

BIOPRÓTESE TRAQUEAL: CONTROLE BIOFÍSICO E MICROBIOLÓGICO IN VITRO

TRACHEAL BIOPROSTHESIS: BIOPHYSICAL AND MICROBIOLOGICAL CONTROL IN VITRO

Marcelo Alves Pinto* Ghendy Cardoso** Renato Sérgio Marchevisk***
José Mario Doley Soares**** Adjetton Soares e Silva*****

RESUMO

No estudo para substitutos para segmentos extensos de traquéia canina, foram implantados heterotopicamente, biopróteses traqueais homólogas em 18 cães, sem raça definida, pesando entre 15 e 22kg, machos e fêmeas clinicamente saudáveis. Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo I - nove cães com biopróteses implantadas em retalho muscular (Platisma). Grupo II - nove cães com bioprótese implantadas em retalho de grande omento. A avaliação macro e microscópica demonstrou a presença do processo de incorporação a partir do quadragésimo quinto dia nos dois grupos, acrescentando que o processo inflamatório apresentava-se mais organizado no segundo grupo sem a exuberância do tecido de granulação encontrado no primeiro grupo. Dentro do controle de qualidade das biopróteses, foi adicionado a este trabalho análises comparativas in vitro (biofísicas e microbiológicas) onde foi comprovado que a bioprótese traqueal suína apresentava-se estruturalmente como a mais indicada para a reconstrução traqueal em pequenos animais.

Palavras-chave: bioprótese traqueal, reconstrução traqueal, traquéia canina, controle de qualidade em bioprótese traqueal.

SUMMARY

In the study of extensive canine tracheal replacement, heterotopic homologous bioprosthesis were implanted in eighteen healthy mongrel dogs, of both sexes, weighing between 15 - 22kg. These animals were divided into two groups: group I - nine dogs with bioprosthesis envelopment in a muscular flap (platisma);

group II - nine dogs with bioprosthesis envelopment in an omental flap (large omentum). The gross and microscopic evaluation showed the incorporation of the flap in both groups. However after the 45th day, the inflammatory process in the second group was the most organized and without excessive proliferative granulation tissue. In the comparison control quality of the bioprosthesis in vitro (biophysical and microbiological) was proved that tracheal swine segment was the most indicated for small animal tracheal reconstruction.

Key words: tracheal bioprosthesis, tracheal reconstruction, canine trachea, control quality in tracheal bioprosthesis.

INTRODUÇÃO

O emprego do tecido traqueal preservado, na substituição de segmentos traqueais, necessita de avaliações quanto à resposta do hospedeiro à bioprótese, para certificar da sua durabilidade após a implantação. A correção cirúrgica de extensos defeitos circunferenciais da traquéia, requer um tipo de material que se assemelhe ao máximo ao órgão in vivo. KORN (1972) descreveu que as reações proteína-glutaraldeído envolvem principalmente os aminoácidos lisina e hidroxilisina na proporção de quatro moles de glutaraldeído para um de lisina. A I.M.C. - Biomédica^a vem desenvolvendo pesquisas desde 1974 em material biológico preservado pelo glutaraldeído (pericárdio bovino, cordão umbilical humano, artéria torácica interna bovina, esôfago e traquéia suína e canina) e descreve a eficaz ligação entre o glutaraldeído e a proteína para formação de proteínas conjugadas, ligação de enzimas intramoleculares e enzimas da matriz celular.

KAISER et al (1979) citaram a implantação do

* Médico Veterinário, Bolsa de Recém Mestre da FAPERGS.

** Médico Veterinário, Prof. Titular do Departamento de Clínica de Pequenos Animais do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). 97.119-900 - Santa Maria, RS.

*** Médico Veterinário, Patologista do Departamento de Neurovirulência, Biomanguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.

**** Professor Assistente do Departamento de Transportes da Escola de Engenharia da UFSM.

***** Médico, Chefe do Setor de Cirurgia Experimental de H.C.Ex., Rio de Janeiro, RJ.

epitélio respiratório e a cicatrização, quando implantaram homoenxertos traqueais preservados pela liofilização em cães. HEBERHOLD et al (1980) demonstraram o processo de incorporação, quando repararam defeitos em "janela" da parede traqueal de coelhos com tecido homólogo preservado em merthiolate branco. ILBERG (1982) observou a incorporação de fibroblastos e neocapilares à homoenxertos traqueais preservados (formol-cialit) e implantaram no tecido subcutâneo.

LIMA et al (1982) relataram o desenvolvimento de neoformação capilar em sítios anastomóticos bronquiais. STRNAD (1981) descreveram a incorporação e intensa fibroplasia em próteses sintéticas de traquéia (Methylene acrilate com suporte de hydrogel). WHITED (1984) relatou a deposição fibrosa em retalhos musculares empregados para reconstrução traqueal em humanos.

BALDERMAN & WEINBLATT (1987) citaram que o grande omento não vasculariza autoenxertos traqueais de modo a manter um epitélio respiratório viável. MOR-YAMA et al (1989) confirmaram estes resultados utilizando a omentopexia em homoenxertos traqueais no cão. DESCHAMPS et al (1989) trabalhando com autoenxertos traqueais criopreservados, envelopados no músculo reto abdominal de cães, observaram a cartilagem com áreas isquêmicas e um epitélio pseudo-estratificado muco produto intacto.

MACK et al (1989) observaram a endotelização e a presença de processo inflamatório em diversos graus, associado à fibrose e a penetração de neocapilares, quando corrigiram defeitos ventriculares em suínos usando enxertos de pericárdio bovino fixado em glutaraldeído. EAGAR et al (1986) descreveram o glutaraldeído como uma molécula bipolar, onde cada extremidade da cadeia reage com um grupo amino protéico diferente, formando reticulados de proteína. Salientaram que esta propriedade é mais eficaz em pH 9.0 quando proteínas da parede celular se apresentavam na forma livre. HEY et al (1990) acrescentaram que os reticulados (cross-linking) produzem um forte e rígido material biológico, mas reduz a elasticidade do mesmo e a sua antigenicidade. CHAVAUD et al (1991) consideraram que na reparação de lesões orovalvulares, o pericárdio autólogo preservado em glutaraldeído possui propriedades superiores a do pericárdio heterólogo. Acrescentaram em trabalhos experimentais com autoenxertos pericárdicos na aorta de cães, a ausência de calcificações e a manutenção da integridade das células mesoteliais.

O trabalho tem por objetivo pesquisar as alterações teciduais provocadas pela implantação de bioprótese homóloga em retalho do músculo Platisma e no grande omento, atentando para a possibilidade. Acrescentou-se ao trabalho estudo sobre o controle de qualidade dos bioimplantes, onde comparou-se *in vitro* sua resistência às tensões verticais e a esterilidade, em traquéias preservadas de três espécies diferentes: canina,

suína e humana (todas citadas com freqüência pela literatura como implantes), na eleição de uma bioprótese estruturalmente ideal para reconstrução traqueal canina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 18 cães sem raça definida, provenientes do Biotério Central da UFSM, pesando entre 12 e 22kg, machos e fêmeas de 2 a 8 anos de idade. Os cães clinicamente sadios, foram pré-anestesiados com maleato de acepromazina^b a 0,2% via I.V. (0,1mg/kg de peso) e então induzidos e mantidos em plano anestésico com thiopental sódico^c a 2,5% (12,5mg/kg de peso). Os animais assim anestesiados foram divididos aleatoriamente em dois grupos.

Grupo I - Implantes de bioprótese traqueal preservada em glutaraldeído tamponado^d a 2,5% no músculo cutâneo cervical. Após tricotomia e antissepsia da porção cervical ventral do pescoço, os animais foram submetidos à cervicotomia ventral mediana com exposição de fina lâmina superficial do músculo platisma. Dissecou-se suas porções cutâneas e musculares, mantendo sua irrigação e formando um retalho muscular. A implantação da bioprótese ocorreu através do envelopamento com o retalho muscular (segmento de bioprótese de tamanho correspondente a 1/3 do comprimento da traquéia do cão receptor) e com auxílio de alguns pontos de simples com polipropileno 4-0^e. A pele foi fechada em pontos Donatti com nylon monofilamentoso 3-0^f, mantendo-se uma cânula de drenagem cranialmente à entrada do tórax para evitar o acúmulo seroso local.

Grupo II - Implantes de bioprótese no grande omento. Após tricotomia e antissepsia da região epigástrica, foram submetidos à laparotomia mediana pré-umbilical, quando o grande omento foi identificado e tracionado da cavidade abdominal. Este envelopou em sua porção mais distal um segmento de bioprótese homóloga (1/3 do comprimento total da traquéia do receptor) empregando alguns pontos simples de polipropileno 4-0. Para o fechamento da aponeurose e pele empregou-se nylon monofilamento 3-0 em pontos simples isolados.

Os dois grupos foram submetidos ao mesmo tipo de avaliação: macroscopia e microscopia óptica no trigésimo, quadragésimo quinto e sexagésimo dia do pós-operatório. Durante a macroscopia procurou-se observar a existência de sinéquias e aderências entre os dois tipos de retalho e a bioprótese, evidenciando-se áreas de sangramento à tentativa de secção transversal do implante. Para a microscopia óptica, desenvolvida no setor de neurovirulência da Fundação Oswaldo Cruz, empregou-se segmentos coletados de biopróteses e retalhos (platisma, grande omento), que foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 a 48 horas. Após este período os fragmentos foram recortados, lavados em

água corrente, corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (LUNA, 1968) e examinados ao microscópio óptico.

Posteriormente as lâminas selecionadas foram coradas pela técnica de Masson (LUNA, 1968) para identificação do tecido conjuntivo e pelo Giemsa (LUNA, 1968) para células inflamatórias.

A análise biofísica das biopróteses foi realizado no Laboratório de Construção Civil da Faculdade de Engenharia Civil da UFSM. Foram avaliados segmentos de bioprótese com 6cm de comprimento originado de três espécies diferentes (canina, suína, humana) sendo submetidas às tensões verticais progressivas, através do equipamento de tração contínua, constituído por duas garras, superior e inferior para fixação do segmento traqueal a ser testado, acoplado a um suporte de carga de precisão de 1.000g em peso anelar, registrando as deformações sofridas pelo segmento traqueal. O parâmetro para colocação dos pesos foi o de estabilização da deformação sofrida, o que em média correspondia a 30 minutos entre cada leitura. O número máximo de pesos colocados (tensão máxima à ruptura) foi relacionada com o grau de distensão de cada tipo de segmento traqueal, flexibilidade e elasticidade. O número de segmentos testados foi quatro para cada espécie e o tempo de preservação foi de uma semana a seis meses.

O controle microbiológico das biopróteses, foi desenvolvido no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFSM., onde as amostras foram semeadas em caldo simples (BIER, 1984) e meio líquido de tioglicolato de sódio⁹ e incubados em estufa bacteriológica à 37°C durante 10 dias. Neste período os tubos semeados foram examinados diariamente para evidenciação de crescimento bacteriano.

O controle da contaminação fúngica obedeceu o mesmo protocolo de colheita das amostras e os pequenos fragmentos foram semeados em ágar Sabouraud^h e em meio seletivo micobiótico^d com observações diárias por um período de 15 dias após a semeadura.

RESULTADOS

Macroscopia

Macroscopicamente as biopróteses, antes da implantação, demonstravam consistência "emborrachada" e flexibilidade. Microscopicamente observou-se a manutenção de todas as estruturas componentes da traquéia. O controle microbiológico comprovou *in vitro* o não crescimento bacteriano ou fúngico no final de 15 dias de incubação.

Ao exame macroscópico evidenciou-se, aos 30 dias, uma espessa deposição colagênica e a presença de tecido de aspecto granuloso ao redor da prótese no primeiro grupo. No segundo grupo o retalho de grande

omento demonstrou diminuição do seu conteúdo gorduroso habitual, tornado-se mais espessado e aderente à bioprótese (Tabela 1). Ao seccionamento transversal evidenciou-se nos grupos I e II pequenos focos de tecido colagênico, depositado sobre o implante no quadragésimo quinto dia em diante. Nesta fase observou-se através da secção a presença do tecido de granulação invadindo a luz do implante; em todos os implantes notou-se um acúmulo sero-fibrinoso no seu interior. O sexagésimo dia caracterizou-se nos dois grupos pelo desgaste da superfície externa da bioprótese, contudo estas guardavam sua forma e integridade estrutural primitiva. Foi observado nesta fase densa formação de aspecto colagênico envolvendo as próteses, sendo mais desorganizada e exuberante no primeiro grupo. A secção transversal diagnosticou-se pequenos focos de sangramento, sendo mais discretos no segundo grupo.

Microscopia Óptica

A microscopia óptica do primeiro grupo aos 30 dias, demonstrou grande perda epitelial da bioprótese, com dissolução das células glandulares. O músculo platisma apresentava processo inflamatório crônico na região de contato com a adventícia da prótese, se organizando em tecido de granulação. Aos 45 dias observou-se a presença de exsudato fibrinoso na mucosa da bioprótese e marcante fibrose substituindo o tecido de gra-

TABELA 1 - Bioprótese traqueal. Alterações macro e microscópicas nos cães com implantes ectópicos.

Alterações	Tempo de implantação (dias)		
	30	45	60
MACROSCÓPICAS			
-Túnica fibrosa	+(A)	++	+++
-Incorporação	-(B)	+	+
-Exsudato luminal	+	+	+
-Sangramento	-	+	+
-Sinéquias	+	+++	+++
MICROSCÓPICAS			
-Descamação epitelial	+	++	+++
-Infiltração inflamatória no retalho muscular	A/C(C)	C	-
-Tecido de granulação	+	+	+
-Fibrose	++	+++	+++

(A) - + ou leve, ++ ou moderado, +++ ou acentuado

(B) - - ou ausente, + ou presente

(C) - A ou agudo, C ou crônico

nulação. Nas áreas mais afastadas da região de contato bioprótese-retalho muscular detectou-se a degeneração da musculatura esquelética com deposição de tecido colagênico. Ao sexagésimo dia observou-se intensa fibrose, depositando-se sobre a adventícia da prótese. A musculatura demonstrava-se intensamente colagenizada, restando ainda pequenos focos do músculo esquelético degenerado.

No segundo grupo, aos 30 dias, diagnosticou-se, pela microscopia, a presença de tecido de granulação associado a focos de processo inflamatório crônico granulomatoso na região de contato grande omento-prótese biológica. Aos 45 dias esta região encontrava-se fibrosada enquanto a adventícia permitia a penetração de pequenos capilares neoformados. Em todo o retalho de grande omento presenciou-se um processo inflamatório crônico. No sexagésimo dia era completa a fibrose no retalho junto à prótese. Esta demonstrava intenso desgaste, com desnudamento epitelial associado à deposição de exsudato fibrinoso. A adventícia com pequenos capilares neoformados, mostrava-se intensamente fibrosada (Tabela 2).

Comportamento biofísico dos implantes

Bioprótese de material suíno: resistiu a tensão

TABELA 2 - Bioprótese traqueal. Alterações macro e microscópicas nos cães com implantes ectópicos.

Alterações	Tempo de implantação (dias)		
	30	45	60
MACROSCÓPICAS			
-Túnica fibrosa	+(x)	++	++
-Incorporação	+(y)	+	+
-Exsudato luminal	+	+	+
-Sangramento	-	+	+
-Sinéquias	+	++	+++
MICROSCÓPICAS			
-Descamação epitelial	+	+	+++
-Infiltração inflamatória no retalho do grande omento	c(z)	c	-
-Tecido de granulação	+	+	-
-Fibrose	+	++	++

(x) + ou leve, ++ ou moderado, +++ ou acentuado
 (y) - ou ausente, + ou presente
 (z) - ou ausente, c ou crônico

média à ruptura de 132,5N, com coeficiente de variação de 3,8% (excelente precisão). A deformação específica média à ruptura foi de 0,49cm/cm, com coeficiente de variação de 10,2% considerado de boa precisão (Figura 1 e Tabela 3).

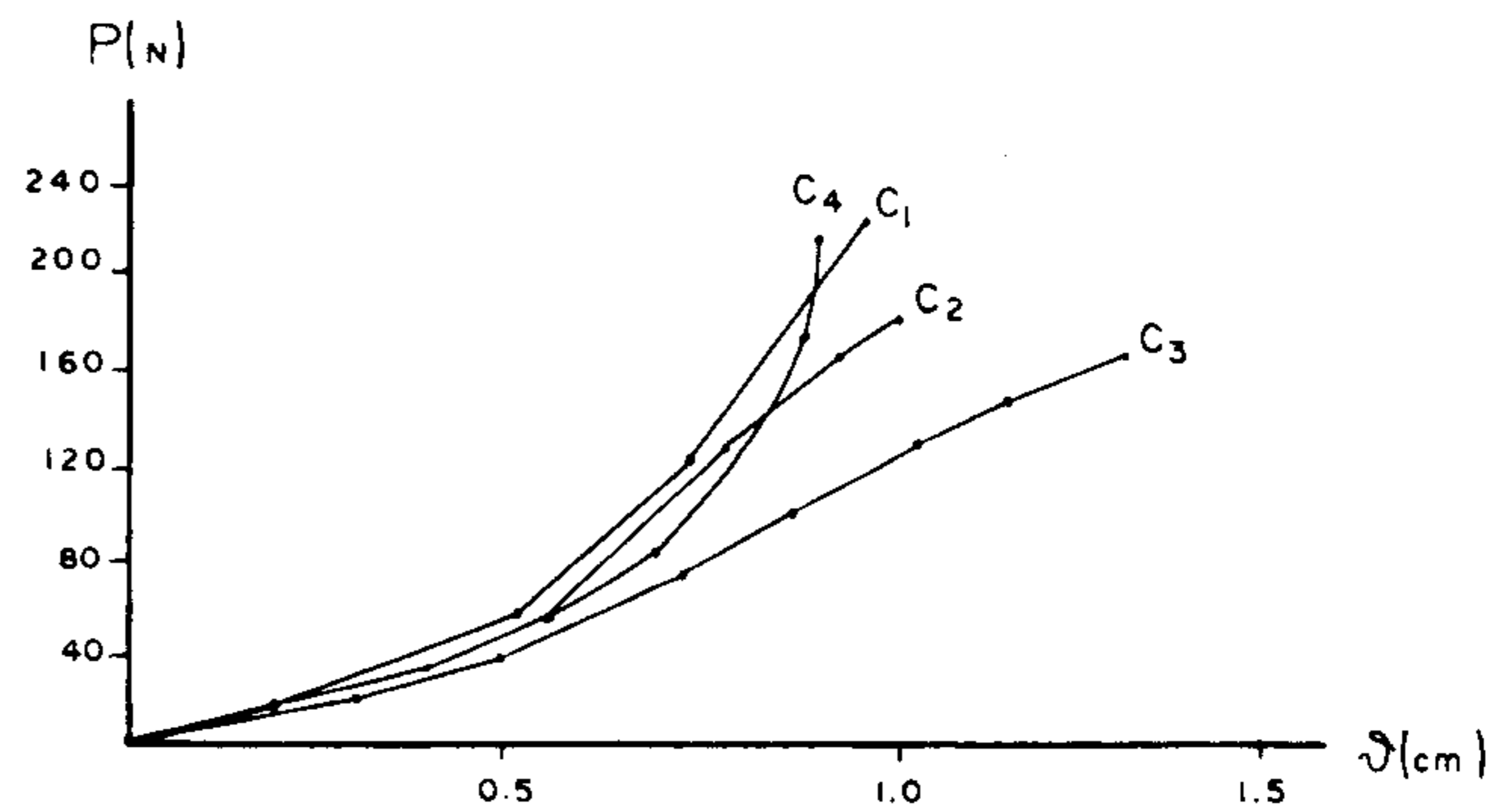


FIGURA 1 - Bioprótese traqueal canina. Deformações (d) ocorridas durante a adição de pesos (N) verticais a cada 30 minutos.

TABELA 3 - Bioprótese traqueal suína. Análise biofísica.

Medidas	Amostras			
	S1	S2	S3	S4
Peso à ruptura (N)	130,00	140,00	130,00	140,00
Comprimento inicial(cm)	3,75	3,24	3,33	3,70
Diâmetro externo(cm)	1,90	2,16	1,84	2,40
Espessura(cm)	1,66	1,83	1,59	1,75
Deformação à ruptura (cm)	1,50	2,00	1,80	1,40
Deformação máxima à ruptura(cm)	0,44	0,56	0,47	0,47

Bioprótese de material canino: a tensão média à ruptura foi de 190N com coeficiente de variação de 9,61% (boa precisão) (Figura 2 e Tabela 4). A deformação específica média à ruptura foi de 0,41cm/cm com coeficiente de variação de 10,73% (boa precisão).

Bioprótese traqueal humana: a tensão média à ruptura foi de 215N com coeficiente de variação de 19,4% (precisão razoável) devido a variações dimensionais das biopróteses. A deformação média à ruptura foi de 0,51cm/cm com coeficiente de variação de 13,7% (boa precisão) (Figura 3 e Tabela 5).

DISCUSSÃO

O processo de incorporação observado quando se implanta tecidos de origem sintética ou biológica, em

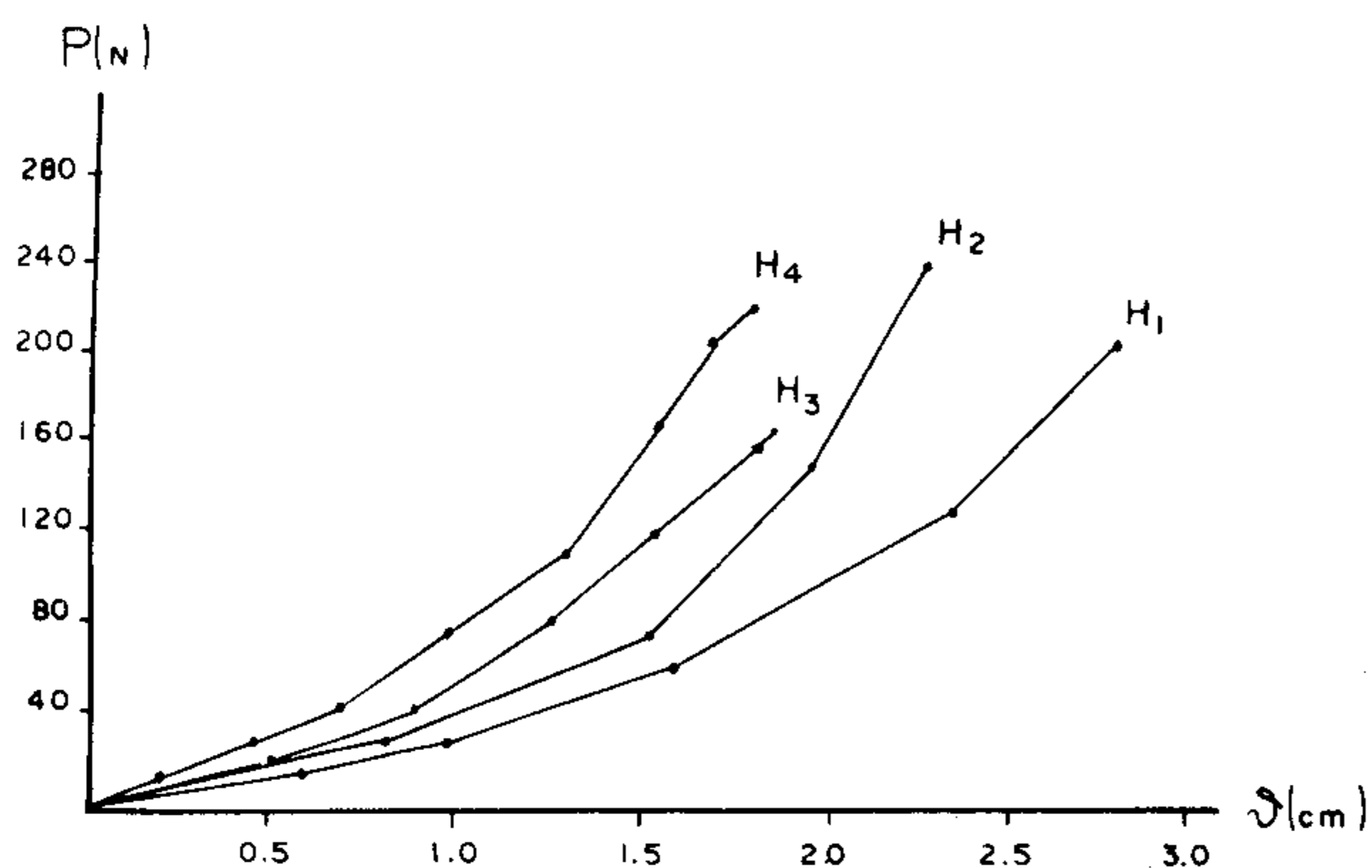


FIGURA 2 - Bioprótese traqueal humana. Deformações (d) ocorridas durante a adição de pesos (N) verticais a cada 30 minutos.

TABELA 4 - Bioprótese traqueal canina. Análise biofísica.

Medidas	Amostras			
	C1	C2	C3	C4
Peso à ruptura (N)	200,00	180,00	170,00	210,00
Comprimento inicial(cm)	2,00	2,20	3,30	2,00
Diâmetro externo(cm)	1,60	1,20	2,29	1,80
Espessura(cm)	0,11	0,12	0,13	0,12
Deformação à ruptura (cm)	0,90	0,97	1,25	0,91
Deformação máxima à ruptura(cm)	0,45	0,37	0,38	2,15

retalhos de músculo ou grande omento, ficou bem caracterizado. Observou-se através da macroscopia a presença de pequenos sangramentos na superfície externa da bioprótese, como também pela microscopia óptica, quando penetraram fibroblastos e células endoteliais, através da adventícia dos implantes no quadragésimo quinto dia, em ambos os grupos. Notou-se uma maior organização do tecido de granulação nos implantes de retalho muscular. HEBERHOLD et al (1980), STRNAD (1981) e ILBERG (1982) descreveram este processo de incorporação na correção de defeitos traqueais. LIMA et al (1982) assinalaram a capacidade do grande omento em vascularizar segmentos bronqueais, facilitando sua cicatrização quando anastomosados. BEALDERMAN & WEINDELATT (1987) e MORYAMA et al (1989) discordaram afirmando que o suporte vascular oferecido pelo retalho não é suficiente para manter a viabilidade da cartilagem e do epitélio respiratório em enxertos traqueais não preservados. DESCHAMPS et al (1989) demonstra-

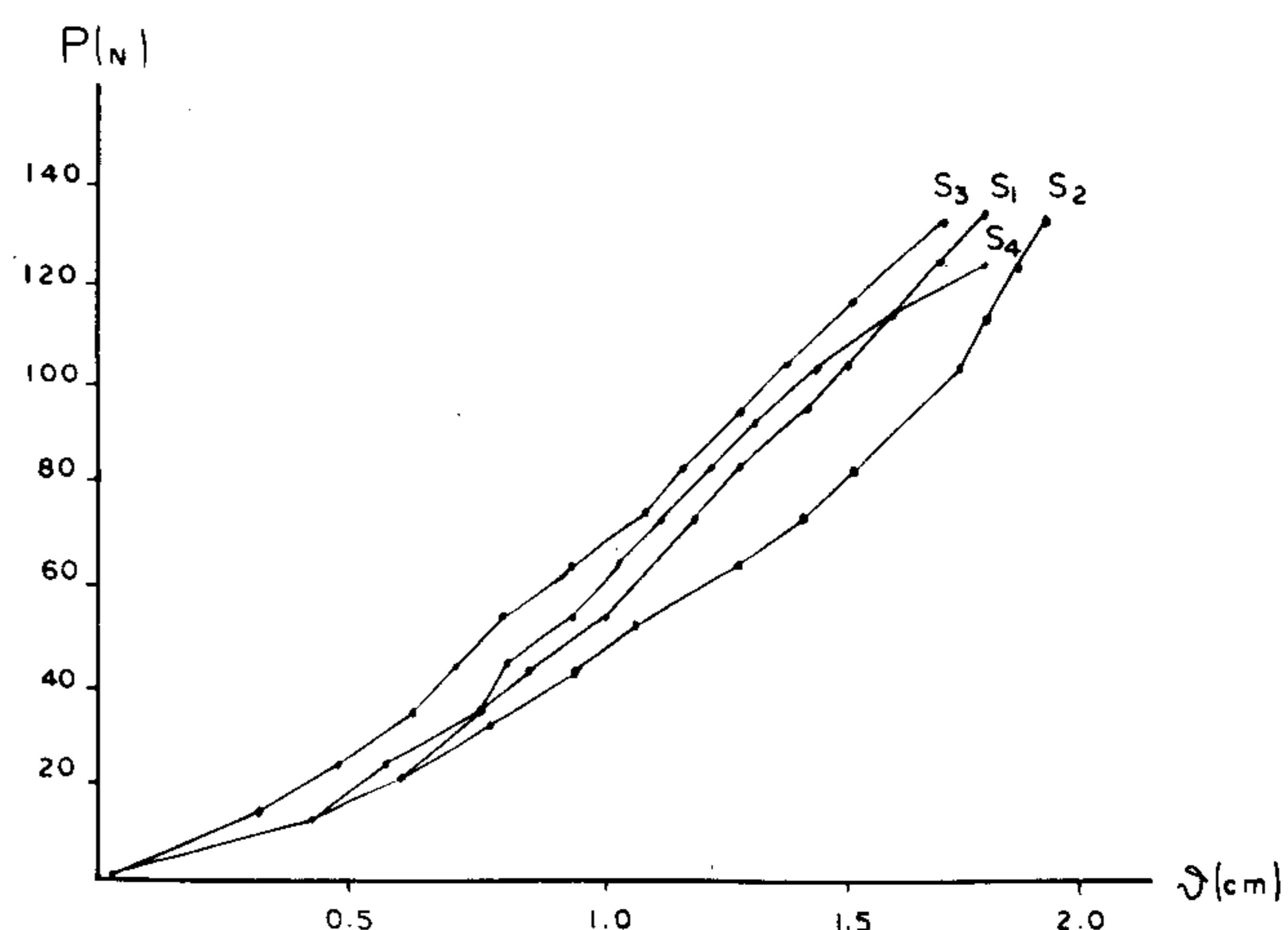


FIGURA 3 - Bioprótese traqueal suína. Deformações (d) ocorridas durante a adição de pesos (N) verticais a cada 30 minutos.

TABELA 5 - Bioprótese traqueal humana. Análise biofísica.

Medidas	Amostras			
	H1	H2	H3	H4
Peso à ruptura (N)	210,00	260,00	160,00	230,00
Comprimento inicial(cm)	4,85	5,25	4,21	3,2
Diâmetro externo(cm)	2,24	2,20	1,90	2,06
Espessura(cm)	0,36	0,21	0,30	0,27
Deformação à ruptura (cm)	2,76	2,31	1,96	1,80
Deformação máxima à ruptura(cm)	0,57	0,44	0,47	0,56

ram a manutenção deste epitélio em enxertos traqueais criopreservados e vascularizados por retalho vascular.

A angiogênese observada nos implantes envelopados pelo platisma e grande omento tem como origem o processo inflamatório crônico encontrado. MATHISEN et al (1988) acrescentaram que o omento representa uma fonte de suprimento vascular e fibroblastos, associado ao fator angiogênico existente em sua gordura.

O glutaraldeído tamponado a 2,5% proporcionou a manutenção da estrutura do implante, flexibilidade e rigidez também descrito por FAHIMI & DROCHANS (1965) e MACK et al (1990) em implantes de pericárdio bovino preservado em glutaraldeído. O comportamento bioquímico do preservante sobre o tecido traqueal, aumentando a sua resistência, foi descrito por EAGAR et al (1986) e HEY et al (1990) onde destacaram o "cross-linking" como o principal mecanismo responsável pelo

fenômeno de resistência à fadiga e durabilidade observado em próteses valvulares cardíacas de pericárdio bovino. A esterilidade comprovada *in vitro* neste experimento, segundo KORN (1972), tem como origem não só o mecanismo de reticulação do glutaraldeído, mas também pela facilidade com que os radicais amino da parede celular bacteriana se expõem em pH alcalino à ação do preservante.

CONCLUSÕES

O glutaraldeído tamponado à 2,5% manteve a esterilidade das amostras durante o período de preservação.

A bioprótese quando implantada ectopicamente provoca intensa reação inflamatória sendo mais intensa nos implantes preservados em glutaraldeído tamponado a 2,5%, no músculo cutâneo cervical.

A colagenização dos implantes ocorria em decorrência da fibrose contínua, substituindo o tecido de granulação nos retalhos.

Os implantes apesar do desgaste, mantiveram a estrutura primitiva no final de 60 dias da implantação.

No teste de resistência à ruptura, a traquéia humana apresenta a maior resistência a tensões verticais, seguida pela canina e por último a suína.

Melhores resultados em termos de morfologia, resistência e elasticidade, foram obtidos com traquéias de suínos (coeficiente de variação de 3,8%) conforme pode ser visualizado pela proximidade das curvas e os mais dispersos, obtidos com a traquéia humana e canina.

A descontinuidade nos pontos das curvas, deve-se ao dispositivo de ensaio e possíveis rupturas parciais das fibras reticuladas pelo glutaraldeído, além das diferenças estruturais dentro de cada espécie.

A traquéia suína foi a mais homogênea em termos de estrutura e resistência.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- a - I.N.C. - Biomédica Ltda. São José do Rio Preto, SP.
- b - ACEPRAN 0,2% - Laboratório Andrômato Divisão Agrícola e Veterinária, São Paulo, SP.
- c - THIONEMBUTAL - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda. São Paulo, SP.
- d - GLUTARALDEHYD 25%. Solution in water - riedl - dehagn. Seelze, Hannover.
- e - PROLENE CARDIOVASCULAR 4-0 - Johnson & Johnson S.A. São José dos Campos, SP.
- f - MONONYLON CUTICULAR 3-0 - Ethicon Johnson & Johnson S.A. Produtos Profissionais, São José dos Campos, SP.

- g - TIOGLICOLATO DE SÓDIO - Biobrás, Bioquímica do Brasil S.A. Minas Gerais.
- h - ÁGAR SABOURAUD - Biobrás, Bioquímica do Brasil S.A. Minas Gerais.
- i - MEIO SELETIVO MICROBIÓTICO - Biobrás, Bioquímica do Brasil S.A. Minas Gerais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDERMAN, S.C., WEINBLATT, G. Tracheal autograft revascularization. *Journal Cardiovasc Surgery*, v. 94, n. 3, p. 434-441, 1987.
- BIER, O. Microbiologia e imunologia. 3 ed., São Paulo: Melhoramentos. 1984. 1134 p.
- CHAUVAUD, S., JEBARA, V., CHACHQUES, J.C., et al. Valve extension with glutaraldehyde-preserved autologous pericardium. *Journal Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 102, n. 2, p. 171-178, 1991.
- DESCHAMPS, C., TRASTEK, V.F., FERGUNSON, J.L., et al. Cryopreservation of canine trachea: functional and histological changes. *Ann Thoracic Surgery*, v. 47, p. 208-211, 1989.
- EAGAR, R.G., LEDER, J., THEIS, A.B. Fatores importantes para eficácia microbicida. In: CONGRESSO SOBRE PROGRESSO NA DESINFECÇÃO QUÍMICA. 1986. Binghamton, N.Y. *Proceeding..* Union Carbide Corporation, 8 p., p. 3-5.
- FAHIMI, H.D., DROCHMANS, P. Essais de standardisation de la fixation au glutaraldehyde. *Journal de Microscopie* v. 4, p. 725-752, 1965.
- HEERHOLD, C., FRANZ, B., BREIPOHL, W. Trachealchirurgie. *Laryngologie, Rhindyc, Otologie*, v. 59, n. 8, p. 453-457, 1980.
- HEY, K.B., LACHS, C.M., RAXWORTHY, M.J., et al. Crosslinked fibrous collagen for use as a dermal implant: control of the cytotoxic effects of glutaldehyde and dimethylsubenimidate. *Biotechnology and applied. Biochemistry*, v. 12, June, p. 85-93, 1990.
- ILBERG, V.C. Reconstruction chirurgicale de la trachée par homogreffe de trachée conservés dans du cialit. *Ann Oto-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-Faciale* v. 99, n. 10/11, p. 505-508, 1982.
- KAISER, D., VATERRODT, D., TROTSCHLER, H., et al. Lyophilisierte trachea in tierversuch. *Praxis und Klinik der Pneumologie*, v. 33, Set., p. 962-968, 1979.
- KORN, A. H. Glutaraldehyde: nature of the reagent. *Journal of Molecular Biology*, v. 65, n. 3, p. 525-529, 1972.
- LIMA, O., GOLDEMBERG, M., MORGAN, E., et al. Bronchial omentopexy in canine lung transplantation. *Journal of Cardiovascular Surgery*, v. 83, n. 3, p. 418-421, 1982.

- LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**, NY.: U.S. ARM, 1968. 238p.
- MACK, J.W., LTCOL, Jr, USAF, M.C., et al. Glutaraldehyde-fixed bovine pericardium for right ventricular outflow enlargement. **Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 30, n. 5, p. 774-778, 1989.
- MORYAMA, S., SHIMIZU, N., TERAMOTO, S. Experimental tracheal allotransplantation using omentopexy. **Transplantation Proceedings**, v. 21, n. 1, p. 2596-2600, 1989.
- MATHISEN, D.J., GRILLO, H.C., VLAHAKES, G.J., et al. The omentum in management of complicated cardiothoracic problems. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 95, p. 677-684, 1988.
- STRNAD, J. Experimental substitution of a tracheal segment by a prosthesis. **Rozhledy y Chirurgii**, v. 60, n. 3, p. 200-204, 1981.
- WHITED, R.E. Experimental and clinical reconstructive surgery of the larynx and trachea. **Arch Otolaryngologia** v. 110, May, p. 315-317, 1984.
- UNION CARBIDE CORPORATION. **Glutaraldehyde (pentanedial)**. Union Carbide Corporation. Chemicals and plastics, 270 - Park Avenue, New York, N.Y., 10017.