução significativa na depuração mucociliar após apenas 20 minutos de isquemia. Os efeitos de períodos prolongados de isquemia fria sobre a depuração mucociliar de mamíferos são pouco conhecidos.

## **2 OBJETIVOS**

---

### **2.1 Gerais**

**2.1.1.** Avaliar a ação da isquemia fria sobre a depuração mucociliar de enxertos traqueais.

**2.1.2.** Avaliar a ação de soluções de preservação administradas por via tópica na depuração mucociliar de enxertos traqueais.

### **2.2 Específicos**

**2.2.1.** Avaliar se o uso de soluções de preservação administradas por via tópica é efetivo para a manutenção da depuração mucociliar de enxertos traqueais submetidos a diferentes períodos de isquemia fria com duração de até 24 horas.

**2.2.2.** Avaliar se o uso de soluções de preservação administradas por via tópica é efetivo para a manutenção da integridade morfológica do epitélio respiratório de enxertos traqueais submetidos a diferentes períodos de isquemia fria com duração de até 24 horas.

### **3 MÉTODOS**

---

Este trabalho foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) (Protocolo SCD 3058/07/133) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HCFMUSP (Protocolo nº 1092/07). O trabalho foi executado no Laboratório Pesquisa em Cirurgia Torácica (LIM-61) do HCFMUSP, em associação com o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LIM-05) do HCFMUSP.

A execução do experimento foi balizada pelos princípios éticos da experimentação animal, regidos pela lei nº 6.638 de 8 de maio de 1979, revogada pela lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

#### **3.1 Sacrifício e Obtenção das peças**

Foram utilizados 109 ratos machos da raça Wistar, adultos, com média de peso 300g. Os animais foram anestesiados com administração intraperitoneal de tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália, Brasil) na dose

50mg/kg de peso. Após a indução anestésica, os animais foram submetidos a uma cervicoesternolaparotomia. A operação foi realizada com técnica limpa, não estéril. Após dissecação romba do retroperitônio, foi identificada a aorta abdominal. Em seguida, foi realizada eutanásia pelo método da exsangüinação, por meio da secção da aorta abdominal. Após a eutanásia, a traquéia foi cuidadosamente dissecada e extraída. A traquéia foi então seccionada transversalmente, aproximadamente à meia distância entre o primeiro anel traqueal e a carina traqueal, obtendo-se um segmento proximal e outro distal. Cada segmento traqueal foi designado como peça. Cada peça foi acondicionada imediatamente após a extração conforme descrito a seguir.

### **3.2 Desenho do estudo**

O desenho do estudo se pautou na administração por via tópica de soluções de preservação, tendo como base as características anatômicas próprias da traquéia. Mesmo após a extração, o lúmen traqueal se mantém aberto, permitindo a exposição constante do epitélio traqueal às soluções de preservação quando da administração tópica. Ainda, a traquéia é composta por finas camadas de tecido epitelial, conjuntivo frouxo, cartilaginoso e muscular liso (Grillo, 2004a). Essa disposição anatômica tornaria possível a difusão, ao menos parcial, de substâncias presentes nas soluções de preservação administradas por via tópica para os tecidos traqueais. Além disso, a irrigação sanguínea da traquéia se dá de forma segmentar, sendo

ausente um vaso arterial ou venoso traqueal próprio. Esta particularidade torna a administração intravascular de soluções de preservação difícil de ser executada no cenário clínico.

As peças foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos: um grupo controle + três grupos experimentais (Grupo Salina, Grupo LPD e Grupo HTK) (Figura 1).

Nos três grupos experimentais as peças foram dispostas em um recipiente plástico estéril, submergidas em um tipo de solução de preservação conforme o grupo e acondicionadas em um refrigerador à temperatura de 4°C. Cada um dos grupos experimentais era dividido em quatro subgrupos, conforme o período de isquemia fria a que cada peça era submetida: 06 horas, 10 horas, 16 horas ou 24 horas. A escolha dos tempos de isquemia se baseou em trabalhos que estudaram o efeito da isquemia e do uso de soluções de preservação sobre enxertos traqueais (Macchiarini et al., 1995b; Nakanishi et al., 2000). Ao término do período de isquemia previsto, cada peça foi submetida à avaliação funcional conforme descrito a seguir. Após a avaliação funcional, as peças foram preparadas para avaliação morfológica conforme descrito a seguir.

As peças incluídas no grupo controle foram analisadas logo após a extração, não sendo submergidas em solução de preservação nem submetidas a períodos de isquemia.

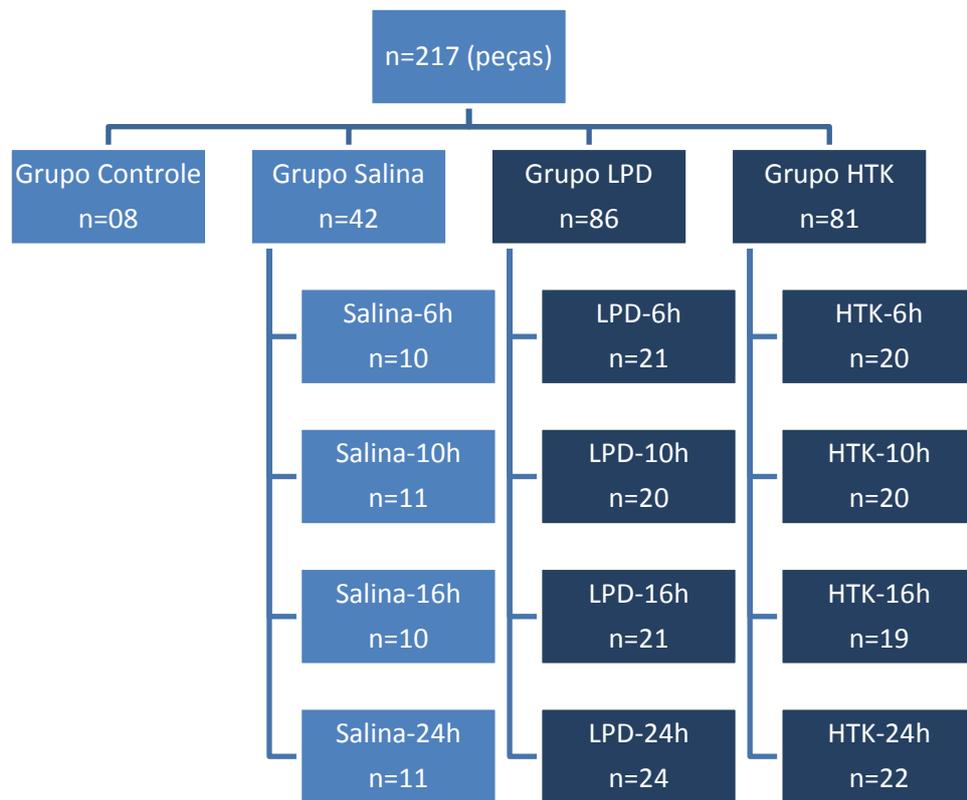


Figura 1: Desenho do estudo

Segue a descrição dos grupos de estudo:

- Grupo Controle: Composto de 04 ratos – 08 peças.
- Grupo Salina. Composto de 21 ratos, utilizando-se soro fisiológico como solução de preservação, dividido em:
  - Salina-6h: Composto por 10 peças com tempo de isquemia de 06 horas.
  - Salina-10h: Composto por 11 peças com tempo de isquemia de 10 horas.
  - Salina-16h: Composto por 10 peças com tempo de isquemia de 16 horas.
  - Salina-24h: Composto por 11 peças com tempo de isquemia de 24 horas.

– Grupo LPD. Composto de 43 ratos, utilizando-se LPD-glicose como solução de preservação, dividido em:

LPD-6h: Composto por 21 peças com tempo de isquemia de 06 horas.

LPD-10h: Composto por 20 peças com tempo de isquemia de 10 horas.

LPD-16h: Composto por 21 peças com tempo de isquemia de 16 horas.

LPD-24h: Composto por 24 peças com tempo de isquemia de 24 horas.

– Grupo HTK. Composto por 41 ratos, utilizando-se Histidina-Triptofano-Cetoglutarato como solução de preservação, dividido em:

HTK-6h: Composto por 20 peças com tempo de isquemia de 06 horas.

HTK-10h: Composto por 20 peças com tempo de isquemia de 10 horas.

HTK-16h: Composto por 19 peças com tempo de isquemia de 16 horas.

HTK-24h: Composto por 22 peças com tempo de isquemia de 24 horas.

Nos grupos LPD e HTK foram incluídas cerca de duas vezes mais peças do que no grupo Salina. Isto ocorreu pelo fato do grupo Salina apresentar a função de controle negativo para os demais grupos. O

conhecimento prévio sobre a diminuição da depuração mucociliar com o uso da solução salina em modelos experimentais, e a sabida ausência de função preservadora da solução salina para outros órgãos sólidos foram a base desta consideração (Trindade et al., 2007).

### **3.3 Avaliação funcional**

A função de depuração mucociliar do epitélio traqueal foi avaliada pelas medidas da velocidade de transporte mucociliar *in situ* e pela medida da frequência de batimento ciliar. Ambas as análises funcionais foram realizadas no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LIM-05) do HCFMUSP.

#### **3.3.1 Análise da velocidade de transporte mucociliar *in situ***

Após o tempo de isquemia previsto, cada peça foi seccionada no plano longitudinal, na transição entre as porções cartilaginosa e membranácea, para exposição do epitélio. A peça preparada foi disposta em um microscópio de luz (Olympus BX50, Japão), com aumento final de 100 vezes, equipado com uma ocular reticulada (Figura 2).

Inicialmente, foi identificada a movimentação das partículas de muco na superfície do epitélio. Em seguida foi registrado o tempo em segundos necessário para que uma partícula de muco percorresse a distância de 50 micrômetros. A medida obtida foi convertida para milímetros por minuto

(mm/min). Cada peça teve a velocidade de transporte mucociliar *in situ* auferida três vezes. A média aritmética das três auferições foi utilizada para a análise estatística. As medidas foram realizadas por apenas um avaliador, o qual desconhecia a que grupo pertencia cada peça.

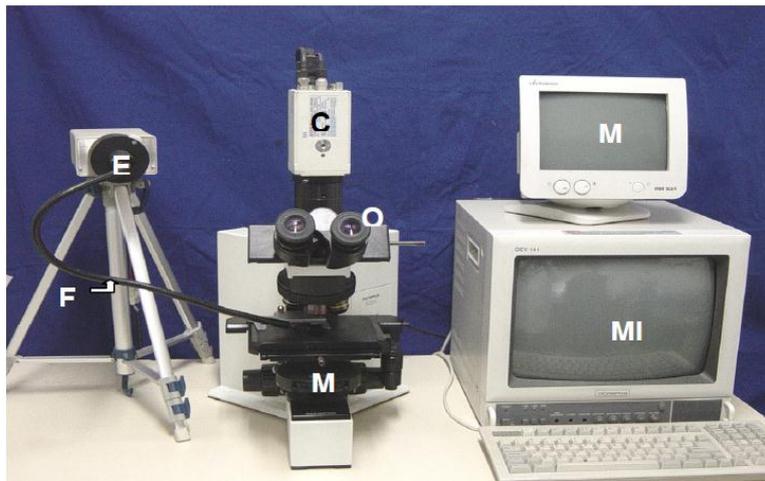


Figura 2: Equipamentos utilizados para medida da velocidade de transporte mucociliar *in situ* e da frequência de batimento ciliar. C = câmera filmadora; E = estroboscópio; F = fibra óptica; M = monitor de frequência; MI = monitor de imagem; MO = microscópio óptico; O = ocular reticulada

### 3.3.2 Medida da frequência de batimento ciliar

Logo após a medida da velocidade de transporte mucociliar *in situ*, foi realizada a medida da frequência de batimento ciliar pela técnica videoscópica.

As imagens do epitélio traqueal foram captadas por uma câmara filmadora (Sony 3CCD Iris, Japão) acoplada ao microscópio de luz, e enviadas para um monitor de vídeo (Sony Triniton, Japão) (Figura 2). Um estroboscópio (Machine Vision Scrobe 5000, U.S.A.) foi colocado em frente ao epitélio

traqueal, emitindo lampejos em determinada frequência, que era expressa numericamente por um microcomputador acoplado ao estroboscópio.

Ao mesmo tempo em que a imagem do epitélio traqueal gerada no monitor era observada, a frequência de emissão do estroboscópio era gradativamente diminuída, até o momento em que não era mais possível a percepção do movimento ciliar. Neste momento, o mesmo valor da frequência de emissões do estroboscópio registrada no computador era atribuído ao batimento ciliar, em Hertz (Hz). Para cada peça a frequência de batimento ciliar foi aferida três vezes, sendo que a média aritmética das três aferições foi utilizada para a análise estatística. A medida da frequência de batimento ciliar foi realizada por pelo menos dois avaliadores, os quais desconheciam a que grupo pertencia cada peça.

### **3.4 Avaliação Morfológica**

#### **3.4.1 Microscopia de Luz**

Após a avaliação funcional, cada peça foi fixada em solução tamponada de formaldeído a 4% por três horas e conservada em solução alcoólica a 70% até ser embebida em parafina. Os blocos de parafina foram cortados com espessura de 05 $\mu$ m, sendo obtidos de cada peça, aleatoriamente, nove cortes. Os nove cortes de cada peça foram dispostos em três lâminas (três cortes para cada lâmina), sendo realizadas três colorações diferentes conforme segue. Cada lâmina recebia apenas uma

das três colorações. Para avaliar a lesão traqueal associada à isquemia foi utilizada hematoxilina e eosina. Para quantificar o muco estocado nas células secretoras do epitélio traqueal foram utilizadas duas colorações: o ácido periódico - Schiff (periodic acid-Schiff - PAS), para as substâncias neutras do muco; e o azul de alciano, para as substâncias ácidas do muco.

#### **3.4.1.1 Hematoxilina e eosina**

As lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina foram examinadas com o auxílio de um microscópio de luz (Axioskop 2 plus, Zeiss, Alemanha). Cada lâmina foi avaliada por três observadores independentes, os quais desconheciam a que grupo cada peça pertencia. As análises foram realizadas com o auxílio de uma escala semiquantitativa baseada no trabalho de Qu et al (2005).

##### **3.4.1.1.1 Avaliação da integridade epitelial**

A integridade epitelial foi auferida pela utilização de uma escala semiquantitativa. A escala apresentava três graduações:

- 01 (pouca integridade), quando o epitélio respiratório estava presente em até 1/3 da superfície traqueal interna;
- 02 (integridade moderada), quando havia epitélio respiratório presente em mais que 1/3, mas menos que 2/3 da superfície traqueal interna;
- 03 (integridade alta), quando havia epitélio respiratório em mais que 2/3 da superfície traqueal interna.

A quantificação final foi obtida ou pela concordância da graduação estipulada para cada lâmina por pelo menos dois observadores ou, em caso de divergência entre os três observadores, pela graduação do observador sênior.

#### **3.4.1.1.2 Avaliação da inflamação subepitelial**

A inflamação subepitelial foi auferida pela graduação da infiltração celular subepitelial valendo-se de uma escala semiquantitativa. A escala apresentava três graduações:

- 01 (inflamação leve), quando havia infiltração celular esparsa ou difusa, sem a presença de ilhas de infiltrado denso;
- 02 (inflamação moderada), quando havia infiltração celular mais intensa, com até duas ilhas de infiltrado denso;
- 03 (inflamação intensa), quando havia uma camada espessa de infiltração celular, ou mais de duas ilhas de infiltrado denso.

A quantificação final foi obtida ou pela concordância da graduação estipulada para cada lâmina por pelo menos dois observadores ou, em caso de divergência entre os três observadores, pela graduação do observador sênior.

### 3.4.1.2 Azul de alciano e PAS

As colorações azul de alciano e PAS foram utilizadas para quantificar o muco presente nas células secretoras do epitélio respiratório submetido a isquemia. Foi utilizado o programa Axiovision 4.7 (Zeiss, Alemanha), instalado em um microcomputador conectado a uma câmara fotográfica digital (AxioCam, Zeiss, Alemanha). Esta câmara fotográfica digital estava acoplada a um microscópio de luz (Axio Imager.A1, Zeiss, Alemanha).

Inicialmente, cada lâmina foi disposta no microscópio de luz com aumento final de 400 vezes, sendo identificada a região mais preservada do epitélio. Em seguida a imagem foi captada pela câmara fotográfica digital (figura 3). Após a captação da imagem, a coloração alvo era determinada pelo pesquisador (figura 4). Em seguida, a área do epitélio era delimitada pelo pesquisador (figura 5). Posteriormente, o programa de computador quantificava o percentual de área corada em relação à área total delimitada. Tanto a identificação da área do epitélio no microscópio de luz, quanto a delimitação da área de epitélio no programa de computador foram realizadas por um pesquisador analisador do Serviço de Patologia do Instituto do Coração do HCFMUSP.

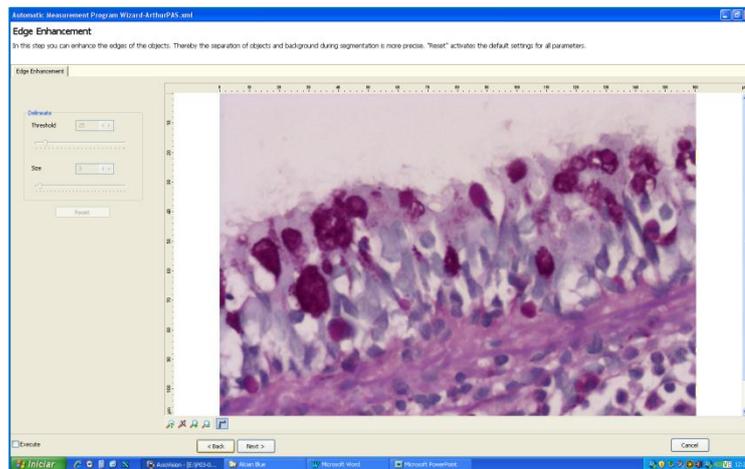


Figura 3: Captação da imagem a partir de lâmina corada com PAS pela câmara fotográfica digital. Imagem inserida no programa de computador analisador de imagem para quantificação do percentual de área corada (aumento 400x)

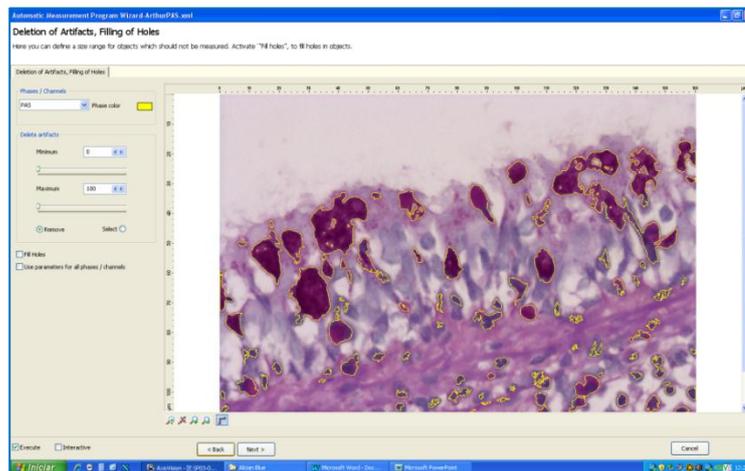


Figura 4: Determinação da coloração alvo pelo pesquisador, com o uso do programa de computador analisador de imagem (aumento 400x).

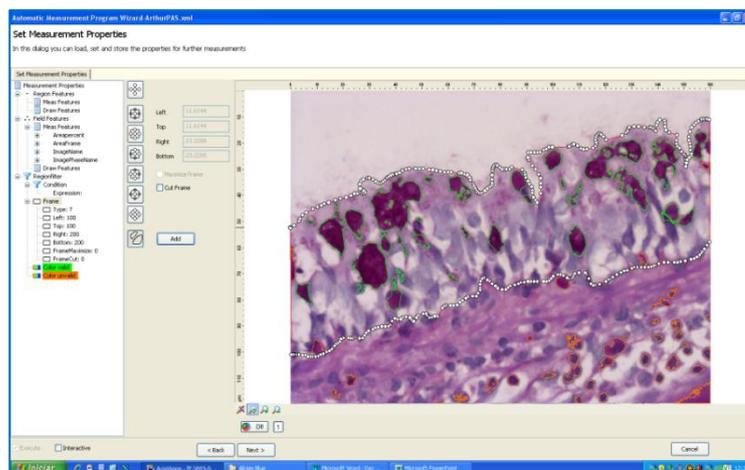


Figura 5: Delimitação do epitélio respiratório pelo pesquisador, com uso do programa de computador, para quantificação do percentual de área corada (aumento 400x).

### 3.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

De cada peça foi obtido um pequeno fragmento logo após a avaliação funcional. Os fragmentos foram fixados com glutaraldeído a 2% e ácido tânico a 0,1%, dissolvidos em tampão cacodilato de sódio 0,1M de pH 7,2 durante 2 horas em uma geladeira. A seguir, o material foi lavado em uma solução contendo tampão cacodilato de sódio 0,1M de pH 7,2 e sacarose 0,2M durante 1 hora, também na geladeira. Em seguida, o material foi pós-fixado em uma solução de tetróxido de ósmio a 1,0% em tampão cacodilato de sódio 0,1M de pH 7,2 durante 1 hora na geladeira. Após passagem pela solução de lavagem, o material foi desidratado em gradiente de etanol durante 1 hora. A etapa de pré-inclusão consistiu de passagens em misturas de acetona e resina (1:1, 1:2, 1:3) durante 3 horas, sendo que a inclusão em resina pura durou 24 horas.

Após 72 horas de polimerização da resina, os blocos foram cortados em um ultramicrótomo Reichert Ultracut S, e foram obtidos cortes semifinos (0,5 $\mu$ m), corados a quente (aproximadamente 70°C) em solução de azul de toluidina (1,25g de carbonato de sódio; 0,50g de azul de toluidina O; 50ml de água destilada). Após escolha da área mais adequada para observação, os cortes ultrafinos, dourados, com aproximadamente 90nm de espessura, foram obtidos no mesmo ultramicrótomo e contrastados por acetato de uranila a 2%, durante 30 minutos e por citrato de chumbo a 0,5% durante 10 minutos. Os cortes ultrafinos foram estudados e eletromicrofotografados em microscópio eletrônico Jeol 1200EXII (Japão).

O processamento dos fragmentos teciduais até a fase de inclusão em resina pura foi realizado pelo Serviço de Microscopia Eletrônica do Centro Multiusuário dos Laboratórios de Investigação Médica do HCFMUSP. O processamento e realização dos cortes semifinos e ultrafinos, bem como a análise e interpretação das microfotografias obtidas foi realizada pelo Centro de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e pelo Serviço de Patologia do Instituto do Coração do HCFMUSP.

Para a avaliação por microscopia eletrônica de transmissão, foram selecionadas as amostras das peças daqueles subgrupos que apresentaram maiores alterações às análises funcionais e à análise morfológica à microscopia de luz, além de amostras do grupo Controle. Cada amostra foi submetida a cortes semifinos como já descrito neste item, sendo identificadas aquelas mais adequadas para análise em cortes ultrafinos. As análises foram realizadas tendo como padrão normal as eletromicrofotografias obtidas do grupo Controle. A análise das eletromicrofotografias foi iniciada pela identificação das células que comumente compõem o epitélio respiratório, bem como de possíveis alterações na sua morfologia habitual. A seguir, foram procuradas figuras associadas a lesão celular, como vacuolizações citoplasmáticas, desagregação da membrana celular e diminuição qualitativa da densidade ciliar. Também foi analisada a presença de figuras sugestivas de necrose ou morte celular programada (apoptose).

### 3.5 Análise Estatística

Para estudo do efeito da isquemia fria sobre a depuração mucociliar, foram analisados os dados obtidos das peças do grupo Controle em comparação com as demais peças, agrupadas de acordo com os tempos de isquemia (6, 10, 16 e 24 horas).

Para estudo dos efeitos do uso tópico das soluções de preservação, as análises dos resultados foram realizadas pela comparação entre os quatro grupos (grupo Controle, Salina, LPD e HTK) em cada período de isquemia isoladamente.

Para avaliação da normalidade dos dados numéricos foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. A igualdade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Os dados numéricos assimétricos foram expressos em mediana (desvio interquartilico). Os dados numéricos normais foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os dados categóricos foram expressos em percentagem.

Para a verificação de diferença entre os quatro grupos, foi utilizada a análise de variâncias (ANOVA) de um fator ou o teste de Kruskal-Wallis, conforme mais adequado para variáveis numéricas. Foi utilizado o pós-teste de Bonferroni para comparação de médias após a ANOVA. A correção de Bonferroni foi utilizada para comparação entre os grupos após o teste de Kruskal-Wallis (Field, 2009). O teste do Qui-quadrado foi utilizado para verificar a diferença das variáveis categóricas entre os grupos.

Foi considerada significância estatística quando o valor de p foi menor que 0,05. Todos os testes foram executados com auxílio do programa de computador SPSS, versão 13.0.

## 4 RESULTADOS

---

### 4.1 Ação da isquemia fria sobre a depuração mucociliar

#### 4.1.1 Avaliação funcional

##### 4.1.1.1 Análise da velocidade de transporte mucociliar *in situ*

As medidas de dispersão para a velocidade de transporte mucociliar *in situ* estão expostos na figura 6:

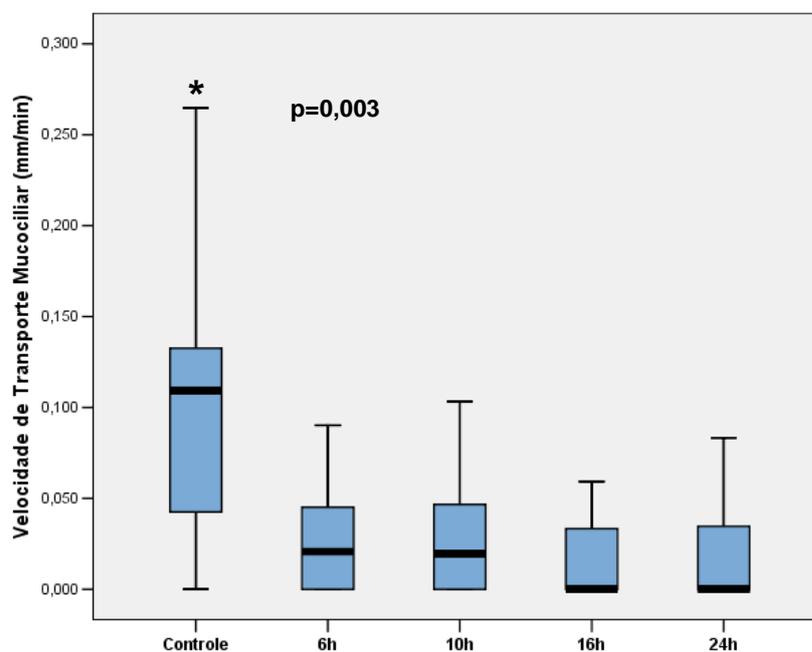


Figura 6: Velocidade de transporte mucociliar *in situ* (em mm/min) quanto ao tempo de isquemia. Grupo Controle: 0,109(0,106); 6h: 0,010(0,043); 10h: 0,019(0,053); 16h: 0(0,32); e 24h: 0(0,024). \* = diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle e os demais grupos (p=0,003)

#### 4.1.1.2 Medida da frequência de batimento ciliar

As medidas de dispersão para a frequência de batimento ciliar estão expostas na figura 7:

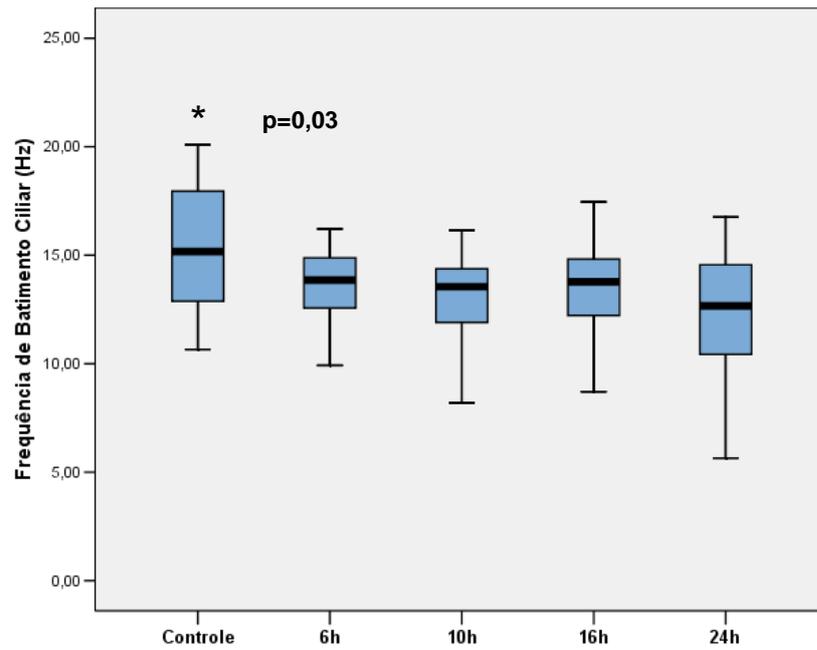


Figura 7: Frequência de batimento ciliar (em Hz) quanto ao tempo de isquemia. Grupo Controle: 15,17(6,48); 6h: 13,78(1,95); 10h: 13,59(2,67); 16h: 13,25(2,68); e 24h: 12,66(4,38). \* = diferença estatisticamente significativa entre grupo Controle e os demais grupos (p=0,03)

## 4.1.2 Avaliação morfológica

### 4.1.2.1 Microscopia de luz

#### 4.1.2.1.1 Hematoxilina e eosina

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle e os grupos dos diversos tempos de isquemia quanto à integridade epitelial ( $p=0,13$ ) e à inflamação subepitelial ( $p=0,40$ ).

#### 4.1.2.1.2 Percentual da área de epitélio respiratório corada com azul de alciano

As medidas de dispersão para o percentual de área corada com azul de alciano estão expostas na figura 8:

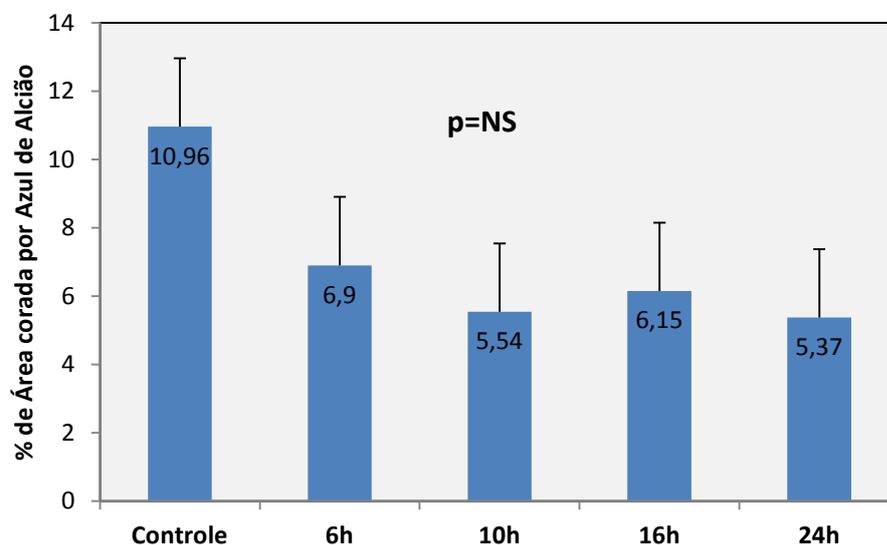


Figura 8: Percentagem de área corada por azul de alciano quanto ao tempo de isquemia. Grupo Controle:  $10,96 \pm 4,51$ ; 6h:  $6,90 \pm 5,82$ ; 10h:  $5,54 \pm 5,66$ ; 16h:  $6,15 \pm 4,04$ ; e 24h:  $5,37 \pm 4,32$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=NS$ )

#### 4.1.2.1.3 Percentual da área de epitélio respiratório corada com PAS

As medidas de dispersão para o percentual de área corada com PAS estão expostas na figura 9:

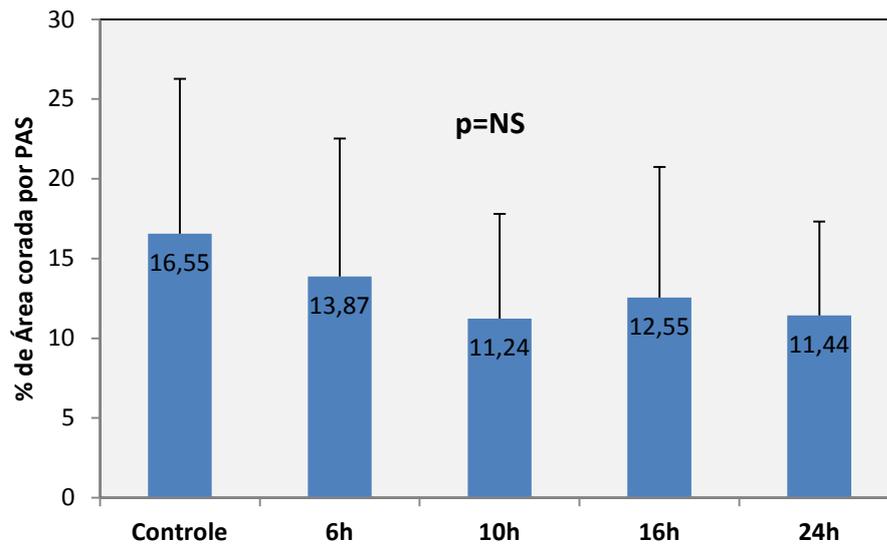


Figura 9: Percentagem de área corada por PAS quanto ao tempo de isquemia. Grupo Controle:  $16,55 \pm 9,72$ ; 6h:  $13,87 \pm 8,65$ ; 10h:  $11,24 \pm 6,56$ ; 16h:  $12,55 \pm 8,20$ ; e 24h:  $11,44 \pm 5,88$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=NS$ )

## 4.2 Ação das soluções de preservação de uso tópico sobre a depuração mucociliar

### 4.2.1 Avaliação funcional

#### 4.2.1.1 Análise da velocidade de transporte mucociliar *in situ*

As medidas de dispersão para a velocidade de transporte mucociliar *in situ* estão expostos nas figuras a seguir:

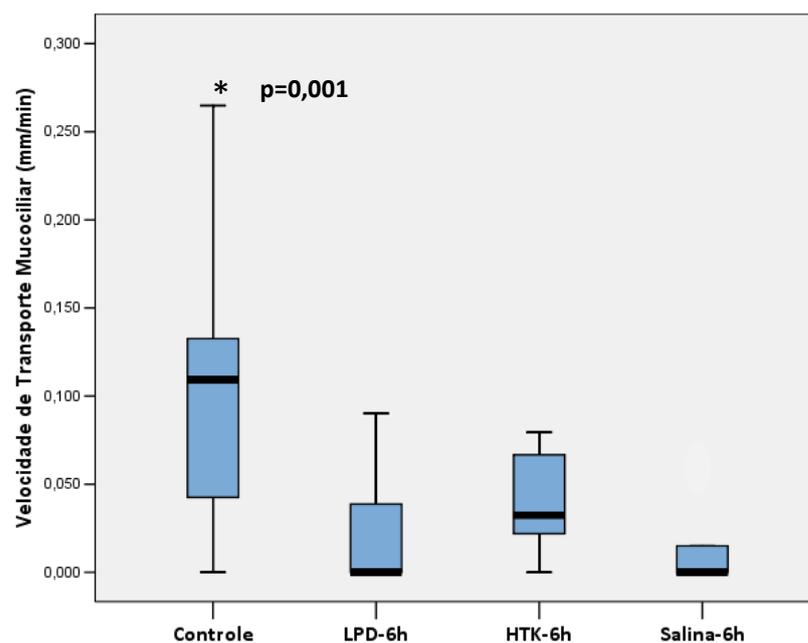


Figura 10: Velocidade de transporte mucociliar *in situ* (em mm/min) após 6 horas de isquemia. Grupo Controle: 0,109(0,106); LPD-6h: 0(0,039); HTK-6h: 0,032(0,045); e Salina-6h: 0(0,024). \* = diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle e os demais grupos ( $p=0,001$ ).

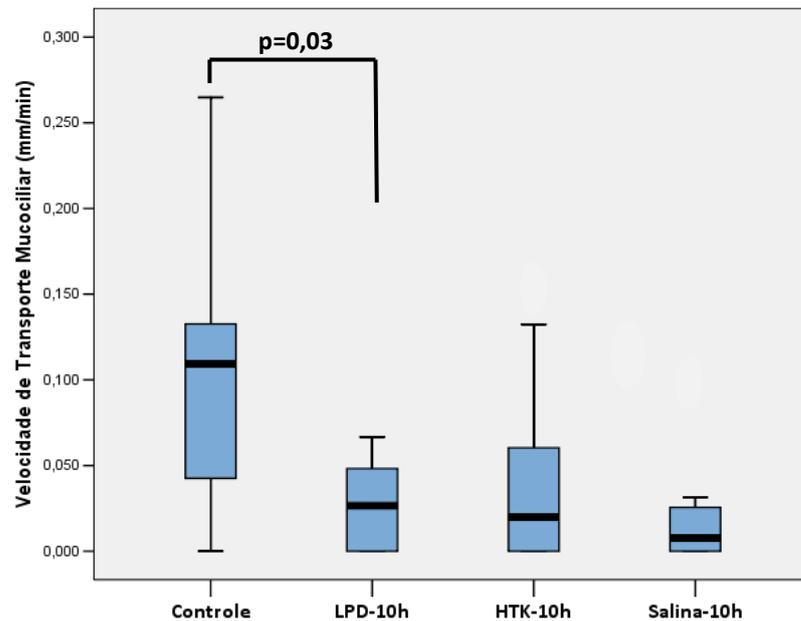


Figura 11: Velocidade de transporte mucociliar in situ (em mm/min) após 10 horas de isquemia. Grupo Controle: 0,109(0,106); LPD-10h: 0,026(0,051); HTK-10h: 0,019(0,064); e Salina-10h: 0,007(0,031). Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle e o grupo LPD-10h ( $p=0,03$ ).

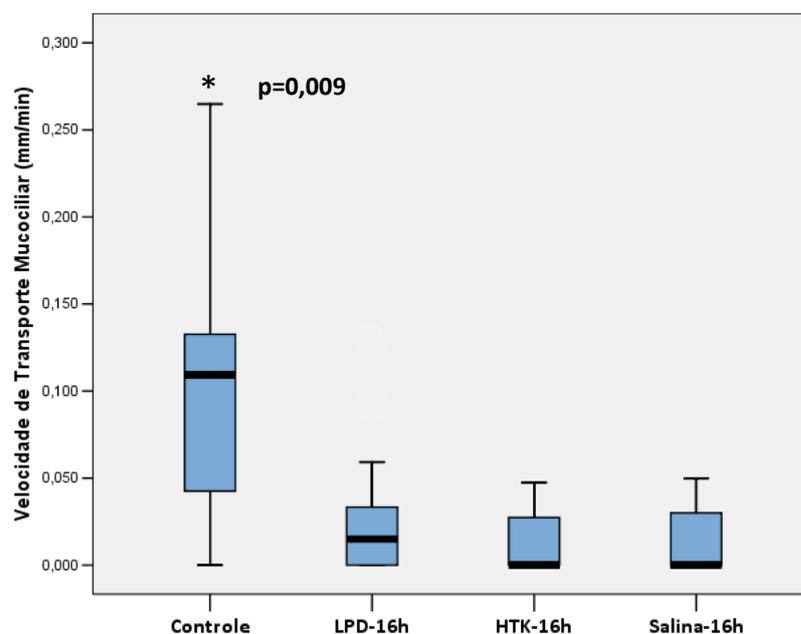


Figura 12: Velocidade de transporte mucociliar in situ (em mm/min) após 16 horas de isquemia. Grupo Controle: 0,109(0,106); LPD-16h: 0,015(0,033); HTK-16h: 0(0,035); Salina-16h: 0(0,034). \* = diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle e os demais grupos ( $p=0,009$ ).

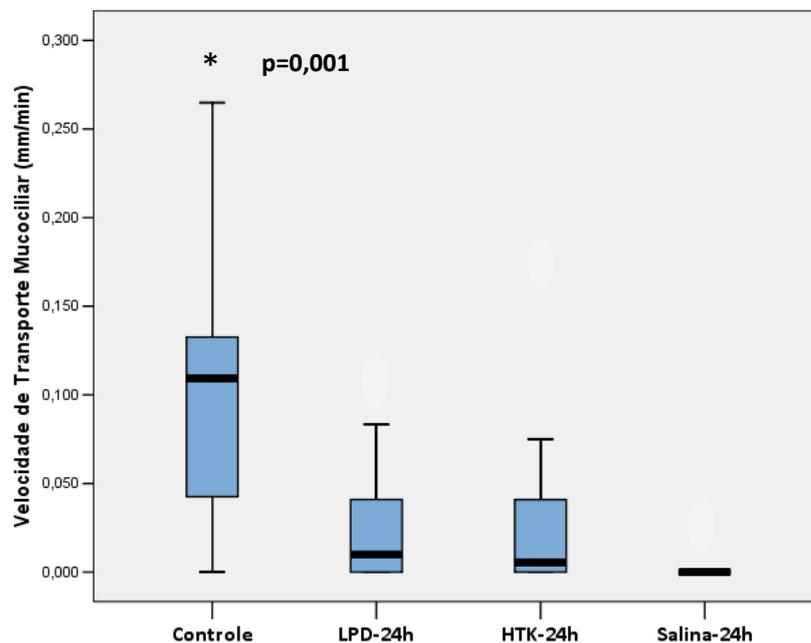


Figura 13: Velocidade de transporte mucociliar *in situ* (em mm/min) após 24 horas de isquemia. Grupo Controle: 0,109(0,106); LPD-24h: 0,009(0,042); HTK-24h: 0,005(0,043); Salina-24h: 0(0). \* = diferença estatisticamente significativa entre o Grupo Controle e os demais grupos ( $p=0,001$ ).

A análise estatística evidenciou que:

- 1) O grupo Controle apresentou maior velocidade de transporte mucociliar *in situ* quando comparado aos grupos Salina-6h e LPD-6h ( $p=0,001$ ).
- 2) O grupo Controle apresentou maior velocidade de transporte mucociliar *in situ* quando comparado ao grupo LPD-10h ( $p=0,03$ ).
- 3) O grupo Controle apresentou maior velocidade de transporte mucociliar *in situ* quando comparado aos grupos Salina-16h, LPD-16h e HTK-16h ( $p=0,009$ ).
- 4) O grupo Controle apresentou maior velocidade de transporte mucociliar *in situ* quando comparado aos grupos Salina-24h, LPD-24h e HTK-24h ( $p=0,001$ ).

#### 4.2.1.2 Medida da frequência de batimento ciliar

As medidas de dispersão para a frequência de batimento ciliar estão expostas nas figuras a seguir:

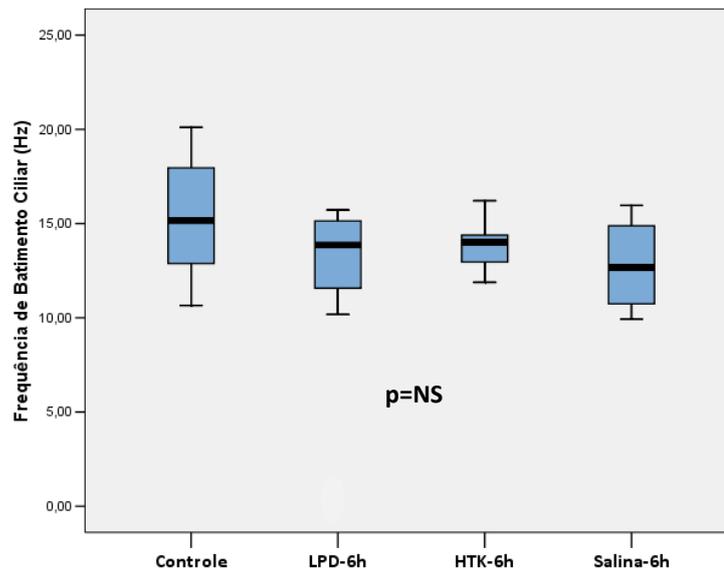


Figura 14: Frequência de batimento ciliar (em Hz) após 6 horas de isquemia. Grupo Controle: 15,17(6,48); LPD-6h: 13,86(3,93); HTK-6h: 14,00(1,51); e Salina-6h: 12,67(4,35). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=NS$ )

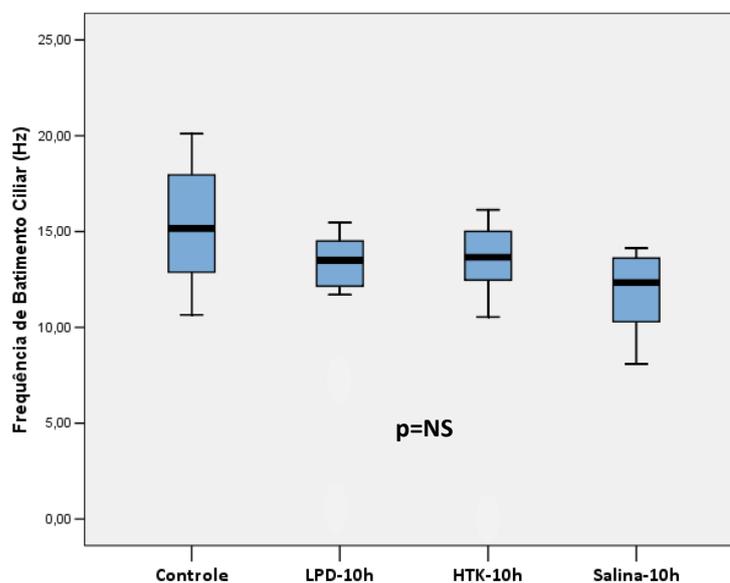


Figura 15: Frequência de batimento ciliar (em Hz) após 10 horas de isquemia. Grupo Controle: 15,17(6,48); LPD-10h: 13,49(2,58); HTK-10h: 13,66(2,74); e Salina-10h: 13,66(2,74). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=NS$ )

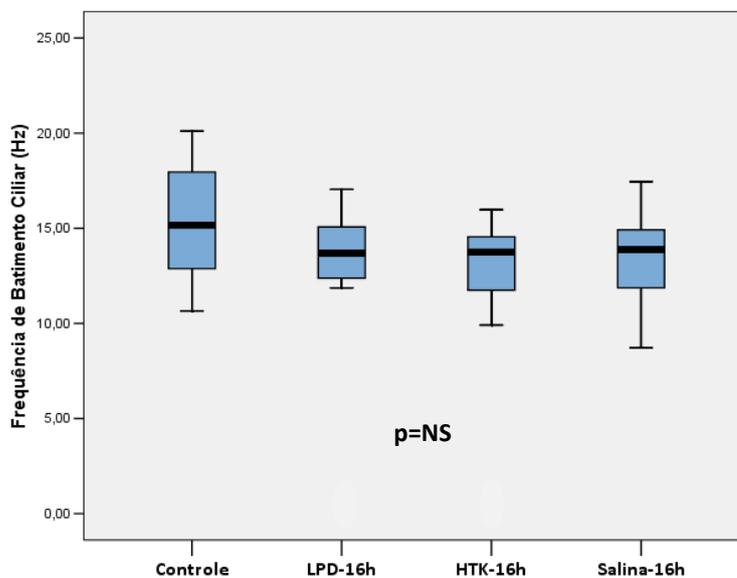


Figura 16: Frequência de batimento ciliar (em Hz) após 16 horas de isquemia. Grupo Controle: 15,17(6,48); LPD-16h: 13,68(2,90); HTK-16h: 13,74(3,44); e Salina-16h: 13,89(8,75). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=NS$ )

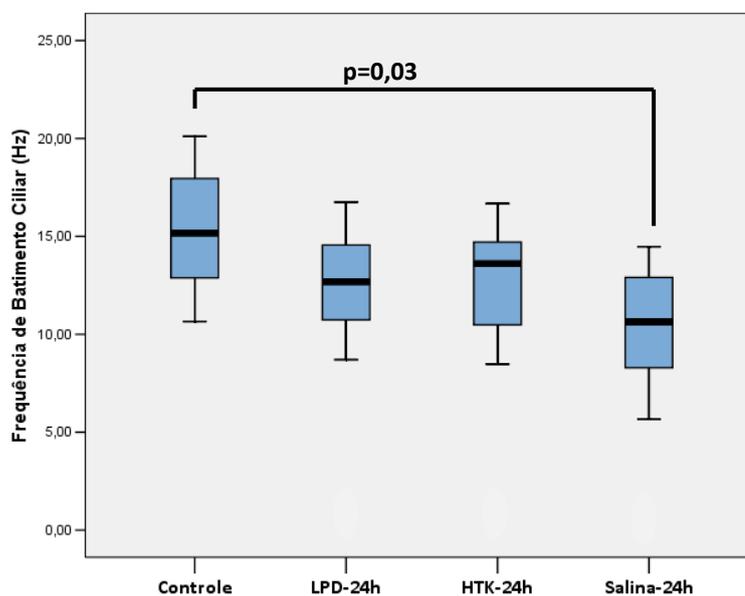


Figura 17: Frequência de batimento ciliar (em Hz) após 24 horas de isquemia. Grupo Controle: 15,17(6,48); LPD-24h: 12,69(3,87); HTK-24h: 13,60(4,77); e Salina-24h: 10,64(5,47). Houve diferença estatisticamente significativa entre o Grupo Controle e o grupo Salina-24h ( $p=0,001$ )

A análise estatística evidenciou que:

1) O grupo Controle apresentou maior frequência de batimento ciliar quando comparado ao grupo Salina-24h ( $p=0,03$ ).

2) Não houve diferença significativa entre o grupo Controle e os demais grupos após 6 horas de isquemia ( $p=0,27$ ), 10 horas de isquemia ( $p=0,11$ ), e 16 horas de isquemia ( $p=0,23$ ).

## **4.2.2 Avaliação morfológica**

### **4.2.2.1 Microscopia de luz**

#### **4.2.2.1.1 Hematoxilina e eosina**

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à integridade epitelial (tabelas no Anexo A). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à inflamação subepitelial (tabelas no Anexo B).

#### **4.2.2.1.2 Percentual da área de epitélio respiratório corada com azul de alciano e PAS**

##### **Azul de alciano**

As medidas de dispersão para o percentual de área corada com azul de alciano estão expostas nas figuras a seguir:

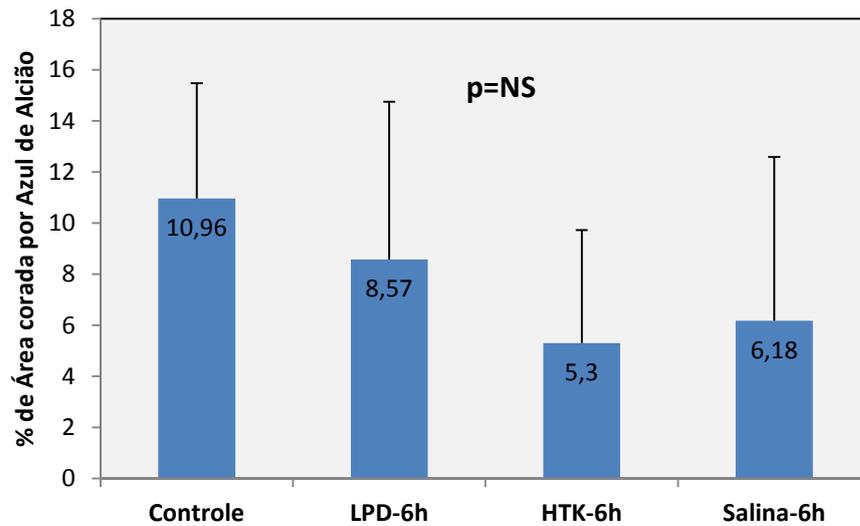


Figura 18: Percentagem de área corada por azul de alcian após 6 horas de isquemia. Grupo Controle:  $10,96 \pm 4,51$ ; LPD-6h:  $8,57 \pm 6,17$ ; HTK-6h:  $5,30(4,42)$ ; e Salina-6h:  $6,18 \pm 6,40$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=NS$ )

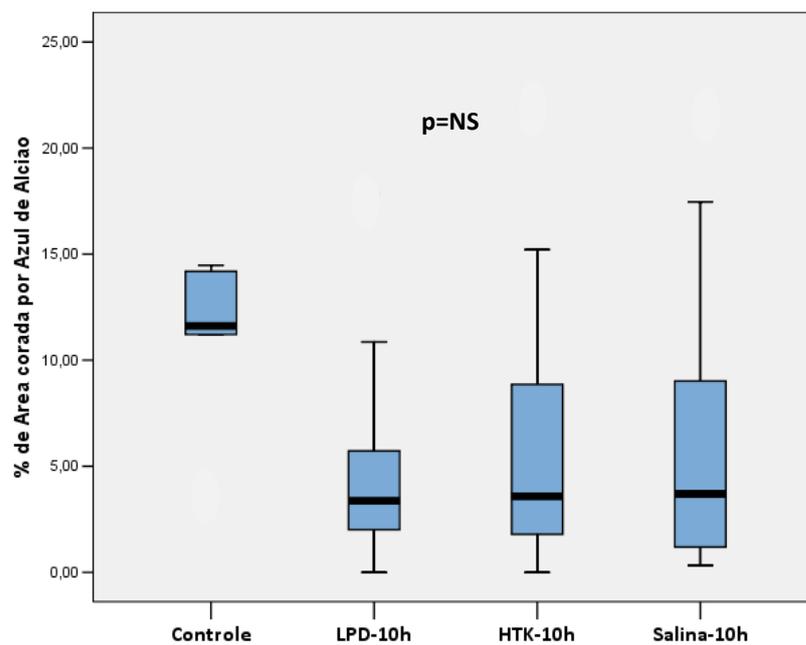


Figura 19: Percentagem de área corada por azul de alcian após 10 horas de isquemia. Grupo Controle:  $10,96 \pm 4,51$ ; LPD-10h:  $3,36(4,01)$ ; HTK-10h:  $3,59(8,48)$ ; e Salina-10h:  $3,71(10,68)$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=NS$ ).

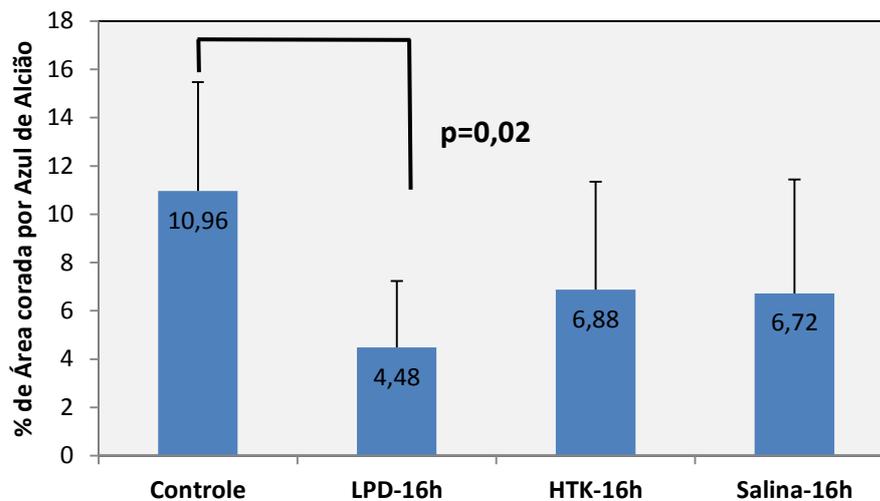


Figura 20: Percentagem de área corada por azul de alciano após 16 horas de isquemia. Grupo Controle:  $10,96 \pm 4,51$ ; LPD-16h:  $4,48 \pm 2,75$ ; HTK-16h:  $6,88 \pm 4,47$ ; e Salina-16h:  $6,72 \pm 4,72$ . Houve diferença estatisticamente significativa entre o Grupo Controle e o grupo LPD-16h ( $p=0,02$ )

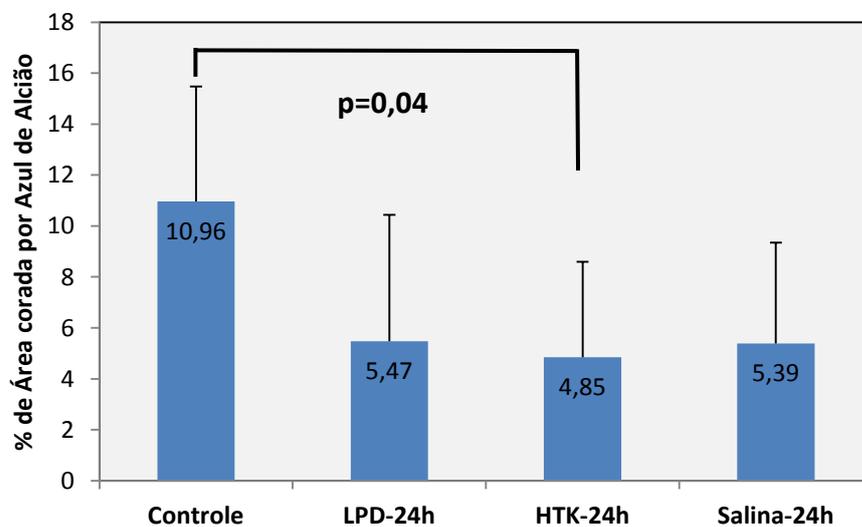


Figura 21: Percentagem de área corada por azul de alciano após 24 horas de isquemia. Grupo Controle:  $10,96 \pm 4,51$ ; LPD-24h:  $5,47 \pm 4,97$ ; HTK-24h:  $4,85 \pm 3,75$ ; e Salina-24h:  $5,39 \pm 3,96$ . Houve diferença estatisticamente significativa entre o Grupo Controle e o grupo HTK-24h ( $p=0,04$ )

A análise estatística evidenciou que:

- 1) O grupo Controle apresentou maior percentual de área corada com azul de alcião quando comparado ao grupo LPD-16h ( $p=0,02$ ).
- 2) O grupo Controle apresentou maior percentual de área corada com azul de alcião quando comparado ao grupo HTK-24h ( $p=0,04$ ).
- 3) Não houve diferença significativa entre o grupo Controle e os demais grupos após 6 horas de isquemia ( $p=0,14$ ), e 10 horas de isquemia ( $p=0,16$ ).

#### 4.2.1.2.2 PAS

As medidas de dispersão para o percentual de área corada com PAS estão expostas nas figuras a seguir:

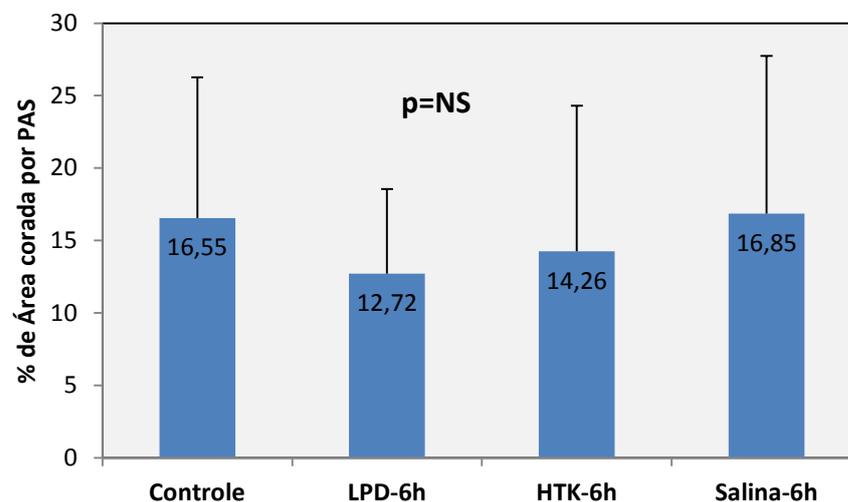


Figura 22: Percentagem de área corada por PAS após 6 horas de isquemia. Grupo Controle:  $16,55 \pm 9,72$ ; LPD-6h:  $12,72 \pm 5,83$ ; HTK-6h:  $14,26(10,05)$ ; e Salina-6h:  $16,85 \pm 10,90$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=NS$ )

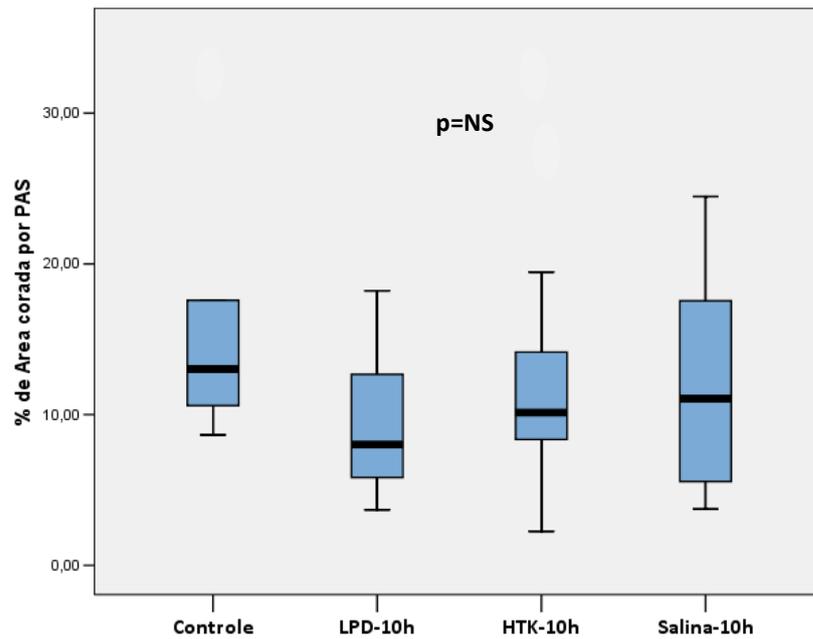


Figura 23: Percentagem de área corada por PAS após 10 horas de isquemia. Grupo Controle:  $16,55 \pm 9,72$ ; LPD-10h:  $8,01(7,31)$ ; HTK-10h:  $10,13(6,77)$ ; e Salina-10h:  $11,05(13,56)$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=NS$ )

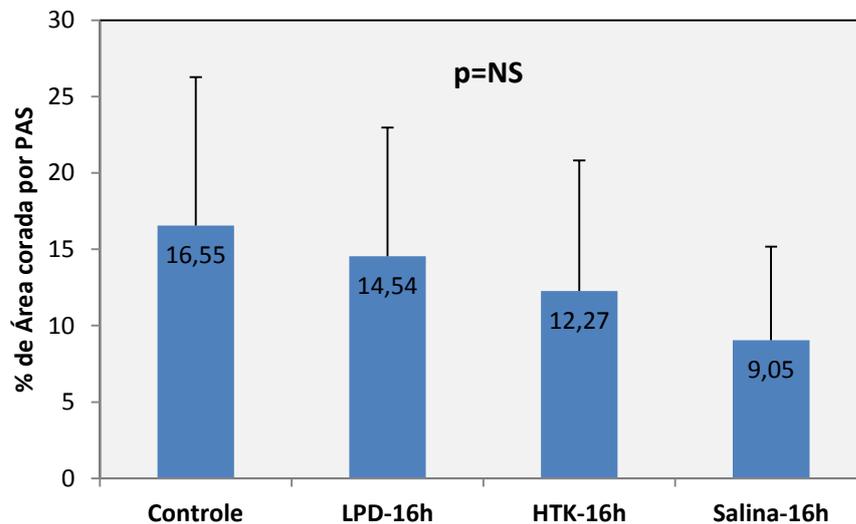


Figura 24: Percentagem de área corada por PAS após 16 horas de isquemia. Grupo Controle:  $16,55 \pm 9,72$ ; LPD-16h:  $14,54 \pm 8,43$ ; HTK-16h:  $12,27 \pm 8,55$ ; e Salina-16h:  $9,05 \pm 6,12$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=NS$ ).

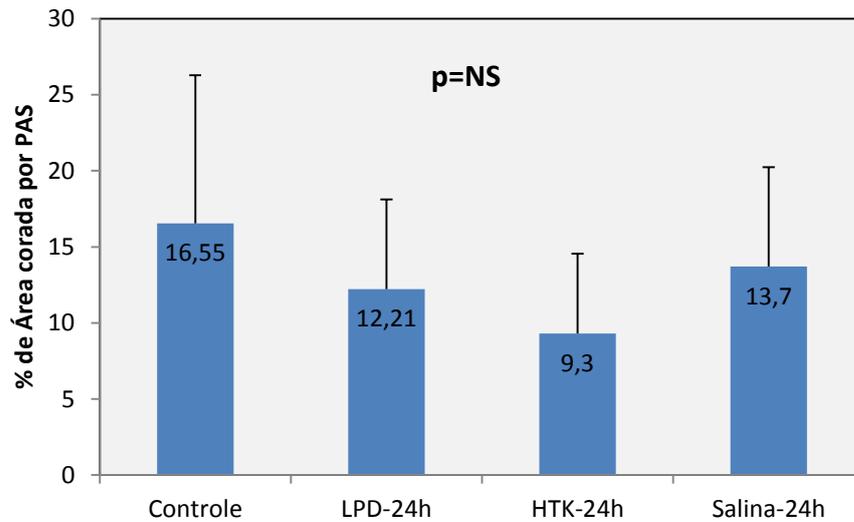


Figura 25: Percentagem de área corada por PAS após 24 horas de isquemia. Grupo Controle:  $16,55 \pm 9,72$ ; LPD-24h:  $12,21 \pm 5,91$ ; HTK-24h:  $9,30 \pm 5,24$ ; e Salina-24h:  $13,74 \pm 6,53$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=NS$ )

A análise estatística evidenciou ausência de diferença significativa entre o grupo Controle e os demais grupos após 6 horas de isquemia ( $p=0,69$ ), 10 horas de isquemia ( $p=0,27$ ), 16 horas de isquemia ( $p=0,18$ ) e 24 horas de isquemia ( $p=0,70$ ).

## 4.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão

### 4.2.2.1 Grupo Controle

Foram identificadas células ciliadas, caliciformes e basais normais. O epitélio respiratório apresentava morfologia habitual (Figura 26).

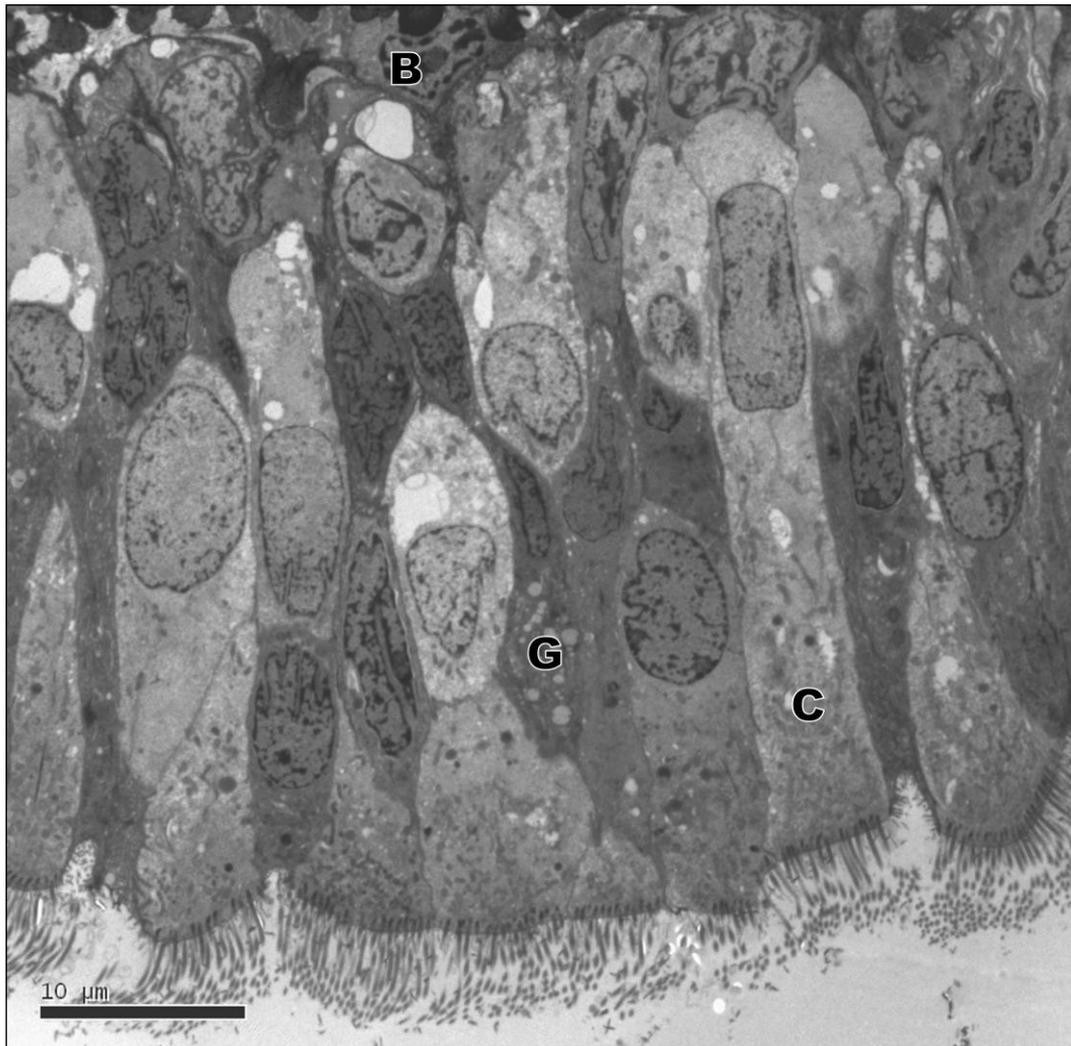


Figura 26: Grupo Controle. Células ciliadas (C), caliciformes (G) e basais (B) com morfologia habitual

#### 4.2.2.2 Grupo LPD-24h

Foram identificadas células ciliadas, caliciformes e basais. As células ciliadas apresentavam densidade ciliar preservada (figura 27).

Alterações na morfologia habitual: Algumas células ciliadas apresentavam grande quantidade de vacuolizações no seu interior (figura 27 – setas pretas). As células caliciformes apresentavam pequena quantidade de vesículas pouco elétron-densas no seu interior. Os núcleos das células

epiteliais maduras apresentavam-se com morfologia alterada devido a pregueamento da membrana nuclear (figura 27 – setas amarelas). Esta alteração não foi identificada nas células basais.

Figuras associadas a lesão celular: Foram identificadas áreas de desagregação citoplasmática sugerindo lesão celular secundária a isquemia (figura 27 – setas azuis). Não foram identificadas lesões sugestivas de necrose ou apoptose.

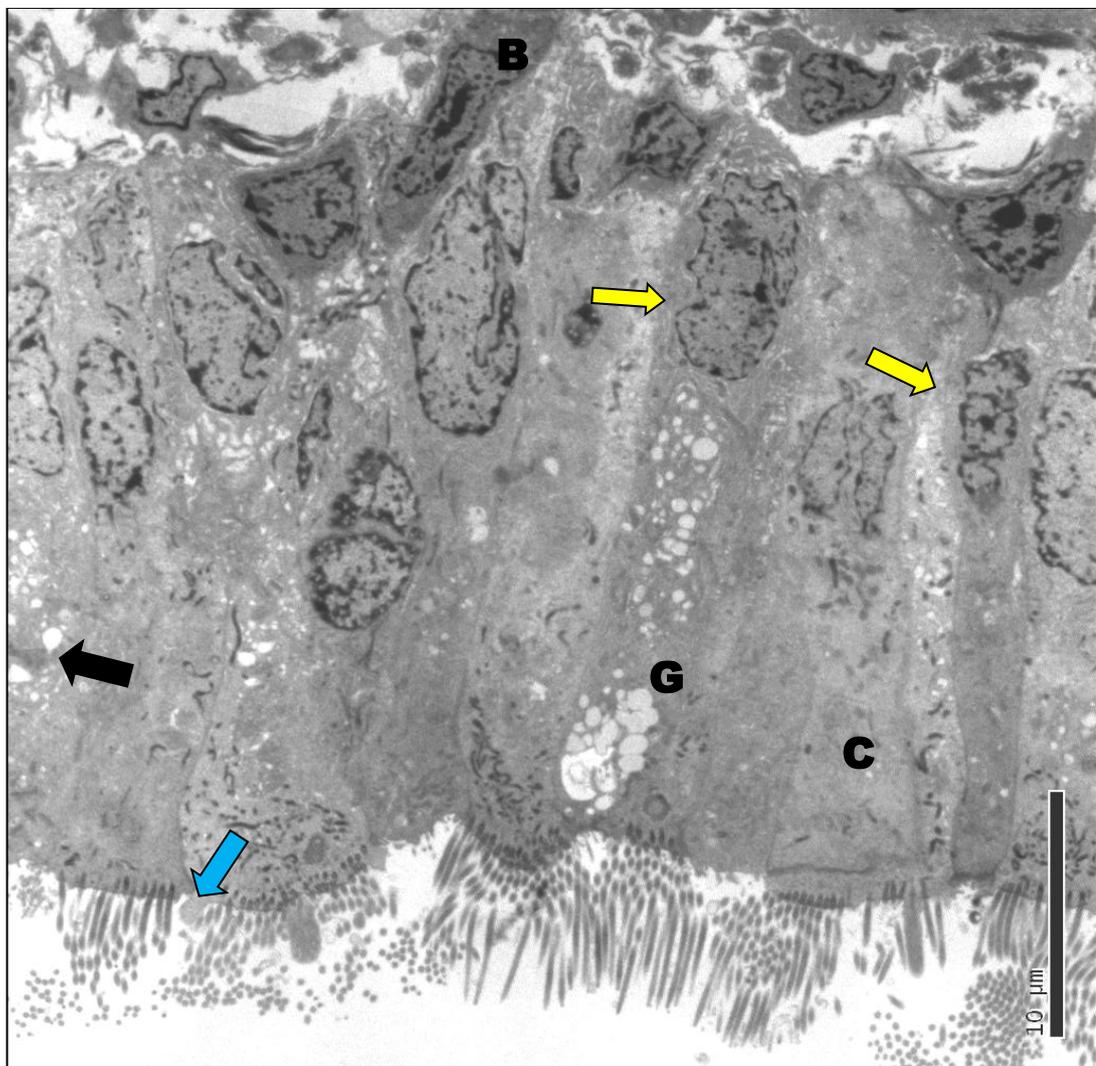


Figura 27: Grupo LPD-24h. Células ciladas (C), caliciformes (G) e basais (B). Vacuolização citoplasmática (seta preta). Pregueamento da membrana nuclear (setas amarelas). Desagregação citoplasmática (seta azul)

#### 4.2.2.3 Grupo HTK-24h

Foram identificadas células ciliadas e caliciformes. As células ciliadas apresentavam densidade ciliar preservada. Os núcleos das células epiteliais apresentavam-se com morfologia normal (figura 28).

Alterações na morfologia habitual: Raras células ciliadas apresentavam vacuolizações no seu interior. As células caliciformes apresentavam pequena quantidade de vesículas pouco elétron-densas no seu interior. Em toda a superfície observada do epitélio foi identificada uma grande quantidade de cristais elétron-densos (figura 28 – círculos azuis). Em várias regiões, esses cristais pareciam unir os diversos cílios.

Figuras associadas a lesão celular: Foram identificadas células em necrose (figuras 28 e 29). No interior dessas células havia abundância dos cristais elétron-densos (figura 29 – setas azuis).

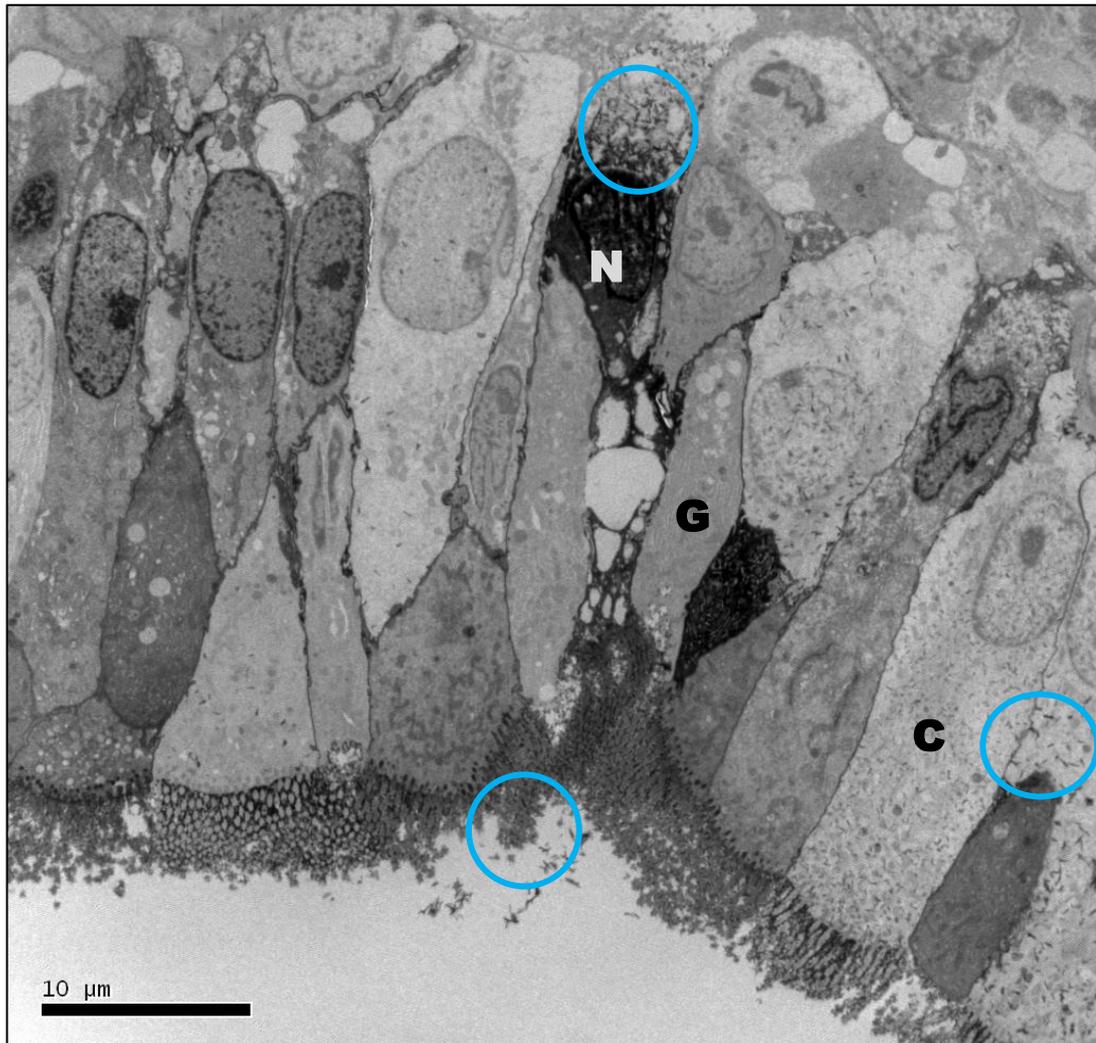


Figura 28: Grupo HTK-24h. Células ciliadas (C) e caliciformes (G). Presença de cristais em todas as células (círculos azuis). Célula necrótica (N)

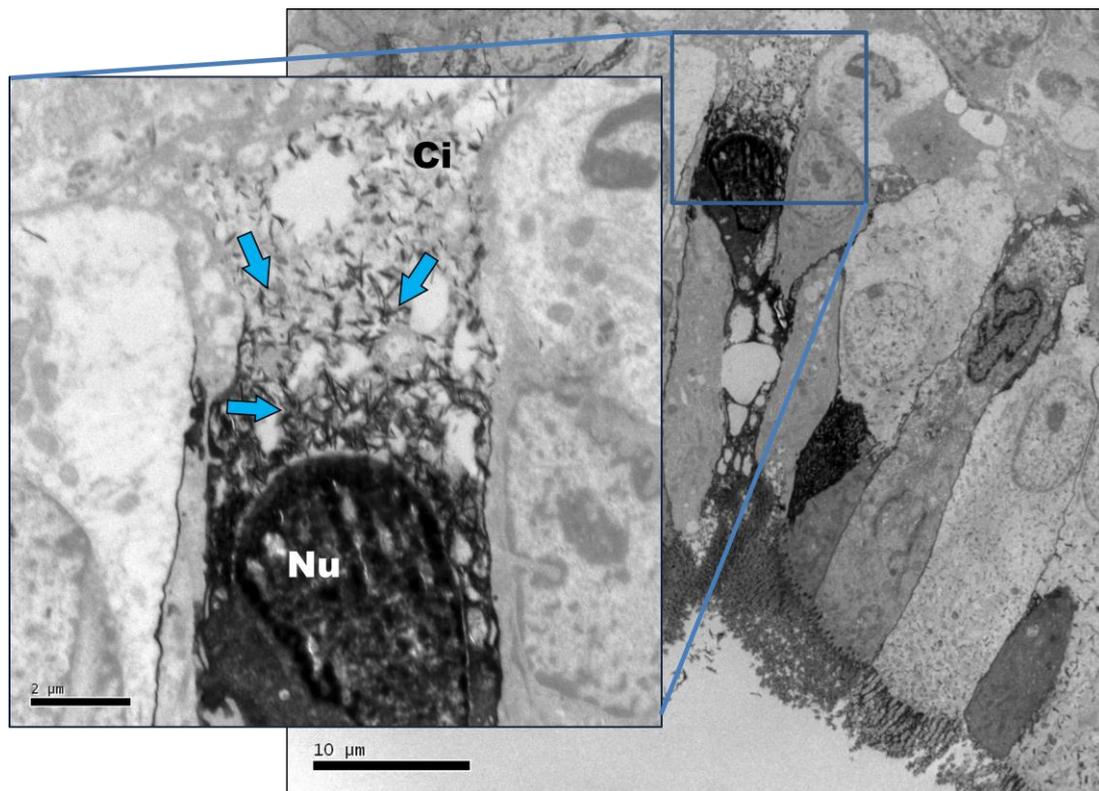


Figura 29: Grupo HTK-24h. Imagem em maior aumento da célula necrótica identificada na figura anterior. Núcleo (Nu) e citoplasma (Ci) da célula necrótica. Cristais em abundância no citoplasma (setas azuis).

#### 4.2.2.4 Grupo Salina-24h

Foram identificadas células ciliadas, não havendo possibilidade de identificação de células caliciformes (figura 30).

Alterações na morfologia habitual e figuras associada a lesão celular: As células ciliadas apresentavam densidade ciliar diminuída. A quase totalidade das células ciliadas apresentava uma grande quantidade de vacuolizações no seu interior (figura 30 – setas pretas). As células epiteliais apresentavam intenso processo de desagregação citoplasmática (figura – 30 setas azuis). Foram identificadas alterações sugestivas de apoptose em algumas raras células (figura 30 – setas amarelas).

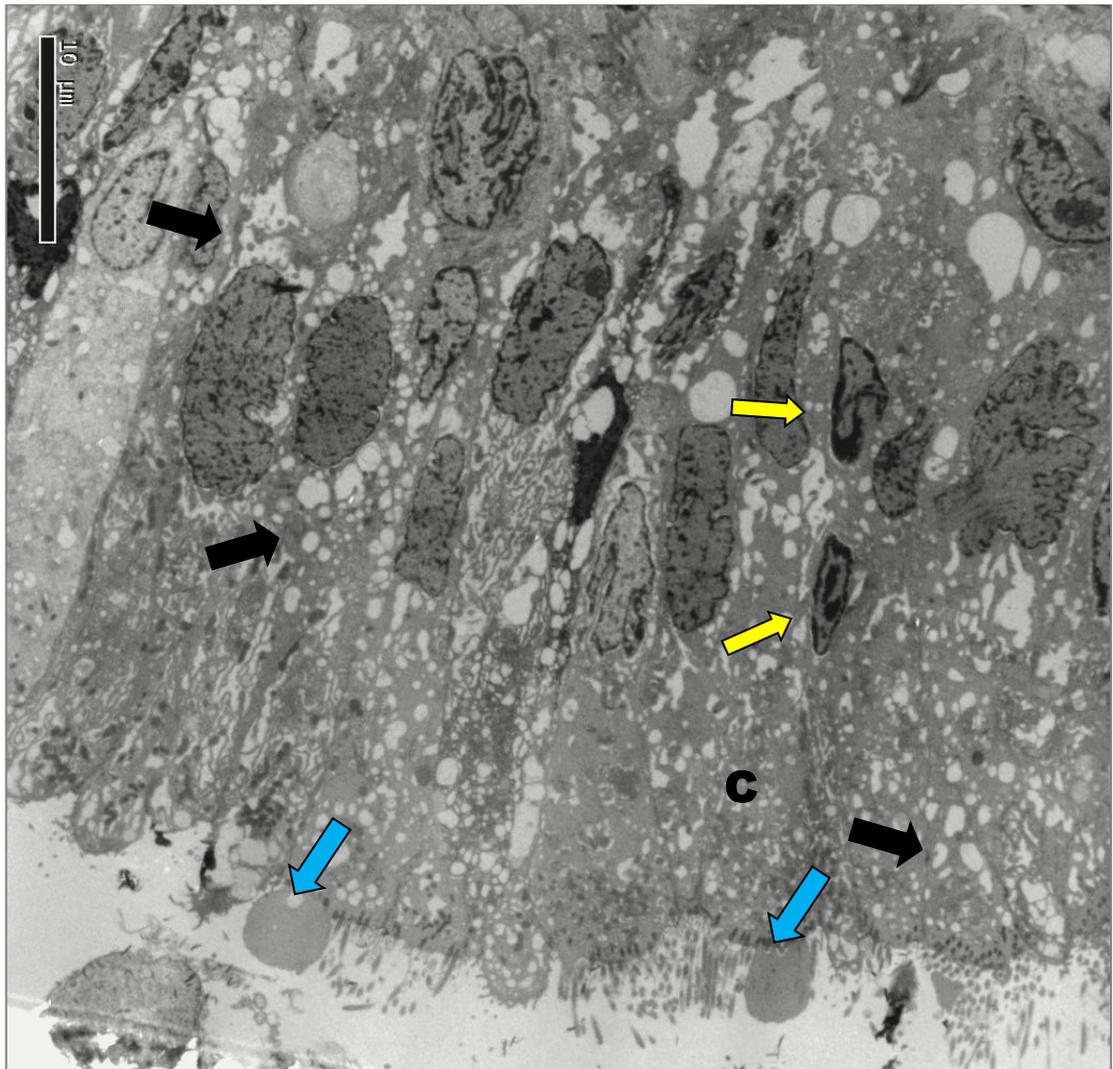


Figura 30: Grupo Salina-24h. Células ciliadas (C) com baixa densidade ciliar. Desagregação citoplasmática (setas azuis). Vacuolização citoplasmática intensa (setas pretas). Núcleos de células em apoptose (setas amarelas).

## 5 DISCUSSÃO

---

O transplante traqueal continua sendo um desafio. Apesar das décadas de estudo e das várias tentativas de substituição da traquéia nativa por materiais homólogos, heterólogos, sintéticos, semi-sintéticos e utilizando bioengenharia de tecidos, um substituto traqueal de emprego universal ainda não foi encontrado (Grillo, 2002). Apesar dessa constatação, algumas evidências se tornaram alvissareiras. A comprovação do fenômeno de reepitelização de enxertos traqueais tornou possível aventar-se a possibilidade do transplante traqueal sem necessidade de imunossupressão por tempo prolongado (Ito et al., 2004; Genden et al., 2003a). Outrossim, a constatação de que fatores promotores de angiogênese tais como o bFGF e o VEGF promovem a revascularização de enxertos traqueais de forma simples, parece indicar a melhor alternativa às propostas de revascularização traqueal por métodos tecnicamente complicados e pouco aplicáveis à prática clínica (Dodge-Khatami et al., 2001; Sung e Won, 2001). Apesar dos recentes avanços nas técnicas do transplante em si, sabe-se muito pouco sobre o comportamento dos enxertos traqueais no período compreendido entre a extração e o implante. O conhecimento acerca deste período parece ser fundamental para o uso adequado dos enxertos traqueais na prática clínica.

## 5.1 Avaliação funcional

O uso de enxertos para transplante de órgãos sólidos ocorre a partir de sua preservação adequada após a extração. A avaliação da efetividade dos métodos de preservação se baseia na verificação da manutenção funcional e morfológica dos tecidos do enxerto submetidos a períodos de isquemia. A traquéia apresenta duas funções mecânicas principais: 1) a condução de ar para a hematose; e 2) a proteção das vias aéreas por meio da depuração mucociliar. A função de condução de ar é devida à manutenção do lúmen traqueal pérvio, tanto na sua porção cervical quanto na mediastinal. Essa função mecânica é mantida, principalmente, pelo arcabouço semi-rígido proporcionado pelas cartilagens traqueais. Por sua vez, a depuração mucociliar é possível graças a um mecanismo complexo, que envolve tanto a produção e a manutenção das propriedades físicoquímicas do muco, quanto a propulsão desse muco por meio do batimento ciliar (Randell et al., 2006). No sentido de facilitar a sua avaliação experimental, a depuração mucociliar pode ser dividida em três componentes principais: a frequência e padrão do batimento ciliar; as propriedades físicas e de transportabilidade do muco respiratório; e a interação entre os cílios e a camada de muco subjacente. A avaliação funcional da depuração mucociliar se baseia no uso de métodos de análise de um ou mais desses componentes (Trindade et al., 2007). No nosso estudo, foram utilizados métodos para avaliar a frequência do batimento ciliar e a interação entre os cílios e a camada de muco das vias respiratórias.

Para a avaliação da interação entre os cílios e a camada de muco subjacente, foi utilizado um método de análise *ex vivo* da velocidade de transporte mucociliar. Com o auxílio de um microscópio de luz com aumento de 100 vezes e de uma ocular reticulada, partículas de muco já presentes nas peças eram identificadas na superfície da mucosa. O tempo necessário para que uma partícula de muco percorresse 50 micrômetros ao longo da peça era cronometrado, sendo possível calcular a velocidade de deslocamento. Outros métodos de análise *ex vivo* do transporte mucociliar poderiam ser utilizados, como a preparação do palato de rã. Contudo, neste caso, a análise seria principalmente das propriedades do muco e não da interação dos cílios com o muco do mesmo indivíduo. A vantagem da técnica utilizada é a possibilidade de analisar a interação do batimento ciliar com o muco próprio de cada peça, o que se assemelharia mais à condição *in vivo*. Entretanto, uma limitação importante dessa técnica é o fato de que cada peça alocada para um dos grupos experimentais esteve submersa, ou em uma das duas soluções de preservação estudadas, ou em soro fisiológico, por um período de 6 a 24 horas antes da análise do transporte mucociliar. O contato destas soluções com o muco pode ter alterado de forma significativa as suas propriedades físicoquímicas, o que poderia também alterar os resultados das análises.

Para a avaliação da frequência de batimento ciliar, nós utilizamos a técnica videoscópica. Esta técnica consiste na sincronização entre uma fonte de luz estroboscópica e o batimento ciliar observado através de um

microscópio de luz com aumento de 100 vezes. A técnica videoscópica tem a limitação de depender de uma avaliação, em alguma medida, subjetiva pelo pesquisador. Outra limitação é o fato de a análise ser realizada *ex vivo*, sem a participação das condições locais próprias dos tecidos *in vivo*, tais como temperatura e umidade. Contudo, a técnica videoscópica é reprodutível e largamente utilizada e aceita em estudos de avaliação da depuração mucociliar (Rivero et al., 2001; Pazetti et al., 2008; Azevedo-Pereira et al., 2011).

### **5.1.1 Ação da isquemia fria à avaliação funcional**

É sabido que vários fatores alteram a depuração mucociliar. Alguns fármacos como agonistas adrenérgicos e metilxantinas, dentre outros, podem melhorar a depuração mucociliar. Inversamente, alguns anestésicos, anti-inflamatórios e benzodiazepínicos podem prejudicá-la (Houtmeyers et al., 1999). Fatores outros, como as baixas temperaturas e a secção e reanastomose brônquica, também promovem a diminuição da depuração mucociliar (Saldiva, 1990; Rivero et al., 2001). Contudo, o efeito da isquemia sobre a depuração mucociliar é pouco conhecido. Wagner et al. (1996) estudaram a depuração mucociliar em um modelo de hipoperfusão brônquica seletiva em ovelhas. Os autores constataram a diminuição da depuração mucociliar, avaliada pela eliminação de um radiotraçador, após a oclusão do fluxo arterial brônquico. O nosso grupo, em um estudo preliminar ao que é apresentando neste trabalho, demonstrou que a isquemia à

temperatura ambiente, com duração maior que seis horas, promove forte diminuição na depuração mucociliar (Azevedo-Pereira et al., 2011). No mesmo estudo, os dados sobre os efeitos da isquemia fria sobre a depuração mucociliar foram inconclusivos, devido ao reduzido número de peças em cada grupo.

No presente estudo, foi evidenciado que a isquemia fria promove diminuição na depuração mucociliar a partir de 6 horas de isquemia. Ao contrário de nossa suposição inicial, a diferença na depuração mucociliar entre os grupos com menor e maior tempo de isquemia fria não alcançou significância estatística.

### **5.1.2 Ação das soluções de preservação de uso tópico à avaliação funcional**

No nosso estudo, não houve diferença significativa entre as diferentes soluções de preservação quanto à velocidade de transporte mucociliar *in situ*. Contudo, a diferença entre o grupo Controle e os demais grupos foi marcadamente maior nos enxertos submetidos a tempos de isquemia maiores, quais sejam, 16 e 24 horas.

Os nossos dados evidenciaram que houve uma tendência para menor valor na frequência de batimento ciliar nas peças que utilizaram solução salina em comparação às que utilizaram LPD-glicose ou HTK. Exceção feita quando o tempo de isquemia foi 16 horas. Contudo, essa tendência não foi suficientemente forte para ensejar uma significância estatística. Ainda, as

peças que não foram submergidas em soluções (grupo Controle) também não apresentaram frequência de batimento ciliar significativamente maior do que os dos outros grupos, com exceção do grupo Salina-24h. Esta ausência de diferença pode estar relacionada ao pequeno número de peças do grupo Controle. Notadamente, as medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartilico) foram maiores no grupo Controle que nos grupos experimentais, o que poderia interferir na análise estatística.

Como citado anteriormente, a temperatura influencia a depuração mucociliar, havendo diminuição de sua efetividade quando da exposição ao frio (Saldiva, 1990). No nosso estudo, as análises funcionais foram realizadas logo após a retirada das peças do acondicionamento. Contudo, o intervalo de tempo entre a retirada das peças do local de acondicionamento a frio e o início das aferições foi cerca de 20 minutos. Levando-se em conta tanto o tempo despendido para o início das medidas, quanto o fato de as medidas serem realizadas em temperatura ambiente, acreditamos que não houve influência significativa da temperatura às aferições no resultado final das análises funcionais.

Quando comparados com estudo preliminar (Azevedo-Pereira et al., 2011), os dados obtidos indicam que o acondicionamento a frio foi mais importante que o tipo de solução de preservação utilizado na manutenção da depuração mucociliar das peças submetidas isquemia fria.

## 5.2 Avaliação morfológica à microscopia de luz

Tanto a quantificação, quanto a semiquantificação da integridade epitelial e da inflamação subepitelial, são métodos freqüentemente utilizados para avaliação da lesão isquêmica ou inflamatória sobre enxertos traqueais (Macchiarini et al., 1995b; Qu et al., 2005). Inicialmente, utilizamos nas análises das lâminas coradas com hematoxilina-eosina uma escala semiquantitativa, com quatro graduações, baseada no trabalho de Qu et al. (2005). Para a integridade epitelial a graduação seria: mínima integridade; pouca integridade; integridade moderada; e integridade alta. Para a inflamação subepitelial a graduação seria: ausência de inflamação; inflamação leve; inflamação moderada; e inflamação intensa. Contudo, após a finalização das análises, observamos que pouquíssimas peças apresentavam-se com integridade mínima ou com ausência de inflamação. Desta feita, para uma melhor interpretação estatística, utilizamos uma escala com apenas três graduações para os dois parâmetros. Para diminuir o efeito subjetivo da utilização de uma escala semiquantitativa, cada lâmina foi analisada por três observadores. A concordância entre dois ou mais observadores determinou a graduação final.

A avaliação da presença de muco ácido e neutro no epitélio respiratório foi realizada de forma quantitativa, por um programa de computador analisador de imagens, conforme descrito por Pazetti et al. (2007). O programa avaliou a presença de muco pela quantificação da área de epitélio corada pelo azul de alciano e PAS. Pazetti et al. (2007)

realizaram a quantificação em 10 campos com aumento final de 400 vezes para cada lâmina. Em nosso estudo, a análise foi realizada pela quantificação em apenas 01 campo com aumento final de 400 vezes para cada lâmina. Essa diferença na quantidade de campos ocorreu devido à menor disponibilidade de epitélio respiratório nas lâminas obtidas das peças do nosso estudo. Isto se deveu, provavelmente, à ação da isquemia na integridade do epitélio respiratório, e à manipulação das peças durante as avaliações funcionais. Uma vez que a análise foi realizada de forma objetiva pelo programa de computador, apenas um observador realizou a captura das imagens do epitélio em todas as lâminas, e outro observador determinou a área de epitélio a ser quantificada.

### **5.2.1 Ação da isquemia fria à microscopia de luz**

No nosso estudo, foi evidenciado que a isquemia fria não alterou morfologicamente o epitélio respiratório às análises de inflamação subepitelial. Houve uma tendência a pior integridade epitelial nas peças submetidas a 24 horas de isquemia. Contudo, a diferença não alcançou significância estatística. A ausência de significância talvez tenha sido ocasionada pela elevada proporção (42,9%) de peças do grupo Controle que apresentaram pouca integridade epitelial, prejudicando a análise estatística. A explicação para este achado pode estar na manipulação excessiva do epitélio respiratório durante a execução das análises funcionais. Durante a auferição da velocidade de transporte mucociliar *in situ* e, especialmente, da

freqüência de batimento ciliar, o epitélio é manipulado com freqüência até a obtenção das medidas. Apesar do cuidado com o qual essa manipulação é realizada, não se pode afastar a possibilidade de lesão mecânica direta do epitélio respiratório nesta etapa. Outra explicação poderia ser o período de tempo ao qual as peças do grupo Controle ficaram expostas à temperatura ambiente durante as análises funcionais. Contudo, o período tempo necessário para as análises funcionais, cerca de 20 minutos, não parece ser suficientemente longo para influir como fator independente na estrutura histológica das peças.

A quantidade de muco intracelular no epitélio respiratório também não se alterou de forma estatisticamente significativa após os diferentes períodos de isquemia fria. Tanto o muco ácido, corado pelo azul de alciano, quanto o muco neutro, corado pelo PAS, permaneceram em quantidade semelhante ao encontrado nas peças que não foram submetidas a isquemia. Essa constatação indica que as alterações intracelulares provocadas pela isquemia até 24 horas não influem no mecanismo de exocitose das células caliciformes presentes no epitélio respiratório

### **5.2.2 Ação das soluções de preservação de uso tópico à microscopia de luz**

Houve uma tendência a pior integridade epitelial nas peças submetidas a 24 horas de isquemia, independentemente da solução de preservação utilizada. Nesta condição, pelo menos 50% das peças nos

grupos LPD-24h, HTK-24h e Salina-24h apresentavam pouca integridade epitelial. Contudo, a significância estatística não foi alcançada. Conforme citado, creditamos a ausência de significância à elevada proporção de peças com pouca integridade observadas no grupo Controle, grupo no qual não houve submersão em soluções de preservação.

À coloração com azul de alciano, os dados obtidos evidenciaram que não houve diferença significativa entre os grupos, independentemente da solução de preservação utilizada. Exceção feita aos grupos LPD-16h e HTK-24h em comparação com o grupo Controle. Da mesma forma, não foi alcançada diferença significativa entre os grupos à coloração com PAS. Uma vez que a isquemia fria de até 24 horas não altera a quantidade de muco intracelular do epitélio respiratório, haveria a possibilidade de que as soluções de preservação pudessem influir nessa variável. Contudo, não houve efeito quantificável do uso de soluções de preservação por via tópica sobre a quantidade de muco intracelular.

### **5.3 Avaliação morfológica à microscopia eletrônica de transmissão**

A fim de determinar as alterações ultra-estruturais no epitélio respiratório submetido a isquemia, fragmentos de peças dos grupos Controle, LPD-24h, HTK-24h e Salina-24h foram submetidos a cortes semi-finos. Esses grupos foram escolhidos devido às alterações apresentadas à

avaliação funcional e à microscopia de luz. Após determinação das amostras mais adequadas, uma peça de cada um dos grupos citados foi submetida a cortes ultrafinos para análise em microscópio eletrônico.

Os achados da microscopia eletrônica apresentaram, de certa maneira, pouca correlação com as análises funcionais e morfológicas por microscopia de luz, no que se referem ao grupo Salina-24h. Foram evidenciadas alterações relacionadas a lesão celular, como vacuolização citoplasmática e diminuição da densidade ciliar, de forma muito mais intensa no grupo Salina-24h do que nos demais grupos experimentais. Ainda, foram identificadas figuras de apoptose apenas no grupo Salina-24h. Este contexto difere do observado nas análises funcionais e morfológicas com microscopia de luz, onde não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo Salina e os demais grupos experimentais. No grupo LPD-24h, o epitélio respiratório não apresentava figuras grosseiras de lesão ou morte celular. Contudo, foram identificados peregumeamentos nas membranas nucleares de quase todas as células do epitélio respiratório observadas. Este achado se deve provavelmente à composição química da solução LPD-glicose, a qual apresenta alta concentração de sódio, favorecendo a saída de água do meio intracelular para o extracelular por osmose. Outro achado insuspeitado foi a formação de cristais intracelulares em peças do grupo HTK-24h. Estes cristais podem ser resultado da precipitação de proteínas presentes na solução HTK, devido ao elevado tempo de acondicionamento. Esta observação sugere que a suposição inicial de que as soluções de

preservação poderiam penetrar no epitélio respiratório quando da sua administração por via tópica tem, em verdade, validade.

Contudo, há que se atentar ao fato de que os dados da microscopia eletrônica de transmissão, apesar de serem importantes para a análise morfológica, são preliminares. Para que estas informações possam ser levadas em maior consideração, são necessários estudos com a análise de um maior número de amostras dos diversos grupos.

## **6 CONCLUSÕES**

---

- 6.1.** A isquemia fria promove diminuição da depuração mucociliar em enxertos traqueais.
- 6.2.** O uso de soluções de preservação administradas por via tópica não é efetivo para a manutenção da depuração mucociliar de enxertos traqueais submetidos a diferentes períodos de isquemia fria com duração de até 24 horas.
- 6.2.** O uso de soluções de preservação administradas por via tópica não afeta a integridade morfológica do epitélio respiratório de enxertos traqueais submetidos a diferentes períodos de isquemia fria com duração de até 24 horas.

## 7 ANEXOS

---

---

### Anexo A - Tabelas: Avaliação da integridade epitelial

Tabela 1: Graduação da integridade epitelial após 6 horas de isquemia

Grupo	Integridade epitelial (em %)			Valor de p
	Pouca (Menos que 1/3)	Moderada(Entre 1/3 e 2/3)	Alta (Mais que 2/3)	
Controle	42,9	14,3	42,9	0,64
LPD-6h	20,0	35,0	45,0	
HTK-6h	27,8	16,7	55,6	
Salina-6h	22,2	11,1	66,7	

Tabela 2: Graduação da integridade epitelial após 10 horas de isquemia

Grupo	Integridade epitelial (em %)			Valor de p
	Pouca (Menos que 1/3)	Moderada(Entre 1/3 e 2/3)	Alta (Mais que 2/3)	
Controle	42,9	14,3	42,9	0,62
LPD-10h	44,4	16,7	38,9	
HTK-10h	26,3	36,8	36,8	
Salina-10h	18,2	27,3	54,5	

Tabela 3: Graduação da integridade epitelial após 16 horas de isquemia

Grupo	Integridade epitelial (em %)			Valor de p
	Pouca (Menos que 1/3)	Moderada (Entre 1/3 e 2/3)	Alta (Mais que 2/3)	
Controle	42,9	14,3	42,9	0,82
LPD-16h	44,4	22,2	33,3	
HTK-16h	21,1	26,3	52,6	
Salina-16h	40,0	20,0	40,0	

Tabela 4: Graduação da integridade epitelial após 24 horas de isquemia

Grupo	Integridade epitelial (em %)			Valor de p
	Pouca (Menos que 1/3)	Moderada (Entre 1/3 e 2/3)	Alta (Mais que 2/3)	
Controle	42,9	14,3	42,9	0,87
LPD-24h	50,0	27,3	22,7	
HTK-24h	50,0	18,2	31,8	
Salina-24h	63,6	18,2	18,2	

## Anexo B - Tabelas: Avaliação da inflamação subepitelial

Tabela 5: Gradação da inflamação subepitelial após 6 horas de isquemia

Soluções	Inflamação subepitelial (em %)			Valor de p
	Leve	Moderada	Grave	
Controle	57,1	14,3	28,6	0,17
LPD-6h	15,0	55,0	30,0	
HTK-6h	33,3	38,9	27,8	
Salina-6h	55,6	11,1	33,3	

Tabela 6: Gradação da inflamação subepitelial após 10 horas de isquemia

Soluções	Inflamação subepitelial (em %)			Valor de p
	Leve	Moderada	Grave	
Controle	57,1	14,3	28,6	0,45
LPD-10h	27,8	55,6	16,7	
HTK-10h	21,1	52,6	26,3	
Salina-10h	36,4	54,5	9,1	

Tabela 7: Graduação da inflamação subepitelial após 16 horas de isquemia

Soluções	Inflamação subepitelial (em %)			Valor de p
	Leve	Moderada	Grave	
Controle	57,1	14,3	28,6	0,42
LPD-16h	22,2	44,4	33,3	
HTK-16h	15,8	52,6	31,6	
Salina-16h	30,0	30,0	40,0	

Tabela 8: Graduação da inflamação subepitelial após 24 horas de isquemia

Soluções	Inflamação subepitelial (em %)			Valor de p
	Leve	Moderada	Grave	
Controle	57,1	14,3	28,6	0,48
LPD-24h	31,8	36,4	31,8	
HTK-24h	27,3	40,9	31,8	
Salina-24h	9,1	54,5	36,4	

## Anexo C – Dados individuais obtidos em todas as análises

Tabela 9: Dados individuais obtidos em todas as análises. Solução: Solução de preservação; TI: Tempo de isquemia fria; FBC: Freqüência de batimento ciliar; VTM: Velocidade de transporte mucociliar; Int. Epit.: Integridade epitelial; Infl. Subep.: Inflamação subepitelial; %AA: Percentagem de área corada com azul de alcião; %PAS: Percentagem de área corada com PAS; ` = dados ausentes

Peça	Solução	TI	FBC (Hz)	VTM (mm/min)	Int. epit.	Infl. Subep.	% AA	% PAS
21A	LPD	6h	10,17	0,01923	moderada	grave	.	.
22B	LPD	6h	11,18	0	alta	grave	6,93	13,89
29A	LPD	6h	0	0	alta	moderada	2,23	5
30B	LPD	6h	14,27	0	moderada	moderada	11,26	18,22
49A	LPD	6h	15,46	0,03158	pouca	leve	5,22	.
50A	LPD	6h	15,54	0	alta	leve	3,86	9,68
51B	LPD	6h	14,49	0	moderada	grave	24,57	16,48
52A	LPD	6h	15,72	0	alta	moderada	17,01	8,11
53B	LPD	6h	13,69	0	moderada	moderada	13,17	10,32
55B	LPD	6h	10,23	0	moderada	moderada	15,1	18,77
56A	LPD	6h	11,57	0	pouca	moderada	9,86	15,86
60B	LPD	6h	15,04	0,04068	alta	moderada	8,3	13,74
62B	LPD	6h	14,42	0,04266	alta	grave	11,39	15,79
69B	LPD	6h	13,16	0,05	moderada	moderada	4,69	5,48
71A	LPD	6h	15,14	0,01011	alta	moderada	2,35	11,35
75A	LPD	6h	15,56	0,03871	moderada	leve	3,49	6,22
77A	LPD	6h	0	0	pouca	moderada	11,7	15,41
84A	LPD	6h	13,57	0,03863	.	.	.	.
86B	LPD	6h	13,46	0	pouca	moderada	2,1	5,42
91B	LPD	6h	15,59	0,09023	alta	grave	9,55	.
128A	LPD	6h	13,86	0,06	alta	grave	0,22	26,5
12A	LPD	24h	10,82	0	pouca	moderada	2,17	18,51
13B	LPD	24h	13,37	0	moderada	grave	13,29	18,54
16B	LPD	24h	8,7	0,08333	.	.	.	.
31A	LPD	24h	13,03	0,01176	.	.	.	.
32B	LPD	24h	12,06	0,01268	moderada	moderada	1,05	17,95
40A	LPD	24h	12,18	0,04444	pouca	grave	6,38	7,75
41B	LPD	24h	14,78	0,012	moderada	moderada	3,43	11,49
42A	LPD	24h	12,66	0	pouca	grave	0,35	10,73
43B	LPD	24h	12,72	0	pouca	grave	6,99	14,44
46A	LPD	24h	15,98	0	pouca	moderada	0,02	0
61A	LPD	24h	15,79	0,04444	moderada	leve	7,31	19,43
63A	LPD	24h	14,54	0	pouca	moderada	2,48	.

Continua...

## Continuação Anexo C

Peça	Solução	TI	FBC (Hz)	VTM (mm/min)	Int. epit.	Infl. Subep.	% AA	% PAS
68A	LPD	24h	9,44	0	pouca	leve	11	10,04
70B	LPD	24h	12,67	0,04737	moderada	leve	14,03	20,74
79B	LPD	24h	11,7	0	pouca	grave	5,22	10,25
88B	LPD	24h	13,31	0,03462	alta	moderada	.	.
89B	LPD	24h	0	0	pouca	grave	7,58	16,47
92A	LPD	24h	15,24	0,02473	moderada	leve	16,47	17,33
93B	LPD	24h	16,76	0,05697	alta	leve	.	11,47
101B	LPD	24h	10,65	0,0375	alta	leve	6,07	10,61
109A	LPD	24h	0	0	pouca	leve	0,52	1,77
109B	LPD	24h	0	0	pouca	moderada	0,5	8,47
116A	LPD	24h	14,56	0,10846	alta	moderada	0,83	.
125A	LPD	24h	14,56	0,00789	alta	grave	3,81	6,12
14A	LPD	16h	12,38	0,03	pouca	moderada	7,69	14,34
15B	LPD	16h	12,67	0	pouca	grave	3,09	26,23
27A	LPD	16h	16,84	0,13239	pouca	moderada	.	.
28B	LPD	16h	16,17	0	pouca	leve	.	.
37A	LPD	16h	14,15	0,05922	moderada	moderada	2,43	4,22
38B	LPD	16h	14,09	0	pouca	grave	8,59	5,44
44A	LPD	16h	16,67	0	alta	moderada	5,42	26,97
45B	LPD	16h	15,4	0,03913	pouca	grave	5,52	14,16
47A	LPD	16h	14,77	0	pouca	leve	1,91	11,81
48B	LPD	16h	15,07	0	alta	grave	8,67	30,84
73B	LPD	16h	13,68	0	.	.	.	8,58
80A	LPD	16h	12,46	0,03396	alta	moderada	1,44	10,98
81B	LPD	16h	17,04	0,02432	.	.	.	.
82A	LPD	16h	12,7	0,015	moderada	moderada	4,03	4,15
85A	LPD	16h	13,85	0,03333	moderada	leve	0,84	26,2
97A	LPD	16h	12,22	0,02951	.	.	5,71	9,09
100B	LPD	16h	11,87	0,09375	moderada	leve	1,56	9,02
104A	LPD	16h	12,29	0	pouca	moderada	1,06	17,34
104B	LPD	16h	0	0	alta	grave	5,58	20,94
108A	LPD	16h	11,94	0	alta	moderada	8,52	7,24
108B	LPD	16h	13,29	0,02647	alta	grave	4,24	14,33
54B	LPD	10h	12,6	0	moderada	moderada	17,76	15,53
76B	LPD	10h	15,08	0,04186	pouca	moderada	3,36	17,14
83A	LPD	10h	13,71	0,02813	.	.	.	6,59
90A	LPD	10h	15,47	0,06	alta	grave	10,86	18,22
94B	LPD	10h	13,07	0,02727	pouca	moderada	0	.
102A	LPD	10h	15,02	0,06	moderada	leve	0,78	3,69
103A	LPD	10h	14,51	0,06667	alta	moderada	2,28	5,41
105B	LPD	10h	12,66	0,02369	pouca	grave	5,51	6,82
106A	LPD	10h	11,7	0,03913	pouca	leve	5,94	5,86

Continua...

## Continuação Anexo C

Peça	Solução	TI	FBC (Hz)	VTM (mm/min)	Int. epit.	Infl. Subep.	% AA	% PAS
107A	LPD	10h	13,69	0,02572	alta	leve	2,55	12,23
110A	LPD	10h	0	0	pouca	moderada	0	5,8
110B	LPD	10h	7,73	0	pouca	moderada	5,29	8,01
112B	LPD	10h	15,09	0,04138	alta	moderada	3,18	11,94
115B	LPD	10h	14,5	0	alta	leve	3,6	13,53
117A	LPD	10h	13,3	0,06	pouca	moderada	2,09	4,01
120A	LPD	10h	12,87	0,01875	pouca	moderada	1,93	13,11
124A	LPD	10h	14,36	0,05455	alta	moderada	0,64	4,9
124B	LPD	10h	13,74	0	.	.	8,26	10,04
127B	LPD	10h	0	0	moderada	grave	7,65	6,66
131B	LPD	10h	0	0	alta	leve	3,91	8,49
57A	HTK	6h	14,88	0	alta	moderada	2,02	9,2
60A	HTK	6h	13,58	0,07947	pouca	moderada	14,88	15,85
62A	HTK	6h	14,03	0,06924	moderada	leve	11,22	40,58
64A	HTK	6h	14,03	0,06667	alta	leve	1,72	21,57
64B	HTK	6h	13,7	0,03158	alta	grave	7,91	15,7
69A	HTK	6h	14,18	0,03333	alta	leve	10,92	26,46
71B	HTK	6h	15,07	0,04286	alta	grave	.	19,15
75B	HTK	6h	14,33	0	pouca	leve	1,57	.
77B	HTK	6h	12,79	0	pouca	grave	5,26	4,65
84B	HTK	6h	15,4	0,02308	.	.	.	.
86A	HTK	6h	12,71	0,02572	moderada	moderada	2,92	12,81
87A	HTK	6h	13,1	0,04737	alta	leve	.	6,25
87B	HTK	6h	12,42	0,02637	pouca	grave	1,11	10,08
91A	HTK	6h	14,36	0,04737	alta	moderada	3,7	16,34
95A	HTK	6h	13,98	0,02903	.	.	.	.
95B	HTK	6h	14,42	0,075	pouca	leve	0,22	0,46
98A	HTK	6h	16,21	0,07827	alta	moderada	2,95	22,44
98B	HTK	6h	11,88	0,02069	alta	moderada	7,12	13,7
126B	HTK	6h	13,67	0,01111	alta	grave	9,52	2,03
128B	HTK	6h	12,82	0,06667	moderada	moderada	1,79	5,19
58A	HTK	24h	12,11	0	pouca	leve	6,58	3,45
61B	HTK	24h	0	0	pouca	grave	5,29	4,61
63B	HTK	24h	14,57	0,03582	moderada	moderada	7,67	19,05
65B	HTK	24h	14,01	0	alta	grave	8,9	10,34
68B	HTK	24h	11,54	0	pouca	leve	5,02	7,66
70A	HTK	24h	14,86	0,01579	pouca	leve	0,99	10,18
74A	HTK	24h	14,92	0,01111	pouca	moderada	0,37	8,51
74B	HTK	24h	13,64	0	moderada	moderada	13,62	17,77
79A	HTK	24h	10,48	0	alta	moderada	10,5	11,91
88A	HTK	24h	14,7	0	pouca	moderada	.	6,21
89A	HTK	24h	0	0	pouca	grave	1,51	10,51

Continua...

## Continuação Anexo C

Peça	Solução	TI	FBC (Hz)	VTM (mm/min)	Int. epit.	Infl. Subep.	% AA	% PAS
92B	HTK	24h	15,44	0,06	alta	moderada	6,58	12,88
93A	HTK	24h	16,67	0,18007	pouca	leve	0,13	5,32
96A	HTK	24h	13,57	0,01579	alta	moderada	5,02	12,24
96B	HTK	24h	8,48	0	pouca	moderada	7,7	20,26
101A	HTK	24h	11,76	0,05233	moderada	grave	.	2,73
113A	HTK	24h	15,15	0,05295	alta	leve	0,39	5,74
113B	HTK	24h	13,53	0,04091	alta	grave	5,21	6,3
116B	HTK	24h	14,71	0,075	alta	grave	2,1	13,78
121A	HTK	24h	0	0	pouca	moderada	6,33	0,28
121B	HTK	24h	0	0	pouca	leve	1,88	6,49
125B	HTK	24h	14,11	0,025	moderada	grave	1,21	8,4
65A	HTK	16h	14	0,01357	moderada	moderada	2,5	4,12
66A	HTK	16h	11,25	0	pouca	leve	3,61	4,88
66B	HTK	16h	0	0	pouca	grave	6,99	3,63
67A	HTK	16h	13,21	0	moderada	moderada	5,38	12,97
67B	HTK	16h	12,48	0	moderada	moderada	14,28	11,82
72A	HTK	16h	14,39	0,01084	alta	moderada	2,68	3,12
72B	HTK	16h	11,27	0,00779	pouca	grave	1,86	2,13
73A	HTK	16h	14,98	0,03913	alta	leve	0,99	.
78A	HTK	16h	9,91	0	alta	moderada	12,04	18,54
78B	HTK	16h	0	0	alta	grave	12,45	25,09
80B	HTK	16h	13,74	0,01935	alta	moderada	2,32	.
81A	HTK	16h	15,97	0,04167	alta	leve	6,11	9,67
82B	HTK	16h	15,09	0	moderada	grave	16,14	13,33
85B	HTK	16h	14,82	0	alta	moderada	11,42	35,33
97B	HTK	16h	13,9	0,0439	moderada	moderada	7,19	11,78
100A	HTK	16h	12,22	0,03529	alta	moderada	4,37	7,67
122A	HTK	16h	13,16	0,04737	alta	grave	5,1	15,64
122B	HTK	16h	14,34	0	alta	grave	7,49	13,34
129A	HTK	16h	14,71	0	pouca	moderada	7,82	15,53
76A	HTK	10h	13,64	0,01875	alta	leve	3,79	10,76
83B	HTK	10h	15,3	0	moderada	grave	21,92	27
90B	HTK	10h	14,78	0,02093	alta	grave	13,37	15,71
94A	HTK	10h	14,39	0,05143	moderada	moderada	3,48	10,26
111A	HTK	10h	15,47	0,02432	alta	moderada	10,27	10
111B	HTK	10h	15,62	0,03333	pouca	moderada	6,17	10,94
112A	HTK	10h	15,24	0,13239	.	.	3,59	6,43
114A	HTK	10h	16,14	0,07059	alta	moderada	1,09	3,85
114B	HTK	10h	12,84	0,02903	alta	moderada	3,93	8,97
115A	HTK	10h	13,99	0	moderada	moderada	0,18	8,75
117B	HTK	10h	13,65	0,075	alta	moderada	1,8	2,27

Continua...

## Continuação Anexo C

Peça	Solução	TI	FBC (Hz)	VTM (mm/min)	Int. epit.	Infl. Subep.	% AA	% PAS
118A	HTK	10h	13,67	0,15259	pouca	leve	0,33	12,25
118B	HTK	10h	13,24	0,06924	moderada	grave	7,45	19,46
119B	HTK	10h	10,54	0	alta	moderada	15,21	8,99
120B	HTK	10h	11,59	0	pouca	grave	10,27	12,58
123A	HTK	10h	12,1	0	pouca	leve	1,79	7,08
123B	HTK	10h	12,64	0	pouca	moderada	0	32,36
126A	HTK	10h	14,27	0	moderada	moderada	1,97	17,45
127A	HTK	10h	0	0	moderada	grave	.	9,57
130B	HTK	10h	12,3	0	moderada	leve	1,91	7,96
2B	Salina	6h	12,16	0	alta	grave	5,45	29,71
19A	Salina	6h	10,74	0,05455	alta	leve	.	.
20A	Salina	6h	9,92	0	alta	leve	.	.
49B	Salina	6h	15,96	0,06667	.	.	.	24,17
50B	Salina	6h	15,25	0	moderada	grave	16,5	27,94
51A	Salina	6h	14,88	0	pouca	leve	0,19	15,52
52B	Salina	6h	13,18	0	alta	leve	7,36	10,84
53A	Salina	6h	14,01	0	alta	grave	1,3	9,81
55A	Salina	6h	10,28	0,015	pouca	leve	0	0
56B	Salina	6h	11,78	0	alta	moderada	12,49	.
2A	Salina	24h	8,78	0	pouca	grave	.	.
4B	Salina	24h	0	0	pouca	grave	4,45	.
6B	Salina	24h	7,8	0,024	alta	moderada	10,16	13,6
10A	Salina	24h	5,65	0	pouca	moderada	0,48	6,97
11B	Salina	24h	10,98	0	moderada	moderada	.	.
25B	Salina	24h	10,43	0	alta	grave	12,49	22,78
26A	Salina	24h	13,27	0	pouca	moderada	3,82	17,83
35A	Salina	24h	14,48	0	moderada	moderada	1,75	6,64
36B	Salina	24h	12,54	0	pouca	moderada	3,78	17,8
42B	Salina	24h	13,7	0	pouca	grave	7,97	18,61
43A	Salina	24h	10,64	0	pouca	leve	3,67	5,72
8A	Salina	16h	8,71	0	pouca	moderada	5,18	21,92
8B	Salina	16h	11,87	0	alta	moderada	3,09	6,2
23A	Salina	16h	12,78	0	pouca	grave	9,44	1,99
24B	Salina	16h	9,23	0	alta	grave	11,28	5,21
33A	Salina	16h	13,84	0	pouca	moderada	1,8	4,84
34B	Salina	16h	13,95	0,04865	alta	grave	8,77	16,97
37B	Salina	16h	17,46	0,05	moderada	leve	2,38	10,78
38A	Salina	16h	14,92	0,01154	alta	leve	12,87	9,63
44B	Salina	16h	17,04	0	moderada	grave	12,18	7,71
45A	Salina	16h	14,64	0,03	pouca	leve	0,21	5,3
17A	Salina	10h	8,19	0,09375	alta	moderada	21,62	23,06
18B	Salina	10h	8,09	0,10345	alta	moderada	11,33	13,42

Continua...

## Conclusão Anexo C

Peça	Solução	TI	FBC (Hz)	VTM (mm/min)	Int. epit.	Infl. Subep.	% AA	% PAS
54A	Salina	10h	11,36	0	pouca	moderada	17,47	17,86
99A	Salina	10h	13,55	0,03158	pouca	leve	6,71	24,47
99B	Salina	10h	10,12	0	moderada	leve	0,6	11,05
102B	Salina	10h	13,68	0,00769	alta	moderada	0,65	3,73
103B	Salina	10h	10,47	0	alta	moderada	1,73	4,3
105A	Salina	10h	14,07	0,01765	moderada	moderada	0,33	3,92
106B	Salina	10h	12,33	0,01957	moderada	grave	4,37	9,48
107B	Salina	10h	13	0	alta	leve	3,71	17,23
119A	Salina	10h	14,13	0	alta	leve	3,34	6,82
4A	Controle	Controle	10,66	0,0219	pouca	moderada	.	.
5B	Controle	Controle	14,12	0,06316	alta	grave	14,19	32,89
6A	Controle	Controle	11,64	0,12	moderada	leve	.	.
39A	Controle	Controle	20,1	0,26478	pouca	leve	3,33	8,67
39B	Controle	Controle	19,52	0,11394	alta	leve	11,62	17,58
57B	Controle	Controle	15,95	0	.	.	.	.
58B	Controle	Controle	14,4	0,14521	alta	grave	11,21	13,02
59A	Controle	Controle	16,39	0,10468	pouca	leve	14,48	10,6

## 8 REFERÊNCIAS

---

Abbasidezfouli A, Shadmehr MB, Arab M, Javaherzadeh M, Pejhan S, Daneshvar A, Farzanegan R. Postintubation multisegmental tracheal stenosis: treatment and results. *Ann Thorac Surg.* 2007 Jul;84(1):211-4.

Albes JM, Klenzner T, Kotzerke J, Thiedemann KU, Schäfers HJ, Borst HG. Improvement of tracheal autograft revascularization by means of fibroblast growth factor. *Ann Thorac Surg.* 1994;57(2):444-9.

Alexander I, Ritchie BC, Maloney JE, Hunter CR. Epithelial surfaces of the trachea and principal bronchi in the rat. *Thorax.* 1975 Apr;30(2):171-7.

Anderson TM, Miller JI Jr. Use of pleura, azygos vein, pericardium, and muscle flaps in tracheobronchial surgery. *Ann Thorac Surg.* 1995;60(3):729-33.

Azevedo-Pereira AE, Saka JA, Oliveira KA, Pazetti R, Pêgo-Fernandes PM, Jatene FB. Impact of topically-applied lpd-glucose on tracheal mucociliary clearance after warm and cold ischemia: short communication. *Clinics.* 2011;66(2):347-349.

Beigel A, Müller-Ruchholtz W. Tracheal transplantation: I. The immunogenic effect of rat tracheal transplants. *Arch Otorhinolaryngol.* 1984; 240(2):185-92.

Becker T, Ringe B, Nyibata M, Meyer zu Vilsendorf A, Schrem H, Lück R, Neipp M, Klempnauer J, Bektas H. Pancreas transplantation with histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution and University of Wisconsin (UW) solution: is there a difference? *JOP.* 2007;8(3):304-11.

Birchall M, Macchiarini P. Airway transplantation: a debate worth having? *Transplantation*. 2008;85(8):1075-80.

Bretschneider HJ. Myocardial protection. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1980;28(5):295-302.

Burket WC. Transplantation of the trachea. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1918;29:35-40

Carretta A, Casiraghi M, Melloni G, et al. Montgomery T-tube placement in the treatment of benign tracheal lesions. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009;36:352-6.

Cleven HA, Genden EM, Moran TM. Reepithelialized orthotopic tracheal allografts expand memory cytotoxic T lymphocytes but show no evidence of chronic rejection. *Transplantation*. 2005;79(8):861-8.

Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5(7):772-7.

Delaere P, Vranckx J, Verleden G, De Leyn P, Van Raemdonck D; Leuven Tracheal Transplant Group. Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy. *N Engl J Med*. 2010;362(2):138-45.

de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):490-511.

Dodge-Khatami A, Backer CL, Holinger LD, Mavroudis C, Cook KE, Crawford SE. Healing of a free tracheal autograft is enhanced by topical vascular endothelial growth factor in an experimental rabbit model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;122(3):554-61.

Fell SC, Mollenkopf FP, Montefusco CM, Mitsudo S, Kamholz SL, Goldsmith J, Veith FJ. Revascularization of ischemic bronchial anastomoses by an intercostal pedicle flap. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985;90(2):172-8.

Feng L, Zhao N, Yao X, Sun X, Du L, Diao X, Li S, Li Y. Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution vs. University of Wisconsin solution for liver transplantation: a systematic review. *Liver Transpl.* 2007;13(8):1125-36.

Fernández FG, Jaramillo A, Chen C, Liu DZ, Tung T, Patterson GA, Mohanakumar T. Airway epithelium is the primary target of allograft rejection in murine obliterative airway disease. *Am J Transplant.* 2004;4(3):319-25.

Field A. *Descobrimos a estatística usando o SPSS.* Porto Alegre: Artmed; 2009.

Friedel G, Kyriss T, Leitenberger A, Toomes H. Long-term results after 110 tracheal resections. *Ger Med Sci.* 2003; 1:Doc10.

Friedmann I, Bird ES. Ciliary structure, ciliogenesis, microvilli (Electron microscopy of the mucosa of the upper respiratory tract). *Laryngoscope.* 1971;81(11):1852-68

Genden EM, Iskander AJ, Bromberg JS, Mayer L. Orthotopic tracheal allografts undergo reepithelialization with recipient-derived epithelium. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(1):118-23.

Genden EM, Iskander A, Bromberg JS, Mayer L. The kinetics and pattern of tracheal allograft re-epithelialization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(6):673-81.

Gould DS, Auchincloss H Jr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today.* 1999;20(2):77-82.

Grillo HC. Tracheal replacement: a critical review. *Ann Thorac Surg.* 2002;73(6):1995-2004.

Grillo HC. Anatomy of the trachea. In: Grillo HC. *Surgery of the trachea and bronchi.* London: BC Decker; 2004, p.39-59.

Grillo HC. Postintubation stenosis. In: Grillo HC. *Surgery of the trachea and bronchi.* London: BC Decker; 2004, p.301-339.

Grillo HC. Infectious, inflammatory, infiltrative, idiopathic, and miscellaneous tracheal lesions. In: Grillo HC. *Surgery of the trachea and bronchi.* London: BC Decker; 2004, p.363-395.

Grillo HC. Tracheal replacement. In: Grillo HC. *Surgery of the trachea and bronchi.* London: BC Decker; 2004, p.839-854.

Hirata T, Yamazaki F, Fukuse T, Muro K, Yokomise H, Inui K, Takahashi Y, Hirai T, Hitomi S, Wada H. Omentopexy for revascularization of free tracheal grafts in rats. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;40(4):178-81.

Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur Respir J.* 1999;13(5):1177-88.

Ikonen TS, Brazelton TR, Berry GJ, Shorthouse RS, Morris RE. Epithelial re-growth is associated with inhibition of obliterative airway disease in orthotopic tracheal allografts in non-immunosuppressed rats. *Transplantation.* 2000;70(6):857-63.

Inui K, Schäfers HJ, Aoki M, Wada H, Becker V, Ongsiek B, Haverich A. Effect of methylprednisolone and prostacyclin on bronchial perfusion in lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1993;55(2):464-9.

Ito Y, Takahashi T, Suzuki K, Kazui T, Hattori Y, Suzuki H. Inhibition of epithelial replacement by nonspecific immunosuppressants accelerates rat orthotopic tracheal allograft rejection. *Transplant Proc.* 2002;34(5):1441-2.

Ito Y, Suzuki H, Hattori Y, Muhammad BA, Takahashi T, Suzuki K, Kazui T. Complete replacement of tracheal epithelia by the host promotes spontaneous acceptance of orthotopic tracheal allografts in rats. *Transplant Proc.* 2004;36(8):2406-12.

Jadczuk E. High doses of hydrocortisone improved tracheal autograft revascularization. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1998;14(6):615-20.

Joki S, Toskala E, Saano V, Nuutinen J. Ciliary ultrastructure and beating activity in rat and guinea-pig respiratory mucosa. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995;22(9):619-23.

Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med.* 2000;136(6):427-40.

Keshavjee SH, Yamazaki F, Yokomise H, Cardoso PF, Mullen JB, Slutsky AS, Patterson GA. The role of dextran 40 and potassium in extended hypothermic lung preservation for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;103(2):314-25.

Klaus F, Castro DB, Bittar CM, Bittar AE, Keitel E, Seelig DC, Goldani JC, Meine MH, Garcia VD. Kidney transplantation with Belzer or Custodiol solution: a randomized prospective study. *Transplant Proc.* 2007;39(2):353-4.

Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest.* 2002;109(5):571-7.

Kucera KA, Doss AE, Dunn SS, Clemson LA, Zwischenberger JB. Tracheal replacements: part 1. *ASAIO J.* 2007;53(4):497-505.

Lu BS, Garrity ER, Jr., Bhorade SM. Immunosuppressive drugs: cyclosporine, tacrolimus, sirolimus, azathioprine, mycophenolate mofetil, and corticosteroids. In: Lynch III JP, Ross DJ. Lung and heart-lung transplantation. New York: Taylor & Francis Group; 2006, p.363-399.

Luh SP, Yang PC, Lee CJ, Tsai TP, Wang YH. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate and Euro-Collins solutions for lung preservation using the minipig in situ warm ischemia model. *J Formos Med Assoc.* 2004;103(4):292-6.

Macchiarini P, Mazmanian GM, de Montpréville V, Dulmet E, Fattal M, Lenot B, Chapelier A, Darteville P. Experimental tracheal and tracheoesophageal allotransplantation. Paris-Sud University Lung Transplantation Group. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995a;110(4 Pt 1):1037-46.

Macchiarini P, Mazmanian GM, de Montpréville VT, Dulmet EM, Chapelier AL, Darteville PG. Maximal preservation time of tracheal allografts. The Paris-Sud University Lung Transplantation Group. *Ann Thorac Surg.* 1995b;60(6):1597-604.

Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet.* 2008; 372(9655):2023-30

McNell K, Foweraker J, Wreghitt T. Infectious complications. In: Banner NR, Polak JM, Yacoub MH. Lung transplantation. Cambridge: Cambridge University Press; 2003, p.251-260.

Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ferdman A, Luk SK, Cooper JD. Successful revascularization of totally ischemic bronchial autografts with omental pedicle flaps in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982;84(2):204-10.

Mayer E, Cardoso PF, Puskas JD, De Campos K, Oka T, Dardick I, Patterson GA. The effect of basic fibroblast growth factor and omentopexy on revascularization and epithelial regeneration of heterotopic rat tracheal isografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;104(1):180-8.

Mühlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc.* 1999;31(5):2069-70.

Nakanishi R, Umesue M, Hashimoto M, Muranaka H, Hachida M, Yasumoto K. Limit of warm ischemia time before cryopreservation in rat tracheal isografts. *Ann Thorac Surg.* 2000;70(6):1880-4.

Nakanishi R. Revascularization of trachea in lung and tracheal transplantation. *Clin Transplant.* 2007;21(5):668-74.

Olech VM, Keshavjee SH, Chamberlain DW, Slutsky AS, Patterson GA. Role of basic fibroblast growth factor in revascularization of rabbit tracheal autografts. *Ann Thorac Surg.* 1991;52(2):258-64.

Oliveira MJ, Pereira AS, Guimarães L, Grande NR, de Sá CM, Aguas AP. Zonation of ciliated cells on the epithelium of the rat trachea. *Lung.* 2003;181(5):275-82.

Panzer P, Rotelli MT, Salerno AM, Cicco G, Catalano G, D'Elia G, Greco L, Lupo L, Memeo V. Solutions for organ perfusion and storage: haemorheologic aspects. *Transplant Proc.* 2005;37(6):2456-8.

Pazetti R, Pêgo-Fernandes PM, Ranzani OT, Parra ER, Lorenzi-Filho G, Jatene FB. Cyclosporin A reduces airway mucus secretion and mucociliary clearance in rats. *Clinics*. 2007;62(3):345-52.

Pazetti R, Pêgo-Fernandes PM, Lorenzi-Filho G, Saldiva PH, Moreira LF, Jatene FB. Effects of cyclosporine A and bronchial transection on mucociliary transport in rats. *Ann Thorac Surg*. 2008;85(6):1925-9.

Pêgo-Fernandes PM, Azevedo-Pereira AE. Tracheal transplantation: is there lumen at the end of the tunnel? *Sao Paulo Med J*. 2009;127(5):249-50.

Qu N, de Vos P, Schelfhorst M, de Haan A, Timens W, Prop J. Integrity of airway epithelium is essential against obliterative airway disease in transplanted rat tracheas. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(7):882-90.

Randell SH, Boucher RC; University of North Carolina Virtual Lung Group. Effective mucus clearance is essential for respiratory health. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35(1):20-8.

Rivero DH, Lorenzi-Filho G, Pazetti R, Jatene FB, Saldiva PH. Effects of bronchial transection and reanastomosis on mucociliary system. *Chest*. 2001;119(5):1510-5.

Rogers DF. Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respir Care*. 2007;52(9):1134-46.

Rose KG, Sesterhenn K, Wustrow OH. Tracheal allotransplantation in man. *Lancet*. 1979;1(8113):433.

Saldiva PHN. Aparelho mucociliar: aspectos funcionais e métodos de estudo. *J Pneumol*. 1990;16:161-70.

Sleigh MA, Blake JR, Liron N. The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis.* 1988;137(3):726-41.

Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet.* 1995;345(8943):176-8.

Shaari CM, Farber D, Brandwein MS, Gannon P, Urken ML. Characterizing the antigenic profile of the human trachea: implications for tracheal transplantation. *Head Neck.* 1998;20(6):522-7.

Siegelman SS, Hagstrom JW, Koerner SK, Veith FJ. Restoration of bronchial artery circulation after canine lung allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1977;73(5):792-5.

Smith DE, Waddell TK, DeCampos KN, Slutsky AS, Patterson GA. Effect of methylprednisolone on angiogenesis in syngeneic rat tracheal grafts. *Ann Thorac Surg.* 1994;57(3):652-6.

Smith DJ, Gaffney EA, Blake JR. Modelling mucociliary clearance. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008;163(1-3):178-88.

Sung SW, Won T. Effects of basic fibroblast growth factor on early revascularization and epithelial regeneration in rabbit tracheal orthotopic transplantation. *Eur J Cardiothoracic Surg* 2001; 19:14-8.

Terra RM, Minamoto H, Tedde ML, Almeida JL, Jatene FB. Self-expanding stent made of polyester mesh with silicon coating (Polyflex) in the treatment of inoperable tracheal stenosis. *J Bras Pneumol.* 2007;33(3):241-7.

Trindade SHK, Mello Júnior JF, Mion OG, Lorenzi-Filho G, Macchione M, Guimarães IT, Saldiva PHN. Métodos de estudo do transporte mucociliar. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007;73(5):704-12.

Upham JW, Stick SM. Interactions between airway epithelial cells and dendritic cells: implications for the regulation of airway inflammation. *Curr Drug Targets*. 2006;7(5):541-5.

Wagner EM, Foster WM. Importance of airway blood flow on particle clearance from the lung. *J Appl Physiol*. 1996;81(5):1878-83.

Warnecke G, Strüber M, Hohlfeld JM, Niedermeyer J, Sommer SP, Haverich A. Pulmonary preservation with Bretschneider's HTK and Celsior solution in minipigs. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;21(6):1073-9.

Wright CD, Grillo HC, Wain JC, Wong DR, Donahue DM, Gaissert HA, Mathisen DJ. Anastomotic complications after tracheal resection: Prognostic factors and management. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;128:731-9.

Wu DX, Lee CY, Widdicombe JH, Bastacky J. Ultrastructure of tracheal surface liquid: low-temperature scanning electron microscopy. *Scanning*. 1996;18(8):589-92.

Wurtz A, Porte H, Conti M, Desbordes J, Copin MC, Azorin J, Martinod E, Marquette CH. Tracheal replacement with aortic allografts. *N Engl J Med*. 2006;355(18):1938-40.