

Estudo experimental comparativo do enxerto homólogo pulmonar tratado pelo processo L-Hydro com o homoenxerto pulmonar a fresco

Comparative experimental study between L-Hydro treated pulmonary homograft and fresh pulmonary homograft

Nei Antônio REY¹, Luiz Felipe Pinho MOREIRA², David T. CHEUNG³, Ivan Sérgio Joviano CASAGRANDE⁴, Luiz Alberto BENVENUTI⁵, Noedir Antonio Groppo STOLF⁶

RBCCV 44205-1278

Resumo

Objetivo: Buscando novas formas de preservação de tecidos utilizamos o polietileno-glicol, método L-Hydro (LH), que consiste na extração controlada de substâncias antigênicas e incorporação de agente anti-inflamatório e antitrombótico.

Métodos: Em dez carneiros jovens, substituímos o tronco pulmonar, em sete, por homoenxertos pulmonares (HP) tratados pelo processo L-H e, em três, por HP a fresco, implantados ortotopicamente, seguidos por 320 dias. Os carneiros foram avaliados por exames laboratoriais e ecocardiográficos. Ao cabo dos 320 dias foram sacrificados, procedendo-se à avaliação hemodinâmica, radiológica, macro/microscópica, óptica e eletrônica, varredura e transmissão. Resultados foram analisados pelo teste t de Student de amostras independentes para dados contínuos, análise de variância para medidas repetidas, pelo teste exato de Fisher para dados categóricos.

Resultados: Evolução clínica e exames laboratoriais não conseguiram estabelecer diferenças significativas entre os grupos. Ecocardiograma revelou diferença quanto ao gradiente médio pulmonar, significativa aos 10 meses, maior

no grupo controle. Avaliação radiológica e macroscópica não estabeleceu diferenças. Na avaliação microscópica, óptica/eletrônica, células de revestimento e intersticiais foram encontradas nos dois grupos igualmente. O percentual de revestimento celular calculado nos dois grupos foi semelhante. Nódulos de celularidade foram observados somente no grupo de homoenxertos a fresco.

Conclusões: Estes dados indicam que os dois grupos apresentaram desempenho clínico e hemodinâmico semelhante. Ao ecocardiograma o grupo LH apresentou melhor desempenho, e evidências histológicas de repopulação celular intersticial e endotelial. Na análise macro/microscópica, óptica/eletrônica, o grupo L-Hydro apresentou macroscopia, estrutura histológica e ultraestrutural semelhante ao homoenxerto fresco, à exceção de nódulos de maior celularidade intersticial, presentes apenas no homoenxerto a fresco.

Descritores: Transplante homólogo. Polietilenoglicóis. Valvas Cardíacas. Ovinos.

Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Trabalho realizado no Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil e The International Heart Institute of Montana Foundation, Montana, EUA. Trabalho desenvolvido a partir da Tese de Doutorado defendida na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Endereço para correspondência
Nei Antonio Rey
Rua Gregor Mendel, 90 – Porto Alegre, RS, Brasil – CEP: 90480-150
E-mail: neiarey@yahoo.com
Suporte Financeiro: Fapesp

Artigo recebido em 26 de janeiro de 2011
Artigo aprovado em 22 de fevereiro de 2011

1. Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo, Membro Titular da SBCCV.
2. Professor Livre Docente do Departamento de Cirurgia Torácica e Cardiovascular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; Diretor da Unidade Cirúrgica de Pesquisa do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
3. Biólogo; The International Heart Institute of Montana Foundation, Montana, EUA.
4. Médico; Diretor do Laboratório Labcor, Belo Horizonte, MG, Brasil.
5. Doutor em Medicina, Médico-Chefe do Setor de Necropsias do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração, São Paulo, SP, Brasil.
6. Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Cardiovascular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; Diretor do

Abstract

Objective: In an effort to make available homografts preserved in a simpler and less costly way, we evaluated the polyethyleneglycol, L-Hydro (LH) method, that consists in the controlled extraction of antigenic substances and the incorporation of anti-inflammatory and anti-thrombotic agent.

Methods: We substituted the pulmonary trunk in ten ovines, seven received LH treated pulmonary homografts and three, fresh pulmonary homografts, orthotopically implanted and followed-up for 320 days. Ovines were evaluated by means of laboratory tests, echocardiographic exams. At the 320 days, were euthanized, hemodynamic, radiology, macroscopic, optic/electronic microscopic, scanning/transmission evaluations were performed. Results were analyzed by Student t test of independent samples for continuous data, by variance analysis of repeated measures, and by Fisher exact test for categorical data.

Results: We couldn't establish relevant differences in clinical evolution and laboratory tests between groups. Echocardiogram revealed difference in pulmonary medium

gradient, which was significant 10 months follow-up, higher in the control group. Radiologic and macroscopic evaluations didn't established differences. In the optic/electronic microscopic evaluation, liner and interstitial cells were equally found in both groups. The cell liner percent calculated in both groups was similar. Cellularity nodules were observed only in fresh homograft group.

Conclusions: These data indicate that both groups presented similar clinical/hemodynamic performances. The LH group's echocardiogram presented a better performance. It also presented histological evidences of interstitial and endothelial cell repopulation. In the macro/optic and electronic microscopic analysis, group L-H presented macroscopy/histological structure and ultra-structural similar to the fresh group, with the exception of nodules with higher interstitial cellularity, present only in the fresh homograft group.

Descriptors: Transplantation, Homologous. Polyethylene Glycols. Heart Valves. Sheep.

INTRODUÇÃO

Diversas enfermidades cardiovasculares, congênitas ou adquiridas, determinam a necessidade de substituição de valvas cardíacas ou a interposição de condutos valvados. Estima-se que são realizadas anualmente pelo menos 60.000 substituições valvares nos Estados Unidos da América e 170.000 no mundo [1]. A troca valvar muda a evolução da enfermidade, trazendo nova perspectiva ao paciente, mas para isto é necessário que tenhamos um substituto valvar confiável. Por este motivo, há mais de 40 anos busca-se um substituto valvar ideal. As primeiras próteses foram mecânicas e, em seguida, empregou-se a valva aórtica do cadáver, retirada assepticamente, usando como meio de preservação a liofilização [2] ou a solução de Hanks [3]. Eram os homoenxertos, que demonstraram bons resultados no curto prazo. A evolução foi o conceito de "bioprótese" [4], que associou material biológico montado sobre uma base metálica ou plástica. As complicações inerentes às próteses mecânicas e biopróteses, como o tromboembolismo e a degeneração, condicionaram o retorno ao uso dos homoenxertos, porém a dificuldade de sua obtenção permaneceu.

Para facilitar a sua disponibilidade e conservação, empregou-se a criopreservação [5] com os Bancos de Homoenxertos, método de escolha atual. Mesmo assim, ainda permanecem alguns problemas, como o seu custo, a sofisticação do método, a dificuldade de eliminação de agentes infecciosos [6] e a degeneração no longo prazo [1,7,8]. Outros processos, como a decelularização estão em desenvolvimento, com resultados contraditórios. O desejo de disponibilizar homoenxertos preservados de maneira simples e econômica, mantendo qualidade, nos levou a

avaliar uma nova forma de preservação, com o uso do Polietilenoglicol (PEG), que vem sendo empregado no tratamento de tecidos desde longa data [9]. Para tanto, comparamos morfológica e funcionalmente o homoenxerto pulmonar tratado pelo PEG, método L-Hydro, com o homoenxerto pulmonar a fresco implantado ortotopicamente em carneiros.

MÉTODOS

Selecionamos 14 ovinos da raça Santa Inês (Ovis áries), com idade entre 4 e 6 meses e peso entre 18 e 32 kg. Os animais foram submetidos a exame clínico geral por médico veterinário, e considerados clinicamente sadios para a intervenção cirúrgica. Na preparação dos homoenxertos usamos ovinos obtidos em abatedouro aprovado pelo Ministério da Agricultura e pelo Serviço de Inspeção Federal.

No caso dos homoenxertos L-Hydro, todo o processamento aconteceu num período de até 36 horas da morte do doador e constou das seguintes etapas:

- 1ª etapa – extração dos antígenos ovinos e mascaramento dos remanescentes sob oxidação química controlada pelo uso do ácido polietilenoglicol;
- 2ª etapa – incorporação ao enxerto de agente antiinflamatório não esteroide (equivalente à aspirina) e de um agente antitrombótico (equivalente à heparina);
- 3ª etapa – esterilização do tecido em fase aquosa de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Concluído o processo de preservação, os enxertos foram estocados em solução de etanol a 50% até sua utilização. Nos enxertos frescos, os corações foram obtidos em sala cirúrgica contígua, em condições estéreis. O tronco pulmonar foi dissecado desde a sua bifurcação até a origem,

preservando-se pequena aba de tecido muscular do ventrículo direito. Foram colocados em solução salina gelada a 4°C e imediatamente utilizados, caracterizando os enxertos como “homovitais”.

Os animais foram operados por toracotomia esquerda pelo 4º espaço intercostal (EIC), sob anestesia geral e monitorização. Foi instituída a circulação extracorpórea (CEC) AD-Ao, em normotermia. O tronco pulmonar foi ressecado, destruídas as válvulas pulmonares e interposto o homoenxerto por sutura contínua com fio monofilamentar 4-0. A CEC foi descontinuada, revista a hemostasia e colocado dreno no hemitórax esquerdo, retirado após completar o fechamento do tórax e a reexpansão pulmonar.

No pós-operatório, os animais receberam cuidados de rotina e antibióticos. Após 7 dias, em condições clínicas satisfatórias, foram transferidos para o biotério, onde permaneceram em observação diária pelo médico veterinário.

Realizaram os exames laboratoriais (hemograma, plaquetas, cálcio, fósforo, DHL), aos 6 e 11 meses e exame ecocardiográfico aos 7 e 10 meses, avaliando os gradientes pulmonares médio e máximo, mobilidade e suficiência valvar. Aos 320 dias houve o sacrifício eletivo sob anestesia geral, quando se procedeu à avaliação hemodinâmica com o cateter de Swan-Ganz, analisando pressão venosa central (PVC), pressão arterial pulmonar (PAP), pressão capilar pulmonar (PCP), débito cardíaco e a arteriografia pulmonar. A seguir, por nova toracotomia esquerda, a peça foi retirada, procedendo-se à avaliação macroscópica por 3 observadores. Os itens analisados [10] foram: estenose; insuficiência; deiscência; presença de vegetações; roturas/rasgos/abrasão; trombos nas cúspides; trombos nos seios de Valsalva; calcificação nas cúspides; calcificação em seios de Valsalva; flexibilidade, espessamento e coaptação das cúspides. As peças em seu conjunto foram radiografadas no mamógrafo para avaliar calcificações e enviadas para exame pela microscopia óptica e eletrônica, de varredura e de transmissão.

Todos os experimentos foram realizados no Centro de Pesquisa da Labcor Laboratórios, mediante a aprovação da Comissão Científica do Instituto do Coração e de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foi adotada a Nômina Anatômica Veterinária.

A análise estatística foi executada com o auxílio do programa SPSS versão 12.0. Os dados contínuos foram apresentados por média e desvio padrão e os categóricos, por contagens. Evitou-se o uso de percentuais devido ao reduzido tamanho dos grupos em estudo. A significância estatística das diferenças observadas foi obtida através do teste-t de Student de amostras independentes para os dados contínuos, pela análise de variância ANOVA e pelo teste exato de Fisher nos dados categóricos. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

RESULTADOS

O homoenxerto tratado pelo método L-Hydro apresenta boa maleabilidade, facilidade para a interposição das suturas e boa hemostasia. Dos 14 animais operados, 3 faleceram até 24 horas. Um dos animais sofreu acidente no 7º dia de pós-operatório, e foi sacrificado. Constituíram-se dois grupos: Grupo L-Hydro, com sete animais, e Grupo Controle, com três animais. Um dos carneiros do grupo L-Hydro apresentou quadro infeccioso, com aparecimento de nódulos no pescoço. Tratado com antibióticos, melhorou e permaneceu em observação até o tempo final do estudo. Os outros animais mantiveram-se sem intercorrências. Na Tabela 1, apresentamos os dados de peso inicial e final, ganho ponderal e os exames laboratoriais realizados nos dois grupos aos 7 e 12 meses. Não houve diferenças significativas entre os dois grupos nos exames laboratoriais e no ganho ponderal. As médias, os erros-padrão, o nível descritivo do teste-t de Student e a análise de variância destas variáveis constam da mesma tabela.

O ecocardiograma realizado no 7º e 10º mês demonstrou função ventricular preservada em todos os casos. Com exceção do caso 1 do grupo L-Hydro, as valvas pulmonares foram bem visualizadas, abrindo-se sem restrições. As pressões do ventrículo direito e o diâmetro dos enxertos não apresentaram diferenças. O gradiente pulmonar máximo e médio apresentaram diferença aos sete meses, sendo os valores maiores no grupo controle. Esta diferença foi significativa aos 10 meses, com o grupo controle apresentando maiores gradientes. As médias, os erros-padrão, o nível descritivo do teste-t de Student e a análise de variância destas variáveis constam da Tabela 2.

A análise hemodinâmica não revelou diferenças entre os grupos quanto a PVC, PAP, PCP e débito cardíaco. As médias, os erros-padrão e o nível descritivo do teste-t de Student das variáveis hemodinâmicas são apresentados da Tabela 2. À angiografia pulmonar, os dois grupos apresentaram homoenxertos suficientes, com válvulas de mobilidade normal e sem estenoses, com exceção do caso número 1, do grupo L-Hydro, em que constatamos insuficiência importante. A mamografia demonstrou ausência de imagens radiopacas sugestivas de calcificação (alta densidade) nas cúspides pulmonares nos dois grupos de enxertos, mas revelou imagens radiopacas sugestivas de calcificação nas regiões correspondentes às linhas de sutura em ambos os grupos.

Na avaliação macroscópica, o caso número 1 do grupo L-Hydro apresentou vegetações fibrinosas, parcialmente calcificadas, localizadas nos seios de Valsalva, com destruição das válvulas. Todos os outros casos dos dois grupos não apresentaram estenose, insuficiência, deiscência ou ruptura/abrasão. Apresentaram também cúspides flexíveis, coaptadas e não espessadas. Presença

de trombo em cúspide constatou-se em caso do grupo L-Hydro, de 2x4 mm, em uma cúspide. Não identificamos trombo em cúspide em nenhum caso do grupo controle. Trombos no seio de Valsalva foram verificados em quatro casos do grupo L-Hydro e em todos os casos do grupo controle. Calcificação em válvulas pulmonares verificou-se apenas no caso 1 do grupo L-Hydro e em nenhum outro caso dos dois grupos. Calcificação do anel não foi verificada em qualquer dos casos. Fotos da macroscopia estão na Figura 1. As variáveis macroscópicas examinadas são apresentadas da Tabela 3, analisadas pelo teste exato de Fisher.

A microscopia óptica revelou cúspides pouco retraídas, com adelgaçamento progressivo em direção à borda livre, que apresentavam celularidade geralmente escassa ou

ausente e aspecto intensamente eusínfilo. De forma geral, a celularidade intersticial predomina nas regiões próximas ao anel e parece mais exuberante na metade voltada para a luz ventricular (camada ventricular esponjosa); entretanto, nódulos de maior celularidade intersticial foram observados em áreas intermédias das cúspides, nos três casos controle. Células atapetando parte da superfície das cúspides foram observadas em todos os casos, à exceção do número 1, em ambas as faces (predominando aparentemente na ventricular), tanto na região próxima ao anel como na próxima à borda livre. No caso número 1, grupo L-Hydro, foi detectado no miocárdio cisto parasitário: *Sarcocystis spp*, achado frequente em ovinos e não relacionável ao quadro infeccioso apresentado por este animal. Achados da microscopia óptica estão exemplificados na Figura 2.

Tabela 1. Comparação de variáveis selecionadas entre os grupos L-Hydro e Controle

Variável	L-Hydro n=7	Controle n=3	P	P _g	P _i
Idade (meses)	5,4±0,8	5,8±0,6	0,47*		
Peso inicial (Kg)	23,0±4,7	22,3±2,3	0,83*		
Peso final (Kg)	40,4±9,3	39,0±2,6	0,81*		
Ganho ponderal (Kg)	17,4±6,0	16,7±4,5	0,85*		
Dados laboratoriais			<0,001**	0,509	0,304
Hematócrito (%)					
7 meses PO	51,3±5,2	51,7±3,2			
11 meses PO	71,3±5,3	75,0±3,5			
Hemoglobina (g/dL)			0,022**	0,232	0,737
7 meses PO	13,8±2,1	12,4±1,8			
11 meses PO	16,0±1,7	15,2±1,0			
Leucócitos (n°/µL)			0,151**	0,407	0,778
7 meses PO	7.150±2.997	5.817±2.157			
11 meses PO	6.357±2.854	4.666±577			
Cálcio (mg/dL)			0,603**	0,084	0,283
7 meses PO	9,1±0,7	9,9±0,7			
11 meses PO	9,3±0,6	9,2±0,4			
Fósforo (mg/dL)			0,001**	0,216	0,030
7 meses PO	6,8±0,5	6,8±1,8			
11 meses PO	7,6±0,8	9,2±1,6			
DHL (U/L)			0,340**	0,019	0,084
7 meses PO	293±48	389±15			
11 meses PO	309±42	339±14			
Plaquetas (n°/µL)			0,153**	0,443	0,545
7 meses PO	607.143±109.653	533.333±175.594			
11 meses PO	614.285±106.904	550.000±150.000			
Hemácias (n°/µL)			0,796**	0,145	0,665
7 meses PO	11.721±4.177	15.200±2.227			
11 meses PO	11.857±2.115	14.666±1.528			

Os dados são apresentados como média±dp

*Significância estatística obtida pelo teste t de Student

**Obtida pela Análise de Variâncias para medidas repetidas: fator tempo

P_g Obtida pela Análise de Variâncias para medidas repetidas: fator grupo

P_i Obtida pela Análise de Variâncias para medidas repetidas: fator interação

Tabela 2. Comparação de variáveis selecionadas entre os grupos L-Hydro e Controle

	L-Hydro n=7	Controle n=3	P	P _g	P _i
Ecocardiograma					
Gradiente máximo pulmonar (mmHg)			0,656**	0,049	0,758
7 meses PO	2,8±2,2	5,4±1,9			
10 meses PO	2,8±0,6	5,0±2,3			
Gradiente médio pulmonar (mmHg)			0,301**	0,030	0,957
7 meses PO	1,8±1,4	3,4±0,7			
10 meses PO	1,4±0,4	3,0±1,2			
Pressão VD (mmHg)			<0,001**	0,418	0,506
7 meses PO	18,8±5,7	22,7±3,4			
10 meses PO	34,5±5,9	39,6±2,7			
Diâmetro do enxerto pulmonar			0,335**	0,268	0,826
7 meses PO	21,0±2,2	19,3±0,6			
10 meses PO	22,6±2,3	20,3±6,4			
Dados hemodinâmicos					
PVC (cm de H ₂ O)	-0,57±1,31	0,50±0,87	0,24*		
PAP (mmHg)	8,00±3,51	8,33±2,08	0,88*		
PCP (mmHg)	3,90±0,89	4,50±4,77	0,78*		
Débito cardíaco (ml/minuto)	4.35±843	4.393±907	0,56*		

Os dados são apresentados como média±dp

*Significância estatística obtida pelo teste t de Student

**Obtida pela Análise de Variâncias para medidas repetidas: fator tempo

P_g Obtida pela Análise de Variâncias para medidas repetidas: fator grupo

P_i Obtida pela Análise de Variâncias para medidas repetidas: fator interação

mmHg – milímetros de mercúrio; Pressão VD – pressão no ventrículo direito; PVC – pressão venosa central; PAP – pressão em artéria pulmonar; PCP – pressão em capilar pulmonar; ml/minuto – milímetros por minuto

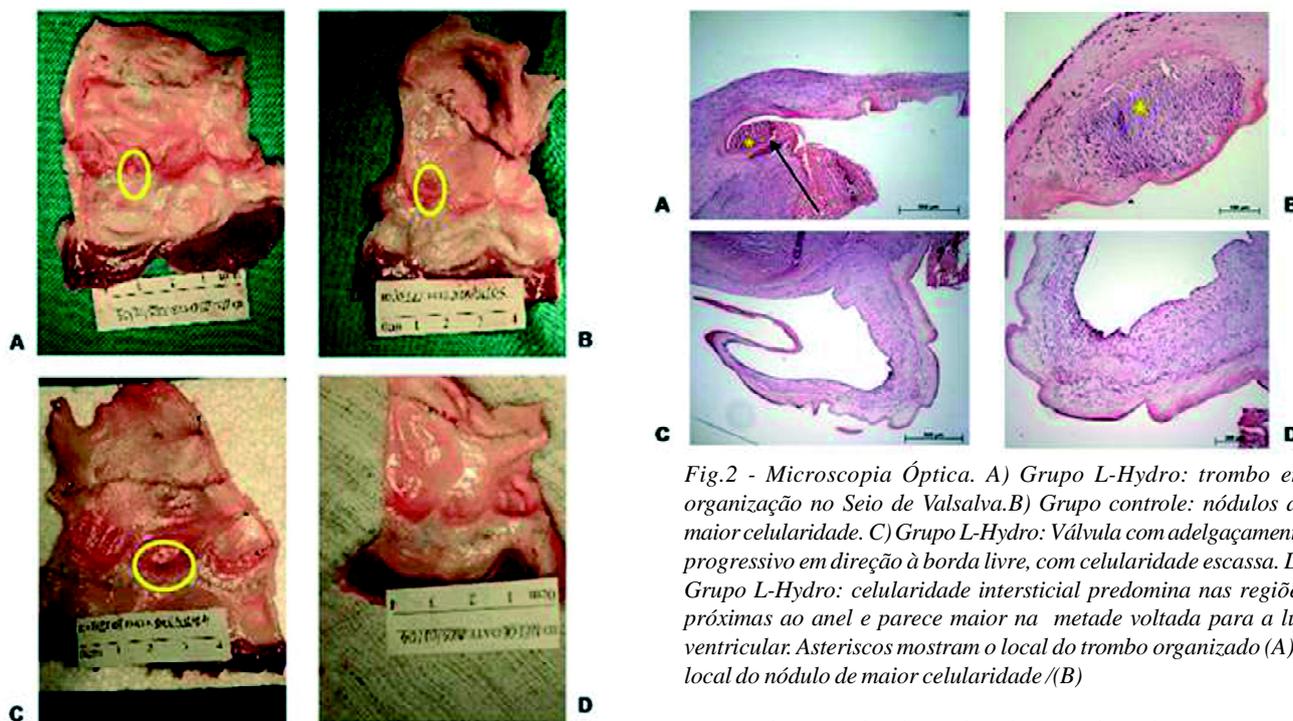


Fig. 1 - Avaliação macroscópica. A) Grupo L-Hydro: calcificação de 1 x 1mm subcomissural. Válvulas flexíveis. B) Grupo controle: trombo organizado no Seio de Valsalva de 5 x 7mm. Válvulas flexíveis. C) Grupo L-Hydro: trombo organizado na borda de livre, de 2 x 4mm. Válvulas flexíveis. D) Grupo L-Hydro: válvulas flexíveis. Círculo amarelo mostra lo local da calcificação ou trombo

Fig.2 - Microscopia Óptica. A) Grupo L-Hydro: trombo em organização no Seio de Valsalva. B) Grupo controle: nódulos de maior celularidade. C) Grupo L-Hydro: Válvula com adelgaçamento progressivo em direção à borda livre, com celularidade escassa. D) Grupo L-Hydro: celularidade intersticial predomina nas regiões próximas ao anel e parece maior na metade voltada para a luz ventricular. Asteriscos mostram o local do trombo organizado (A) e local do nódulo de maior celularidade (B)

A microscopia eletrônica de varredura demonstrou em todos os casos, à exceção do caso 1, áreas de superfície pavimentadas por células arredondadas ou alongadas, por vezes com disposição em paralelo, compatíveis com células endoteliais, e que apresentavam o aspecto de endotélio normal de ovinos publicado na literatura. A Figura 3 mostra o aspecto encontrado nos nossos casos.

Tabela 3. Comparação de variáveis macroscópicas selecionadas entre os grupos L-Hydro e Controle

	L-Hydro n=7	Controle n=3	P
Macroscopia (calcificações e trombos)			
Calcificação do anel	0	0	0,99
Calcificação das válvulas	1	0	0,99
Trombo no seio de Valsava	3	3	0,20
Trombo nas válvulas	1	0	0,99
Macroscopia geral do homoenxerto			
Estenose	0	0	0,99
Insuficiência	1	0	0,99
Deiscência	0	0	0,99
Vegetações	1	0	0,99
Ruptura/abrasão			
Válvulas	0	0	0,99
Válvulas flexíveis	6	3	0,99
Válvulas coaptadas	6	3	0,99
Válvulas espessadas	1	0	0,99

Os dados são apresentados como contagens simples nas variáveis categóricas

P – Significância estatística obtida pelo teste exato de Fisher

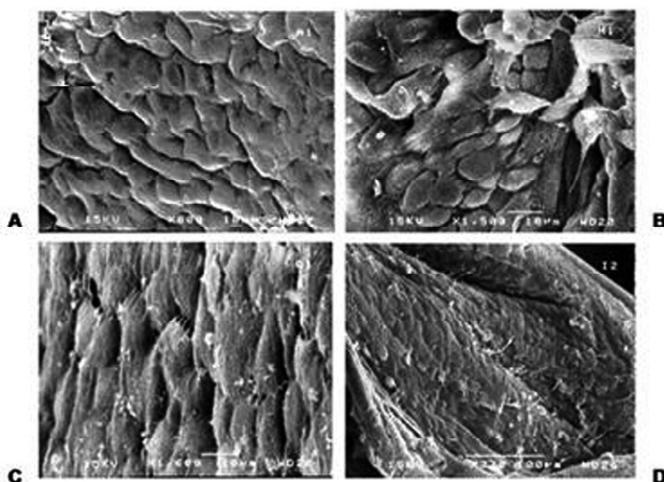


Fig. 3 - Microscopia Eletrônica de Varredura. A e B) Grupo L-Hydro: células poliédricas, de revestimento, endoteliais, semelhantes a paralelepípedo. C e D) Grupo Homoenxerto a fresco: mesmo aspecto

A microscopia eletrônica de transmissão demonstrou, em meio a numerosas fibras de colágeno, presença de células ultraestruturalmente íntegras, de formato arredondado ou alongado (mais comumente), com numerosas projeções citoplasmáticas. Núcleo com cromatina condensada na periferia e citoplasma contendo organelas habituais, notando-se em algumas, corpúsculos elétron-densos. Aspecto ultraestrutural compatível com células mesenquimais viáveis, provavelmente fibroblastos. Em quatro casos do grupo L-Hydro, foram observadas células revestindo parcialmente os folhetos.

Tais células eram semelhantes às descritas anteriormente, apresentando projeções citoplasmáticas interdigitantes. Em um destes casos, notou-se presença focal de membrana basal abaixo das citadas células e estruturas de junção celular estavam presentes em dois outros casos. Em um destes,

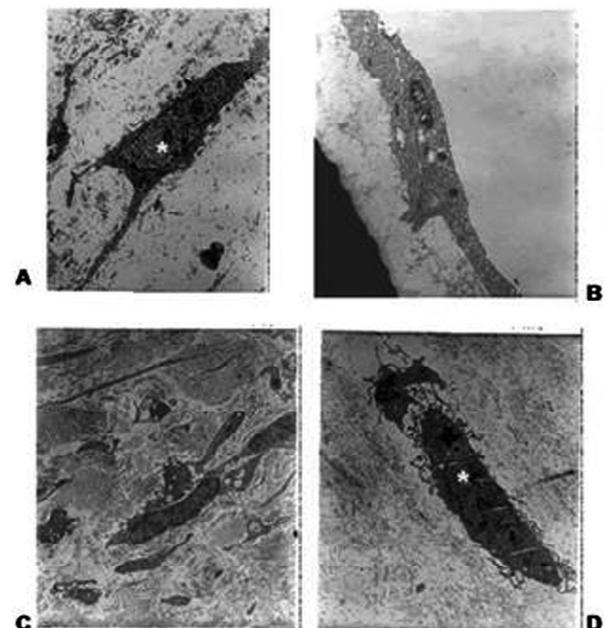


Fig.4 - Microscopia Eletrônica de Transmissão. A) Grupo L-Hydro: células intersticiais preservadas. B) Grupo L-Hydro: abundante pinocitose e grânulos citoplasmáticos eletrodensos nas células superficiais compatíveis com células endoteliais em processo de diferenciação. C) Grupo homoenxerto a fresco: célula intersaticial alongada bem preservada. Asteriscos ressaltam as células intersticiais

notou-se a presença de abundante pinocitose e grânulos citoplasmáticos elétron-densos em algumas destas células superficiais. Tais aspectos são compatíveis com células endoteliais, provavelmente em processo de diferenciação. Os achados da microscopia eletrônica de transmissão estão exemplificados na Figura 4. A Tabela 4 resume os achados da microscopia óptica e eletrônica e são analisados pelo teste exato de Fisher.

Tabela 4. Comparação de variáveis selecionadas entre os grupos L-Hydro e Controle

	L-Hydro n=7	Controle n=3	P
Microscopia óptica			
Células superficiais	6	3	0,99
Células inflamatórias	4	1	0,99
Nódulos de maior celularidade	0	3	<0,01
Microscopia eletrônica			
Células superficiais MET	4	0	0,20
Células superficiais MEV	6	3	0,99
Células intersticiais MET	7	3	0,99

Os dados são apresentados como contagens simples nas variáveis categóricas

P – Significância estatística obtida pelo teste exato de Fisher

Células superficiais MET – Presença de células superficiais na microscopia eletrônica de transmissão; Células superficiais MEV - Presença de células superficiais na microscopia eletrônica de varredura; Células intersticiais MET - Presença de células intersticiais na microscopia eletrônica de transmissão

DISCUSSÃO

A substituição valvar ou a interposição de condutos valvados é um problema de grande magnitude, devido à frequência em que são necessárias e à sua distribuição geográfica, que é universal. Impõe-se o uso de um substituto valvar de qualidade, pois dele depende o sucesso do procedimento cirúrgico. Outros fatores de relevância são a disponibilidade e o preço. Ao se optar por substituto valvar biológico, o ideal seria podermos usar heteroenxertos, com alguma forma de tratamento, pela facilidade de obtenção, embora a resposta imunológica do receptor antevaja-se maior que para o uso de homoenxertos.

Esta tentativa foi feita utilizando o método Sinergraft (Cryolife, Inc.), decelularizando heteroenxertos. Após bons resultados experimentais, o uso clínico revelou-se desastroso [11], sendo descontinuado. Permanece o método sendo empregado em homoenxertos, com bons resultados publicados [12]. A decelularização de heteroenxertos pelo ácido deoxicólico (DOA) demonstra bons resultados experimentais [13] e clínicos com 24 meses de observação [14]. Vários métodos de decelularização mostram-se promissores, como o dodecilsulfato de sódio (SDS) empregado em homoenxertos [15], entre outros [16].

O método consagrado, em uso clínico atualmente, a criopreservação, de bons resultados, ainda não é o ideal, pois esbarra na complexidade, alto custo, dificuldade de transporte a regiões afastadas, dificuldade de esterilização de alguns organismos, e degeneração a longo prazo, principalmente em jovens [17,18]. Enfim, a busca continua. O método L-Hydro, usando o polietilenoglicol (PEG), já testado em outros tipos de tecidos, apresenta-se como o mais simples, de baixo custo e pouco sofisticado. A toxicidade reduzida do PEG foi demonstrada por Wicomb et al. [19] e esta substância mostrou-se eficaz quando

adicionada à solução de preservação miocárdica, garantindo a viabilidade funcional do órgão por tempo mais prolongado do que aquele preconizado com o uso de soluções cardioplégicas convencionais [20].

Também é atribuída ao PEG a propriedade imunossupressora na qual está fundamentada a preservação L-Hydro. Antígenos que se combinam com o PEG manifestam redução de antigenicidade, como foi relatado no trabalho de Collins et al. [21]. Nas palavras de Cheung, “este é um processo que torna as células não viáveis, não agredindo a estrutura extracelular, não se preocupando em retirar as células, diferindo da decelularização”. No nosso estudo, comparamos o grupo L-Hydro com um grupo controle de homoenxertos “a fresco”, com uso imediato, verdadeiros enxertos “homovital”. Assim procedemos para termos como referencial de comparação o “padrão ouro” dos enxertos, já que trabalhos clínicos publicados com o uso de enxertos “homovital” mostram excepcionais resultados, atingindo até 97% de enxertos livres de degeneração em 10 anos [22]. Na série de Yacoub, o uso clínico de homoenxertos “homovital” foi fator independente de redução de mortalidade [22]. Sabemos que qualquer processamento de enxertos, incluindo a esterilização com antibióticos de baixa concentração, tem o potencial de alterar a viabilidade, bem como as propriedades físicas e antigênicas do tecido [23]. Usamos carneiros jovens, cuja estrutura cardíaca geral e valvas se assemelha à humana [24], e que são tradicionais modelos de investigação [25], pois apresentam calcificações precocemente. Um fator que se tem que levar em conta na análise dos resultados é a baixa reação antigênica dos carneiros, por exemplo, usa-se sangue entre os animais sem testar o sistema ABO/Rh, sem qualquer consequência danosa. Não sabemos quanto este fato possa influenciar na repopulação encontrada, já que um dos mecanismos

estabelecidos clinicamente para a degeneração é, sem dúvida, a reação antigênica [18]. O número de carneiros obedeceu à *International Standard Organization - ISO 5840*, 3ª Edição, publicada em 1996 e revista em 2005. Tivemos 3 óbitos imediatos e o carneiro sacrificado aos 7 dias (sofreu acidente desarticulando o membro anterior esquerdo) foi necropsiado, apresentando o enxerto em boas condições. Nossos resultados ecocardiográficos demonstraram que a conservação L-Hydro foi mais favorável que a “a fresco/homovital”, propiciando gradientes menores aos 10 meses. A microscopia óptica mostrou “nódulos de maior celularidade” somente nos homoenxertos frescos, sendo este um achado encontrado na literatura [26], e que atribuímos a uma recelularização via hemática, que o método L-Hydro não proporcionou. Os modelos animais, embora com anatomia muito semelhante à humana, possuem antigenicidade diferente, o que pode levar a resultados não reproduzíveis quando do uso clínico.

CONCLUSÕES

A comparação do homoenxerto pulmonar conservado pelo método L-Hydro com o homoenxerto a fresco, implantado ortotopicamente em carneiros jovens, seguidos por 320 dias mostrou:

- O homoenxerto tratado pelo PEG apresentou desempenho clínico e hemodinâmico semelhante ao homoenxerto a fresco. O desempenho ecocardiográfico foi melhor;
- O homoenxerto tratado pelo PEG apresentou evidências histológicas de repopulação celular intersticial e endotelial;
- O homoenxerto tratado pelo PEG apresentou estrutura histológica e ultraestrutural semelhante ao homoenxerto a fresco, à exceção de nódulos de maior celularidade intersticial, presentes apenas no homoenxerto a fresco.

REFERÊNCIAS

1. Schoen FJ, Levy RJ. Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res.* 1999;47(4):439-65.
2. Ross DN. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet.* 1962;2(7254):487.
3. Barrat-Boyes BG. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax.* 1964;19:131-50.
4. Carpentier A. From valvular xenograft to valvular bioprosthesis: 1965-1970. *Ann Thorac Surg.* 1989;48(3 Suppl):S73-4.
5. O'Brien MF, Stafford G, Gardner M. The viable cryopreserved allograft aortic valve. *J Card Surg.* 1987;2(1 Suppl):153-67.
6. Peruzzo AM, Costa FDA, Abrahão WM. Controle microbiológico em valvas cardíacas humanas. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87(6):778-82.
7. Koolbergen DR, Hazekamp MG, Heer E, Bruggemans EF, Huysmans HA, Dion RA, et al. The pathology of fresh and cryopreserved homograft heart valves: an analysis of forty explanted homograft valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;124(4):689-97.
8. Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Pathology of explanted cryopreserved allograft heart valves: comparison with aortic valves from orthotopic heart transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;115(1):118-27.
9. Wicomb WN, Hill JD, Avery J, Collins GM. Optimal cardioplegia and 24-hour heart storage with simplified UW solution containing polyethylene glycol. *Transplantation.* 1990;49(2):261-4.
10. Sayk F, Bos I, Schubert U, Wedel T, Sievers HH. Histopathologic findings in a novel decellularized pulmonary homograft: an autopsy study. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(5):1755-8.
11. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003;23(6):1002-6.
12. Tavakkol Z, Gelehrter S, Goldberg CS, Bove EL, Devaney EJ, Ohye RG. Superior durability of SynerGraft pulmonary allografts compared with standard cryopreserved allografts. *Ann Thorac Surg.* 2005;80(5):1610-4.
13. Dohmen PM, Costa F, Yoshi S, Lopes SV, Souza FP, Vilani R, et al. Histological evaluation of tissue-engineered heart valves implanted in the juvenile sheep model: is there a need for in-vitro seeding? *J Heart Valve Dis.* 2006;15(6):823-9.
14. Konertz W, Dohmen PM, Liu J, Beholz S, Dushe S, Posner S, et al. Hemodynamics characteristics of the Matrix P decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation. *J Heart Valve Dis.* 2005;14(1):78-81.
15. Navarro FB, Costa FDA, Mulinari LA, Pimentel GK, Roderjan JG, Vieira ED, et al. Avaliação do comportamento biológico de homoenxertos valvares pulmonares descelularizados: estudo experimental em ovinos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2010;25(3):377-87.
16. Costa F, Dohmen P, Vieira E, Lopes SV, Colatusso C, Pereira EWL, et al. Operação de Ross com homoenxertos valvares descelularizados: resultados de médio prazo. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2007;22(4):454-62.

17. Rajani B, Mee RB, Ratliff NB. Evidence for rejection of homograft cardiac valves in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;115(1):111-7.
18. Lopes SAV, Costa FDA, Paula JB, Dhomen P, Phol F, Vilani R, et al. Análise do comportamento biológico de heteroenxertos descelularizados e homoenxertos criopreservados: estudo em ovinos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2009;24(1):15-22.
19. Wicomb WN, Perey R, Portnoy V, Collins GM. The role of reduced glutathione in heart preservation using a polyethylene glycol solution, Cardiosol. *Transplantation.* 1992;54(1):181-2.
20. Bhayana JN, Tan ZT, Bergsland J, Balu D, Singh JK, Hoover EL. Beneficial effects of fluosol-polyethylene glycol cardioplegia on cold, preserved rabbit heart. *Ann Thorac Surg.* 1997;63(2):459-64.
21. Collins GM, Wicomb WN, Levin BS, Verma S, Avery J, Hill JD. Heart preservation solution containing polyethyleneglycol: an immunosuppressive effect? *Lancet.* 1991;338(8771):890-1.
22. Yacoub M, Rasmi NR, Sundt TM, Lund O, Boyland E, Radley-Smith R, et al. Fourteen-year experience with homovital homografts for aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;110(1):186-93.
23. Lund O, Chandrasekaran V, Grocott-Mason R, Eiwidaa H, Mazhar R, Khaghani A, et al. Primary aortic valve replacement with allografts over twenty-five years: valve-related and procedure-related determinants of outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117(1):77-90.
24. Burman SO. Heterologous heart valves: past, present, and future. *Ann Thorac Surg.* 1989;48(3 Suppl):S75-6.
25. Gallegos RP, Nockel PJ, Rivard AL, Bianco RW. The current state of in-vivo pre-clinical animal models for heart valve evaluation. *J Heart Valve Dis.* 2005;14(3):423-32.
26. Hazekamp MG, Koolbergen DR, Braun J, Sugihara H, Cornelisse CJ, Goffin YA, et al. In situ hybridization: a new technique to determine the origin of fibroblasts in cryopreserved aortic homograft valve explants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;110(1):248-57.