

FALTA DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CÃES A ENXERTOS VASCULARES HETERÓLOGOS (VEIA SAFENA HUMANA E AORTA DE GALLUS GALLUS DOMESTICUS)

ANGELO MAGNAHI, EUCLYDES MARQUES

Na presente pesquisa, os autores enxertaram segmentos de veia safena interna humana e de aorta de Gallus gallus domesticus, anteriormente liofilizadas, na artéria femoral de cães. Os estudos histológicos pré-enxertia demonstraram que a reidratação após liofilização devolvia aos segmentos o seu aspecto normal.

A pesquisa demonstrou que o processo de liofilização, privando os segmentos vasculares de sua antigenicidade, permite o seu uso em enxertos vasculares.

A liofilização é largamente utilizada na preservação de estruturas biológicas, possibilitando o armazenamento de vacinas^{1,2}, vírus^{3,4}, bactérias⁵⁻⁷, sangue e derivados^{8,9}, órgãos e diferentes tecidos^{10,11}.

Vários estudos procuraram conhecer o efeito desse processo sobre as estruturas teciduais, tais como os de Captain Freuz e col.¹², Pritman¹³ e Ginsburg¹⁴, constando que o tecido muscular tem sua contratilidade pouco alterada. Basset¹⁵, realizando homotransplante de tecidos liofilizados, verificou que eles têm sua antigenicidade diminuída, sendo tolerados pelo receptor. Considerando as premissas acima, a presente investigação objetivou: 1) verificar a influência da liofilização sobre a estrutura de vasos sanguíneos; 2) estudar a capacidade antigênica de vasos liofilizados através de enxerto heterólogo em animais.

MATERIALE MÉTODOS

Utilizamos seis segmentos de veia safena interna humana e cinco segmentos de aorta de Gallus gallus domesticus, medindo de 2,5 até 3,0 em de comprimento, após processo de liofilização e reidratação. Esse material foi enxertado em 11 cães adultos, de modo a restabelecer a continuidade de suas artérias femorais esquerdas, que eram previamente seccionadas transversalmente no seu terço proximal. Após meses, foi feito o controle funcional dos enxertos através de arteriografia seletiva com Hypaque M-76%.

Para avaliar o comportamento imunológico, procedeu-se à análise do soro dos animais enxertados através de imunoelctroforese em agar-gel e contra imunoelctroforese em acetato de celulose para, eventualmente, detectar a existência de anticorpos anti-veia safena e anti-soro humano, bem como anticorpos anti-aorta e anti-soro de Gallus gallus domesticus. Para as reações sorológicas foram usados antígenos retirados, respectivamente, da safena e da aorta, segundo o método de Kaplan¹⁶, modificado por Takeda* - A dosagem protéica dos respectivos antígenos foi realizada segundo o método de Folin descrito por Lowry¹⁷. Foi também efetuado teste de resistência tecidual dos segmentos vasculares após reidratação, submetendo-os à pressão de até 1.000 mmHg durante 1 minuto. Para tanto, uma das extremidades do vaso era conectada a uma seringa contendo solução fisiológica e outra a uma coluna de mercúrio graduada.

Os vasos foram estudados histologicamente pelo método de hematoxilina-eosina, antes e após os transplantes.

Para o preparo do material no decorrer da 1.^a hora, veias safenas internas humanas e aortas das aves retiradas foram exaustivamente lavadas em solução de Krebs oxigenada, para ficarem totalmente livres de sangue. A camada adventícia foi cuidadosamente excisada e os segmentos novamente lavados na mesma solução oxigenada. A seguir, os segmentos vasculares foram colocados em tubos de ensaio mar-

Takeda, A. - Comunicação Pessoal, 1985.

cados e congelados a -85°C . Para a liofilização, utilizou-se aparelho de W. Edward & Co. durante 24 horas com um vácuo final de 15 microns, medido com vacuômetro de Stokes McLeod Gauge. Após extinção do vácuo com gás argônio, os tubos foram fechados e hermeticamente lacrados com parafina em volta da rolha, tendo sido mantidos à temperatura ambiente de 20°C a 25°C , durante 3 a 10 meses antes de seu uso.

Imediatamente antes da utilização, os segmentos vasculares eram reidratados mediante imersão por cerca de 60 a 90 minutos em mistura de igual volume de solução de Krebs e sangue do animal hospedeiro. A seguir, procedia-se à transecção da artéria femoral esquerda de cães e enxertava-se o segmento vascular liofilizado e reidratado (sutura contínua com fio de polipropileno n.º 7-0).

Logo após o ato operatório, os animais recebiam uma injeção de penicilina (benzetacil 1.200 U do Laboratório Fontoura Wyeth), sendo mantidos por um período de 40 a 120 dias em controle, sem que fossem administrados quaisquer outros medicamentos.

RESULTADOS

A arteriografia seletiva mostrou que, das 6 artérias femorais enxertadas com veia safena interna humana, 4 estavam ocluídas e 2 pérvias. Uma das artérias pérvias tinha calibre normal e a outra apresentava luz muito reduzida e calibre irregular, dando a impressão de trombose recanalizada. Dos cães que receberam transplante de segmentos de aorta, 4 tinham trombose oclusiva total com circulação colateral e uma apresentava irregularidades, mas estava pérvia após 120 dias de pós-operatório (fig. 1 e 2).

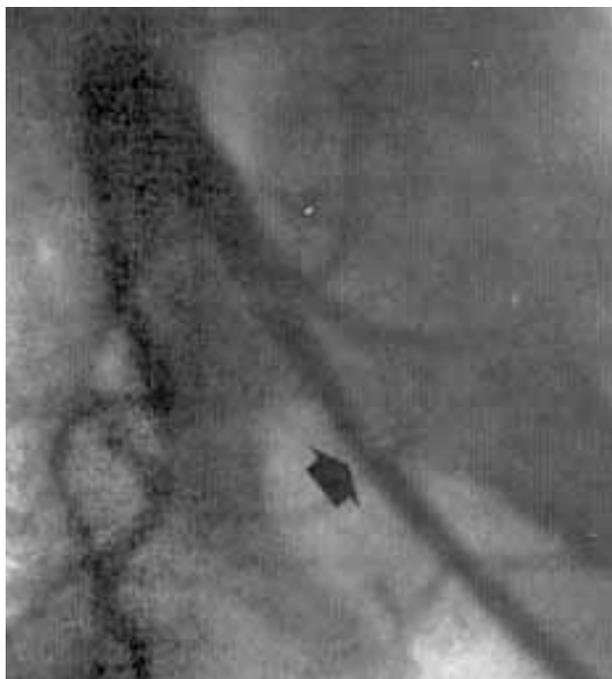


Fig. 1 - Arteriografia de exerto de veia safena interna humana com 40 dias de pós-operatório.



Fig. 2 - Arteriografia de exerto de aorta de *Gallus gallus domesticus* com 120 dias de pós-operatório. Nota-se o vaso prévio e regular.

A avaliação imunológica feita mediante imunoeletroforese e com contra-imunoeletroforese não permitiu caracterizar presença de anticorpos contra o antígeno específico das veias safenas humanas ou aortas de *Gallus gallus domesticus* (fig. 3, 4 e 5).

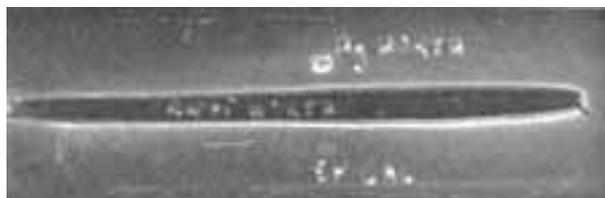


Fig. 3 - Imunoeletroforese em agar gel. Negatividade de anti-corpos específicos anti-aorta e anti-soro normal de *Gallus gallus domesticus* em cão. Reação após 120 dias de enxerto

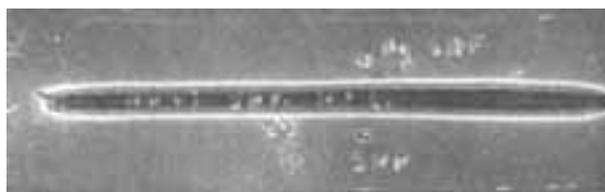


Fig. 4 - Imunoeletroforese em agar gel. Negatividade da pesquisa de anticorpos específicos anti-safena humana e anti-soro humano. Reação com 120 dias de pós-operatório.

Não se verificaram quaisquer indícios de rotura dos segmentos transplantados à pressão imposta.

Pelo método hematoxilina-eosina (HE), foi possível verificar que o processo de liofilização produziu alterações profundas na estrutura histológica dos segmentos vasculares humanos, com restituição do aspecto original após reidratação (fig. 6). Essa particularidade foi também observada nas aortas, tanto

analisadas pelo método da RE quanto pelo método da Orceína, que permite corar as fibras elásticas (figs. 7 a 12).

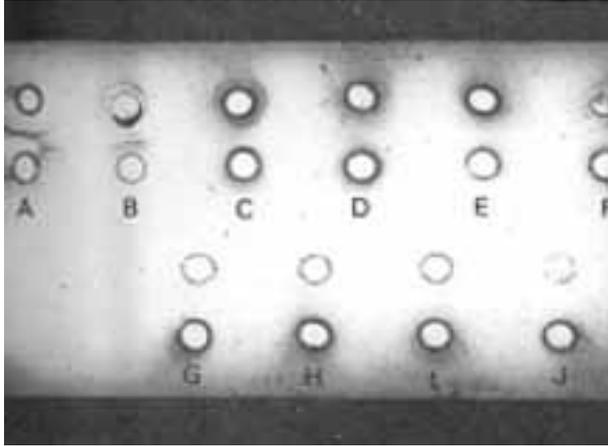


Fig. 5 - Imunoeletróforese cruzada em fita de acetato de celogel. A - Testemunha com soro anti-Gallus gallus padrão no orifício superior e soro normal de Gallus gallus no inferior. (Soro produzido em coelhos em uso no Instituto Adolfo Lutz. C, D, E e F representam as reações negativas dos soros dos cães que receberam enxertos de artéria aorta. B - Testemunha com soro anti-humano no furo de cima e soro normal humano no furo de baixo. G, H, I e J representam as reações negativas entre o soro dos quatro cães que receberam enxertos de veia safena interna humana.

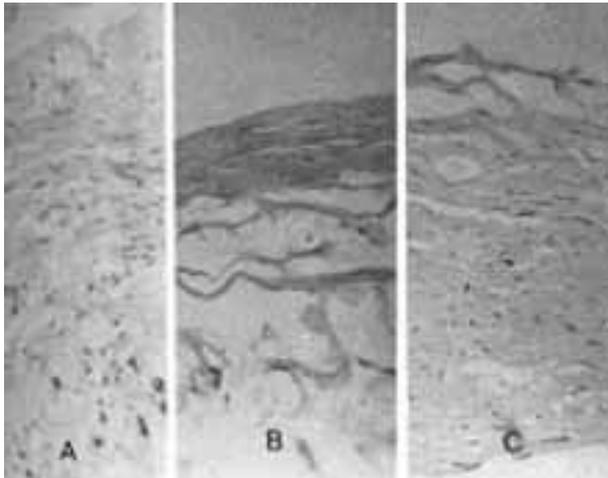


Fig. 6 - A - Corte transversal de veia safena humana normal fresca. B) Corte transversal de veia safena humana após liofilização sem reidratação. C - Corte transversal de veia safena humana após reidratação. Compare com o aspecto normal (A).

Após o período de controle de 40 até 120 dias, os segmentos vasculares enxertados apresentaram sempre alterações histológicas, mesmo os casos em que a luz vascular permanecia pérvia. As principais alterações foram observadas no componente-conjunto com proliferação exuberante e transformação metaplásica cartilaginosa em áreas focais, mantendo-se o endotélio como uma camada de células uniformes sem modificações histológicas (fig. 13).

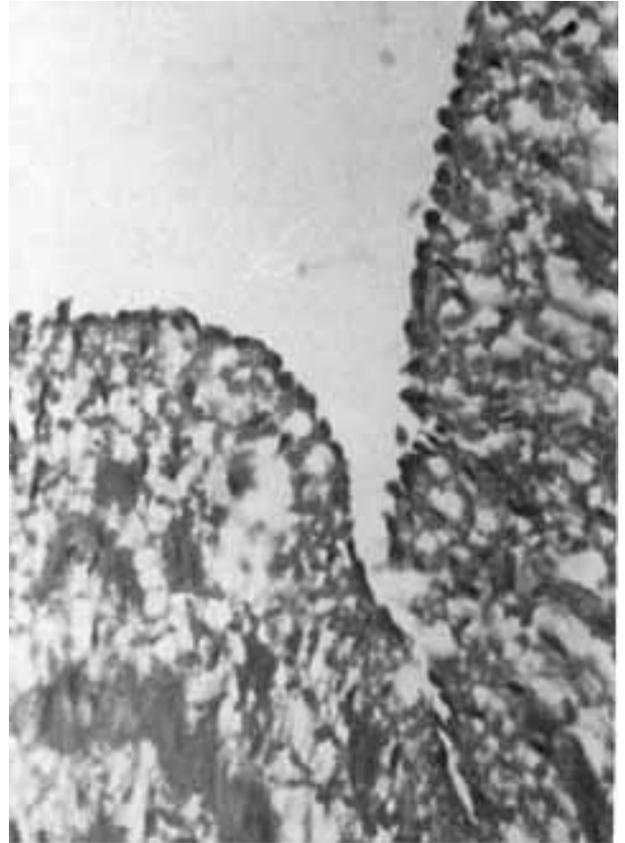


Fig. 7 - Corte histológico de aorta normal de Gallus gallus do mesticus corada pela H.E.



Fig. 8 - Corte histológico de aorta normal de Gallus gallus do mesticus tratado pela orceína, que cora as fibras elásticas.



Fig. 9 - Fragmento de aorta de Gallus gallus domesticus liofilizado, não reidratado e corado pela H.E. após ter sido conservado por dez meses à temperatura ambiente.

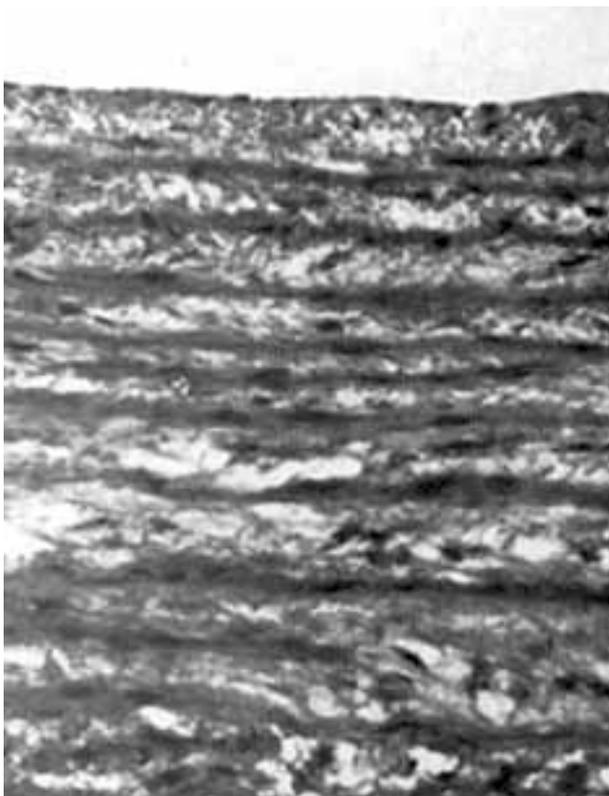


Fig. 10 - Fragmento nas mesmas condições da figura 9, corado pela orceína, que destaca as fibras elásticas.

Quanto à aorta de Gallus gallus domesticus, esses vasos também apresentaram alterações estruturais, tais como zonas de necrose e de calcificação distrófica (fig. 14).

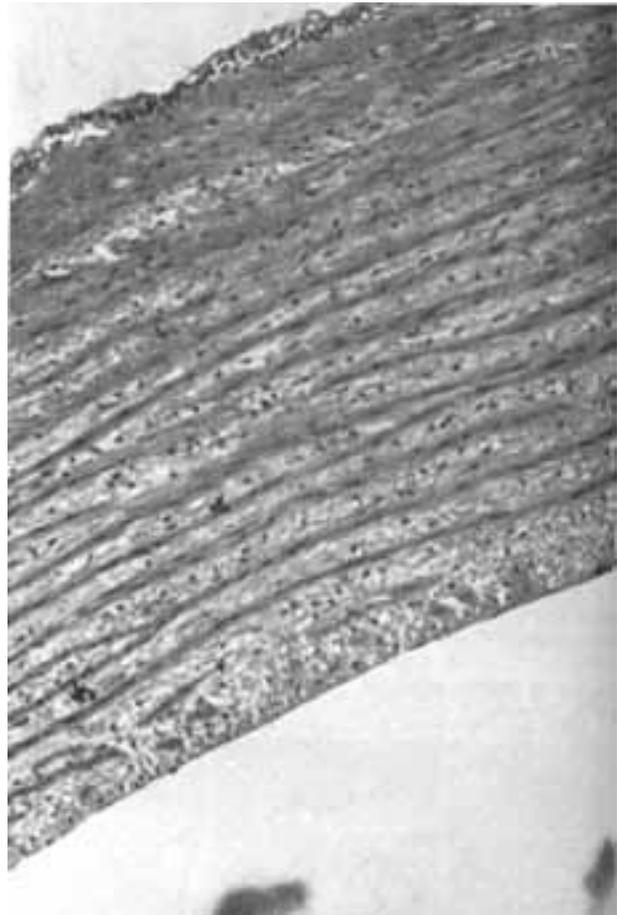


Fig. 11 - Fragmento de aorta liofilizada e reidratada após estocada durante dez meses à temperatura ambiente. A coloração pela H.E. evidencia preservação de todos os elementos constituintes.

COMENTÁRIOS

Muito embora tenha sido referido por outros pesquisadores que a liofilização não altera a vitalidade dos tecidos e que pode inibir a antigenicidade dos mesmos, as experiências sempre utilizaram espécies homólogas. Não encontramos qualquer referência na literatura ao comportamento funcional e antigênico de vasos liofilizados de uma determinada espécie enxertada em outra. Em princípio, seria admissível a ocorrência de rejeição, fato não verificado dentro do período da nossa observação e comprovado pela ausência absoluta de anticorpos específicos anti-veia safena ou anti-aorta. Há elementos suficientes para aceitar que o processo de liofilização foi responsável por tal comportamento, considerando que não foram ministradas quaisquer drogas imunossupressoras. A ocorrência quase constante de trombose dos vasos transplantados parece ligada a condições do endotélio junto ao local da sutura e que, eventualmente,

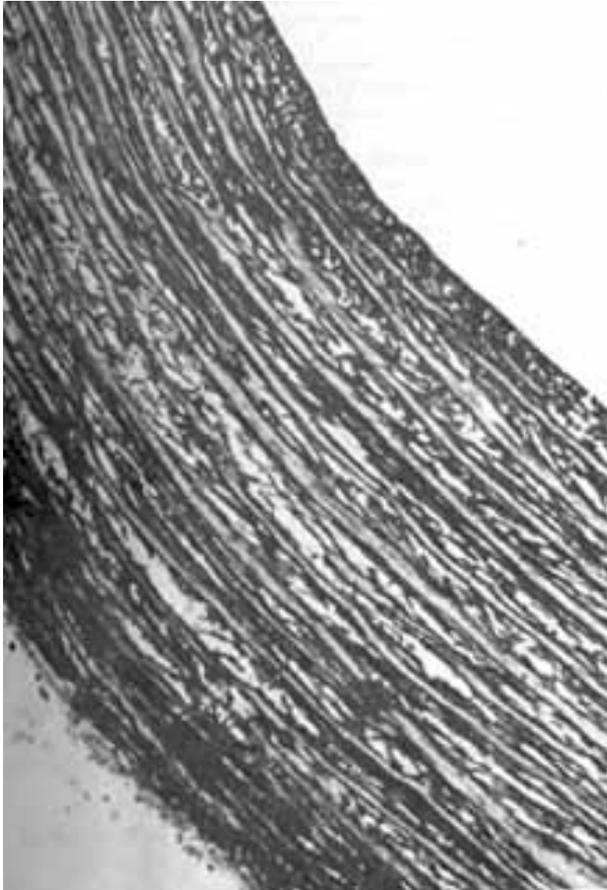


Fig. 12 - Fragmento de aorta nas mesmas condições das indicadas na figura 11, mas corado com orceína, que destaca as fibras elásticas.

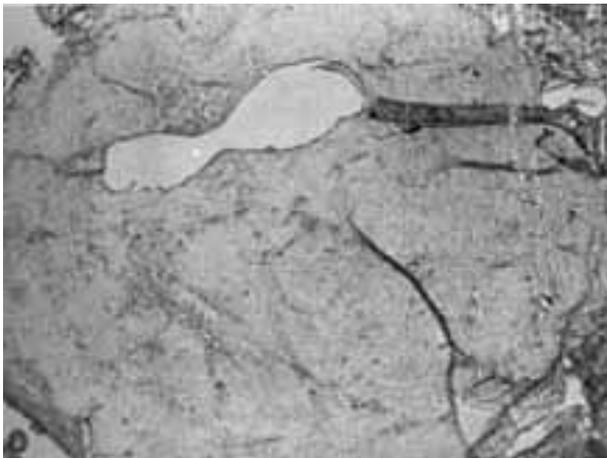


Fig. 13 - Corte histológico de veia safena humana mantida liofilizada durante cinco meses à temperatura ambiente, enxertada na artéria femoral de cão e retirada pós 40 dias.

poderiam ser prevenidas pela ministração de antiplaquetários, mas esse não foi o objetivo da presente investigação.

Para explicar a ausência da resposta imune, é preciso lembrar que os vasos são submetidos a dois tipos de tratamento: o congelamento e o liofilização. Pelo

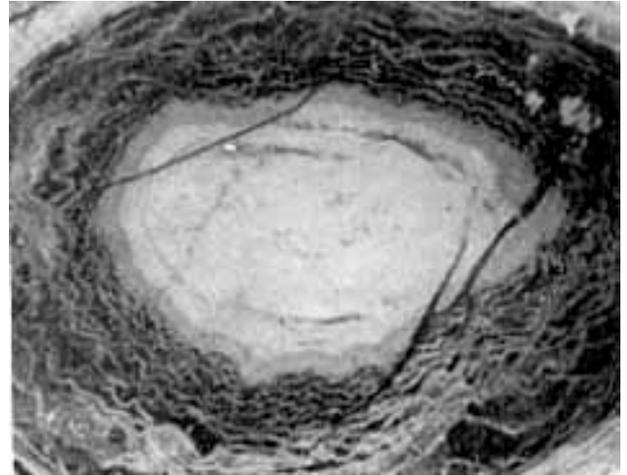


Fig. 14 - Corte histológico de aorta de Gallus gallus domesticus enxertada na artéria femoral de cão (120 dias de evolução). Antes da enxertia o vaso ficou armazenado durante quatro meses à temperatura ambiente.

congelamento, a água presente no meio cristaliza em forma de gelo extra e intracelular, com aumento da concentração salina e da osmolaridade no interior da célula. A presença de condição hipertônica tem como efeito o rompimento das ligações entre os aminoácidos constituintes o DNA. Assim, pelo congelamento desaparecem as forças de coesão molecular de Van der Waals, pontes de hidrogênio e a possibilidade de os enzimas reagirem com o respectivo substrato. Pela liofilização, há sublimação do gelo em forma de vapor de água, restando uma estrutura protéica alterada em relação à original. A reidratação recompõe o arcabouço celular dando ao tecido reidratado uma nova estrutura com padrões “herdados” do receptor. Essa nova estrutura explica a falta de resposta imune, pois o receptor a reconhece como própria.

Merece comentários a alteração metaplástica do tecido conjuntivo, observada em alguns enxertos. Pode-se conjecturar que algumas delas estivessem presentes de forma incipiente nas veias safenas usadas, que representavam segmentos excedentes não utilizados em cirurgias de revascularização. Os vasos tratados previamente por congelamento e liofilização, sendo submetidos no pós-enxerto a regime pressórico mais elevado e constante que o seu habitual, poderiam ser sede de alterações metaplásticas que antes não possuíam.

A presente pesquisa, que demonstra a total falta de resposta imune a vasos liofilizados, abre o caminho para a possível utilização, no homem, de vasos de outras espécies animais, em situações em que enxertos homólogos não podem ser empregados.

SUMMARY

The experience performed by the authors consisted of transplanting human internal, saphenous vein

segments, and segments of the aorta of *Gallus gallus domesticus*, previously freeze-dried, into the femoral artery of dogs. The pre transplant histological study demonstrated that hydration after freeze-drying, returned the segments used in the transplant to their normal aspect. The study revealed that the segments showed no immunological reaction, whether to the human saphenous vein or to the aorta of *Gallus gallus domesticus*. The study confirms that freeze-drying allows the performance of transplants without rejection, once it removes the antigenicity from the transplanted.

REFERÊNCIAS

1. Greaves, R. I. N. - Fundamental aspects of freeze-drying bacteria and living-cells. In: Rey, L. - Aspects Théoriques et Industriels de la lyophilisation. Paris, Hermann, 1964. p. 407.
2. Mugleton, P. W. - The freeze-drying of BCG. In: Rey, L. - Aspects Théoriques et Industriels de la Lyophilisation. Paris, Hermann, 1964. p. 411.
3. Greiff, D. - The effects on the activities of viruses. In: Rey, L. - Aspects Théoriques et Industriels de la Lyophilisation. Paris, Hermann, 1964. p. 369.
4. Harris, R. H. - A new apparatus for freeze-drying whole biological specimens. *Med. Biol.* 3: 180, 1968.
5. Mugleton, P. W. - The preservation of cultures. *Progr. Ind. Microbiol.* 4: 191, 1963.
6. Fry, R. M. - The preservation of bacteria. Biological applications of freeze-drying. Harris, R. J. C. (ed). New York, 1964. p. 125.
7. Heckly, R. Y. - Preservation of bacteria by lyophilisation. *Advanc. Applied Microbiol.* 3: 1, 1961.
8. Rosemberg, G. I. - Freeze-drying of blood derivates. In: Rey, L. - Aspects Théoriques et Industriels de la Lyophilisation. Paris, Hermann, 1964. p. 335.
9. Samuel, C. T. - Progress of blood freeze-drying in the U.S.A. In: Rey, L. - Aspects Théoriques et Industriels de la Lyophilisation. Paris, Hermann, 1964. p. 581.
10. Razaboni, R. M. D.; Percival, S.; Benedict, W. - Preservation of tissue for transplantation and replantation clinics. *Pleat. Reconstr. Surg.* 10: 211, 1983.
11. Andrew, C. L.; Bassett, L. D. - A survey of the current status of tissue procurement, processing and use. In: Rey, L. - Aspects Théoriques et Industriels de la Lyophilisation. Paris, Hermann, 1964. p. 431.
12. Captain Freuz, F. P.; Gilbert, W.; Osborn, F. G.; Moritz, C. - The preservation and clinical use of freeze-drying bone. *J. Bone joint Surg.* 33A: 863, 1961.
13. Pritmann, W. - Some observations on the main ATPase system of muscle impaired by freeze bum freeze-drying. *Fed. Res. Centre Criobiol.* 3: 73, 1972.
14. Ginsburg, A. S. - Freeze-drying effect on quality of foodstuffs and biological materials. *Moscou Criobiol.* 3: 68, 1972.
15. Basset, C. A. L. - issue bank aspects. In: Rey, L. - Aspects Théoriques et Industriels de la Lyophilisation. Paris, Hermann, 1964. p. 431.
16. Kaplan, M. - Immunologic studies of heart tissue. *J. Immunol.* 88: 450, 1962.
17. Lawry, O. H. - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1: 265, 1938.