

Análise da rejeição do transplante de aponeurose em coelhos

Analysis of transplant rejection in rabbits aponeurosis

Andre Ibrahim David¹, Eduardo Sauerbronn Gouvea², Felipe Ribeiro Batista², Paulo Henrique Fogaça de Barros², Dino Martini Filho², Victor Arias³, Paulo Roberto Corsi², Luiz Arnaldo Szutan²

RESUMO

Objetivo: Estudar a viabilidade de aponeurose heteróloga para fechar parede abdominal de coelhos, com ênfase no processo de rejeição. **Métodos:** Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Cuidados Animais da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e realizado na Unidade Técnica e Cirurgia Experimental. Quatro coelhas vermelhas trocaram aponeurose da parede abdominal com outros quatro animais machos brancos. Em dois coelhos, foi retirada e substituída a aponeurose como controle do processo cicatricial. Eles foram avaliados 1 vez por dia e sacrificados após 7 dias. Foi realizada a imunoistoquímica com CD20 e CD79. **Resultados:** Os animais não tiveram celulite, abscesso, hematoma, deiscência da ferida ou hérnia. O local do enxerto mostrou hiperemia intensa. A análise histológica mostrou um processo inflamatório, com a presença de miofibroblastos em amadurecimento e colágeno, que variou de incipiente a moderado. O número de vasos estava reduzido e as células inflamatórias foram, em sua maioria, células plasmáticas e macrófagos. Não havia sinais morfológicos da rejeição aguda com a agressão do endotélio vascular. O músculo adjacente mostrou sinais de degeneração, com reação inflamatória dos núcleos e condensação do citoplasma. A análise imunoistoquímica (CD20 e CD79) mostrou que o processo inflamatório não foi mediado por linfócitos. O teste não paramétrico de Mann-Whitney mostrou que não se pode rejeitar a hipótese de igualdade ($p > 0,05$). **Conclusão:** Não houve complicações pós-operatórias (fistulas, deiscência etc.) e a análise histológica revelou processo inflamatório inespecífico. A análise imunoistoquímica mostrou que o processo inflamatório não foi em razão de uma possível rejeição.

Descritores: Rejeição de enxerto; Antígenos CD20; Transplante; Parede abdominal/cirurgia; Coelhos

ABSTRACT

Objective: To study the feasibility of heterologous aponeurosis to close the abdominal wall of rabbits emphasizing the rejection process. **Methods:** This project was approved by the Animals Care Committee of the Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, and it was carried out at the Experimental Surgery and Technical Unit. Four red female rabbits exchanged abdominal wall aponeurosis with other four white male animals. Two rabbits just had it removed and replaced to be the control group for the healing process. Animals were evaluated once a day, and after 7 days they were sacrificed. Immunohistochemical analysis with CD20 and CD79 was done. **Results:** The animals did not have cellulitis, abscess, hematoma, wound dehiscence or herniation. The graft site showed intense hyperemia. The histological analysis showed an inflammatory process with maturing myofibroblasts and collagen ranging from incipient to moderate. The number of vessels was reduced and the inflammatory cells were most plasma cells and macrophages. There were no morphological signs of acute rejection with aggressive vascular endothelial damage. The adjacent muscle showed signs of degeneration with inflammatory centralization of nuclei and cytoplasmic condensation. The immunohistochemical analysis (CD20 and CD79) showed that the inflammatory process was not mediated by lymphocytes. Mann-Whitney nonparametric test showed that the hypothesis of equality ($p > 0.05$) should not be discarded. **Conclusion:** There were no postoperative complications (fistulas, dehiscence etc.) and the histological analysis showed nonspecific inflammatory process. The immunohistochemical analysis showed that the inflammatory process was not due to a possible rejection.

Keywords: Graft rejection; Antigens, CD20; Transplantation; Abdominal wall/surgery; Rabbits

Trabalho realizado na Unidade Técnica e Cirurgia Experimental, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – FCMSCSP, São Paulo (SP), Brasil.

¹ Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brasil.

² Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – SCMSP, São Paulo (SP), Brasil.

³ LIM 26, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Andre Ibrahim David – Avenida Albert Einstein, 627 – Consultório 208A – Bloco A1 – Morumbi – CEP: 05651-901 – São Paulo (SP), Brasil – Tel.: (11) 2151-3388 – E-mail: andreidavid@einstein.br

Data de submissão: 11/8/2011 – Data de aceite: 31/5/2012

Conflitos de interesse: não há.

INTRODUÇÃO

A perda da integridade da parede abdominal pode ocorrer devido a trauma, infecção, herniação ou ressecção cirúrgica⁽¹⁾. Lidar com esses defeitos da parede abdominal tem o objetivo de alcançar a recuperação funcional e estética dos órgãos e tecidos afetados^(2,3).

Em alguns casos, como, por exemplo, no transplante multivisceral e intestinal, o fechamento da parede abdominal é o principal desafio técnico. Em aproximadamente 20% dos casos não há tecido suficiente para o fechamento primário da parede⁽⁴⁾. A falha de uma reparação primária, após o transplante, deixa uma ferida que necessitará de nova abordagem cirúrgica e de um longo período de reabilitação.

As complicações são potencialmente letais e incluem infecção intra-abdominal, lesão a órgãos não protegidos, sangramento e fístulas⁽⁵⁾. Há muitas opções cirúrgicas para o fechamento da parede abdominal: fechamento primário, expansão do tecido, uso de próteses sintéticas, separação dos componentes, dependendo da localização e da distância do retalho⁽⁶⁾.

Em casos em que a cobertura músculo-aponeurótica é inadequada, a aplicação de material sintético é a principal técnica utilizada⁽¹⁾. Porém, além das implicações de seu custo, seu uso é contraindicado em alguns casos como os de fístula gastrintestinal concomitante, fístula enterocutânea, fasciíte necrosante, feridas contaminadas e imunossupressão, também como na rejeição a corpo estranho e infecção⁽⁷⁾.

O advento dos implantes de absorção biológica provou-se vantajoso em relação à habilidade deles serem assimilados pelo corpo e porque não precisam ser removidos no caso de infecção ou deiscência da ferida⁽⁸⁾. A fásia lata humana, a matriz extracelular de colágeno suíno, a dura-máter humana e o pericárdio bovino estão entre os tipos mais utilizados⁽⁹⁾.

O retalho de fásia lata tem sido utilizado em diversas especialidades médicas. Em oftalmologia, é usado para reconstrução do assoalho da órbita ou como suspensor palpebral no caso de ptose. Em neurocirurgia é usado para reconstituição da dura-máter durante a ressecção de tumores. Em ortopedia, para a reconstrução de ligamentos e, em urologia, no tratamento de incontinência urinária em mulheres, como suspensor pubovaginal⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Peláez Mata et al. apresentaram fechamento abdominal estético e funcional satisfatório utilizando fásia lata de cadáveres na reconstrução de defeitos abdominais em crianças⁽¹³⁾. Disa et al. indicaram uma taxa de 3% de hérnias recorrentes em 32 pacientes submetidos a reconstrução da parede abdominal com fásia lata autóloga em seguimento pós-operatório de 9 anos⁽¹⁴⁾.

O enxerto de fásia lata na reparação de grandes defeitos na parede abdominal é resistente e suporta a pressão intra-abdominal, integrando-se apropriadamente à área do implante^(15,16). Os enxertos, quando integrados, mantêm a arquitetura e a orientação das fibras do colágeno e são facilmente inseridos no tecido fibrocolágeno, sem causar reação de corpo estranho⁽¹⁷⁾. O fixação da borda do enxerto no defeito músculo aponeurótico provou-se melhor do que qualquer outro enxerto sintético⁽¹⁸⁾.

Desde do início de 1990 existem bancos de fásia lata que permitem seu uso seguro em ortopedia e oftalmologia⁽¹⁹⁾. O risco de rejeição e a transmissão de doenças, de acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), são considerados mínimos^(7,20).

Apesar disso, o procedimento de retirada da fásia lata humana envolve cirurgia e resulta em mutilação do paciente, além de ter estoque limitado. O tamanho do enxerto, mesmo considerando uma retirada bilateral, também é restrito, e esse é outro problema enfrentado, no caso de grandes defeitos^(11,21). Além disso, pode haver hematomas, seromas e deiscência de feridas no doador⁽¹⁴⁾.

Não há referências na literatura sobre o uso de aponeuroses no fechamento da parede abdominal com material heterólogo. Este estudo propôs uma abordagem experimental utilizando aponeurose de retos do abdome em coelhos não singênicos.

OBJETIVO

Estudar a viabilidade de utilizar aponeuroses heterólogas de retos do abdome para fechamento da parede abdominal com base na análise macroscópica e histológica do enxerto, enfatizando processo de rejeição.

MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciência Médicas da Santa Casa de São Paulo (SCMSP) e foi realizado na Unidade Técnica e Cirurgia Experimental (UTECE) da mesma instituição. Quatro coelhos machos brancos da raça Nova Zelândia e quatro fêmeas vermelhas da raça Nova Zelândia, pesando entre 3 e 4kg, foram divididos em dois grupos de estudo, como descrito abaixo.

No Grupo A (n=4), foi realizada ressecção parcial da aponeurose anterior dos retos abdominais dos machos que receberam enxertos de tamanho igual de aponeuroses dos animais no Grupo B. No Grupo B (n=4), as fêmeas foram submetidas à ressecção parcial da aponeurose anterior de retos do abdome e receberam enxertos de aponeurose de tamanho igual aos dos animais

do Grupo A. Um animal do Grupo A foi o receptor e doador para o mesmo Grupo de animais do Grupo B e vice-versa (Figura 1).

Um macho branco e uma fêmea vermelha, pesando 3 e 4kg, formaram o grupo controle (Grupo C). Neste grupo (n=2), a aponeurose dos animais foi recortada e reincorporada no mesmo segmento da aponeurose do músculo reto anterior do abdome (Figura 1).

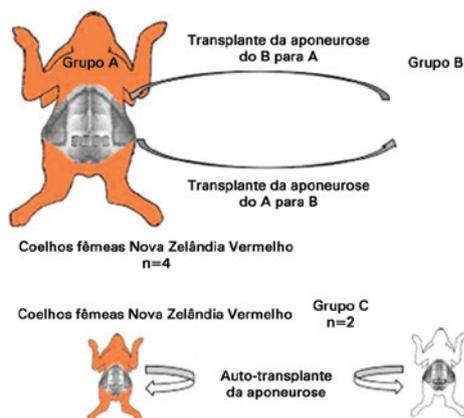


Figura 1. Um único animal no Grupo A foi doador e receptor do Grupo B e vice-versa. Grupo C: controle

Descrição da cirurgia

Anestesia

Os animais foram anestesiados 30 minutos antes da cirurgia com quetamina e xilazina, em doses de 25 e 3mg/kg, administradas via intramuscular, na superfície interna da coxa direita.

Técnica cirúrgica

Após serem posicionados em decúbito dorsal, os animais foram tosados e higienizados com solução antiséptica de álcool iodado 2%. Estabelecida a área estéril com campos cirúrgicos, os animais foram submetidos à incisão média com bisturi de lâmina número 22. A incisão foi infraumbilical, de aproximadamente 7 a 9cm, seguida de ressecção da aponeurose anterior dos músculos retos abdominais, utilizando tesoura Metzenbaum, de 3 por 7cm (Figura 2).



Figura 2. À esquerda, remoção do enxerto de aponeurose; à direita, síntese do enxerto de aponeurose

Preparação do enxerto

A ressecção do segmento de aponeurose foi colocada em solução fisiológica 0,9% a 4°C. Os segmentos de aponeurose foram suturados nas bordas do defeito aponeurótico com fio de nylon 4-0 (Figura 2).

Pós-operatório

Os coelhos foram mantidos por 3 semanas na UTECE. Imediatamente ao pós-operatório, foram oferecidos alimento e água *ad libitum*. Todos os dias, uma vez por dia, a ferida foi examinada para checar a presença de celulite, abscesso, hematoma, deiscência da sutura e eventração. Quando necessário, se o animal apresentasse desconforto no período pós-operatório, recebia imediatamente analgesia com morfina 2 a 5mg/kg subcutânea a cada 4 horas. Os animais foram sacrificados no 7º dia pós-cirurgia com solução de cloreto de potássio (19,1%), infusão de 10mL intravenosa. Após incisão transversal extensa infraumbilical, o enxerto foi removido com borda de 1cm.

Avaliação histológica do enxerto

A preparação histológica foi realizada pelo serviço de patologia da SCMSp e a análise foi realizada pelo Laboratório Cardoso de Almeida. As amostras dos enxertos, de 0,5cm por 0,5cm, consistindo de segmentos de tamanho igual de aponeuroses do doador e receptor, foram preservadas em solução de formol e fixadas em blocos de parafina. As alterações histológicas foram avaliadas de acordo com o sistema semiquantitativo descrito por Hooker et al.⁽²²⁾. A análise do processo de reação foi realizada com reagentes imunohistoquímicos CD20 e CD79.

RESULTADOS

Os animais não apresentaram celulite, abscesso, hematoma, deiscência da ferida ou herniação. O local do enxerto mostrou hiperemia intensa quando os animais foram sacrificados no 7º dia pós-operatório. A análise histológica mostrou um processo inflamatório, com miofibroblastos em amadurecimento e colágeno, variando de incipiente a moderado. O número de vasos mostrou-se reduzido e as células inflamatórias foram, na maioria, células do plasma e macrófagos. Não houve sinais morfológicos de rejeição aguda com agressão ao endotélio vascular. O músculo adjacente mostrou sinais de degeneração com centralização inflamatória dos núcleos e citoplasma condensado (Figura 3). A análise imunohistoquímica (CD20 e CD79) mostrou que o processo inflamatório não foi mediado por linfócitos. O teste não paramétrico de Mann-Whitney mostrou que a hipótese de igualdade ($p > 0,05$) não pode ser rejeitada.

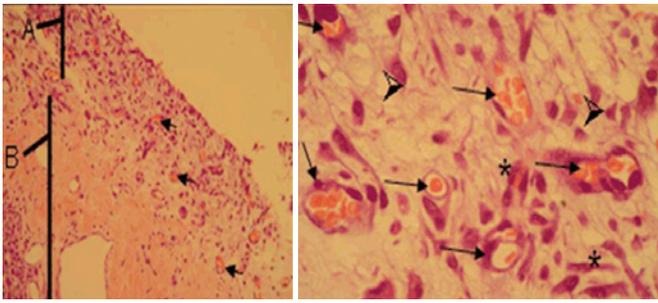


Figura 3. À esquerda, análise histológica mostrou processo inflamatório com amadurecimento de miofibroblastos e colágeno, variando de incipiente a moderado; à direita, o número de veias foi reduzido e as células inflamatórias foram, na maioria, células do plasma e macrófagos

DISCUSSÃO

O uso atual de materiais sintéticos para reconstrução da integridade da parede abdominal é relacionado a altas taxas de infecção e rejeição, sendo contraindicado em algumas situações^(7,8). O custo de tais materiais também é um fator limitante para sua aplicação. Em relação ao uso de aponeurose autóloga de fâscia lata para fechamento da parede abdominal, ela oferece suporte adequado à pressão intra-abdominal, com manutenção da conformação da estrutura do enxerto e integração completa, com revascularização e diminuição de risco de reação⁽¹¹⁾. Todavia, o problema de seu uso é a limitação do estoque e também a mutilação de outra região do corpo do paciente.

Não constam estudos na literatura avaliando o uso de aponeurose heteróloga dos músculos retos abdominais no fechamento da parede abdominal para que se estabeleça uma comparação. Os animais deste estudo não apresentaram complicações no pós-operatório (fistulas deiscências etc.) e a análise histológica mostrou processo inflamatório não específico. A análise imunistoquímica também mostrou que o processo inflamatório não foi mediado por linfócitos.

Esses resultados são preliminares, mas mostraram que o processo inflamatório não foi devido a uma possível rejeição.

CONCLUSÃO

O uso de aponeurose heteróloga no fechamento abdominal foi viável e não houve sinais de rejeição na análise imunohistoquímica. Este estudo mostrou uma linha de pesquisa com o uso de aponeurose heteróloga no fechamento da parede abdominal.

REFERÊNCIAS

1. Menon NG, Rodriguez ED, Byrnes CK, Giroto JA, Goldberg NH, Silverman

- RP. Revascularization of human acellular dermis in full-thickness abdominal reconstruction in the rabbit model. *Ann Plast Surg.* 2003;50(5):523-7.
2. Bellón JM, Serrano N, Rodríguez M, García-Honduvilla N, Pascual G, Buján J. Prótesis compuestas en las reparaciones de defectos de pared abdominal. Estudio comparativo del empleo de barreras físicas y/o químicas. *Cir Esp.* 2005;77(6):351-6.
3. d'Acampora JA, Joli FS, Tramonte R. [Expanded polytetrafluoroethylene and polypropylene in the repairing of abdominal wall defects in Wistar rats. Comparative study]. *Acta Cir Bras.* 2006; 21(6):409-15. Article in Portuguese.
4. Alexandrides IJ, Liu P, Marshall DM, Nery JR, Tzakis AG, Thaller SR. Abdominal wall closure after intestinal transplantation. *Plast Reconstr Surg.* 2000;106(4):805-12.
5. Levi DM, Tzakis AG, Kato T, Madariaga J, Mittal NK, Nery J, et al. Transplantation of abdominal wall. *Lancet.* 2003;361(9376):2173-6.
6. Lowe JB 3rd. Updated algorithm for abdominal wall reconstruction. *Clin Plast Surg.* 2006;33(2):225-40.
7. Disa JJ, Klein MH, Goldberg NH. Advantages of autologous fascia versus synthetic patch abdominal reconstruction in experimental animal defects. *Plast Reconstr Surg.* 1996;97(4):801-6.
8. Silverman RP, Singh NK, Li EN, Disa JJ, Giroto JA, Slezak S, et al. Restoring abdominal wall integrity in contaminated tissue-deficient wounds using autologous fascia grafts. *Plast Reconstr Surg.* 2004;113(2):673-5.
9. Bastos EL, Fagundes DJ, Taha MO, Novo NF, Silvado RA. Peritônio bovino conservado na correção de hérnia ventral em ratos: uma alternativa para tela cirúrgica biológica. *Rev Col Bras Cir.* 2005;32(5):256-60.
10. Singla AK. The use of cadaveric fascia lata in the treatment of stress urinary incontinence in women. *BJU Int.* 2000; 85(3):264-9.
11. Williams JK, Carlson GW, De Chalian T, Howell R, Coleman JJ. Role tensor fasciae lata in abdominal wall reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 1998;101(3):713-8.
12. Govier FE, Gibbons RP, Correa RJ, Weissman RM, Pritchett TR, Hefty TR. Pubovaginal slings using fascia lata for the treatment of intrinsic sphincter deficiency. *J Urol.* 1997;157(1):117-21.
13. Peláez Mata D, Alvarez Zapico JA, Gutiérrez Segura C, Fernández Jiménez I, García Saavedra S, González Sarasúa J, et al. [Fascia lata transplant from cadaveric donor in the reconstruction of abdominal wall defects in children]. *Cir Pediatr.* 2001; 14(1):28-30. Article in Spanish.
14. Disa JJ, Goldberg NH, Carlton JM, Robertson BC, Slezak S. Restoring abdominal wall integrity in contaminated tissue-deficient wounds using autologous fascia grafts. *Plast Reconstr Surg.* 1998;101(4):979-86.
15. Galie WE, Le Mesurier AB. Living sutures in the treatment of hernia. *Can Med Assoc J.* 1923;13:469-80.
16. de Vries Reilingh TS, Bodegom ME, van Goor H, Hartman EH, van der Wilt GJ, Bleichrodt RP. Autologous tissue repair of large abdominal wall defects. *Br J Surg.* 2007;94(7):791-803.
17. Peacock EE Jr. Subcutaneous extraperitoneal repair of ventral hernias: a biological basis for fascial transplantation. *Ann Surg.* 1975;181(5):722-7.
18. Das SK, Davidson SF, Walker BL, Talbot PJ. The fate of free autogenous fascial grafts in the rabbit. *Br J Plast Surg.* 1990;43(3):315-7.
19. Almeida SH, Gregório EP, Rodrigues MA, Grandó JP, Moreira HA, Fraga FC. Banked cadaveric fascia lata: 3 year follow-up. *Transplant Proc.* 2004; 36(4):993-4.
20. Food and Drug Administration. The FDA interagency guidelines for human tissue intended for transplantation. *Fed Reg.* 1993;58:65514-21.
21. Giroto JA, Chiamonte M, Menon NG, Singh N, Silverman R, Tufaro AP, et al. Recalcitrant abdominal wall hernias: long-term superiority of autologous tissue repair. *Plast Reconstr Surg.* 2003;112(1):106-14.
22. Hooker GD, Taylor BM, Driman DK. Prevention of adhesion formation with use of sodium hyaluronate-based bioresorbable membrane in a rat model of ventral hernia repair with polypropylene mesh: a randomized, controlled study. *Surgery.* 1999;125(2):211-6.