

Substituição do tronco da artéria pulmonar em carneiros utilizando heteroenxerto tubular valvado com preservação não-aldeídica

Replacement of pulmonary artery trunk in sheep using tubular valved heterograft in non-aldehydic preservation

Helmton José Brito de Souza¹, José Honório de Almeida Palma², Ivan Sérgio Joviano Casagrande³, Sérgio Campos Christo⁴, Luiz Sérgio Alves-Silva⁵, Marco Antônio Cardoso de Almeida⁶, Diego Felipe Gaia⁷, Enio Buffolo⁸

DOI: 10.5935/1678-9741.20120071

RBCCV 44205-1402

Resumo

Introdução: As biopróteses valvares cardíacas estão relacionadas a eventos tromboembólicos, infecciosos e degenerativos. Seu desgaste é atribuído principalmente à desnaturação do colágeno. O glutaraldeído, método predominante de preservação de biopróteses, favorece o processo de calcificação e limita sua durabilidade. Diversas técnicas tentam conter o processo degenerativo das biopróteses.

Objetivo: Avaliar o processo de calcificação, *in vivo*, de heteroenxertos pulmonares valvados, preservados em meio não-aldeídico (L-Hydro®).

Métodos: Dezesete carneiros foram submetidos à substituição do tronco da artéria pulmonar por enxerto

tubular valvado de pericárdio bovino. Os animais foram distribuídos em dois grupos: Grupo L-Hydro® (teste / n=14) e Grupo Glutaraldeído (controle / n=3). Cerca de 150 dias pós-implante os animais foram sacrificados, necropsiados e as próteses submetidas a estudo anatomopatológico, avaliação radiológica e dosagem do cálcio por espectrofotometria de absorção atômica. A análise estatística foi obtida por meio dos testes exato de Fisher, T de Student ou Mann-Whitney (significância: 5%).

Resultados: A avaliação radiológica, macroscopia, microscopia e dosagem de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica demonstraram maior calcificação nas próteses do Grupo Glutaraldeído, quando comparadas às próteses do Grupo L-Hydro® (P=0,001). Sete animais do

1. Doutor em Cirurgia Cardiovascular, cirurgião, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.
2. Livre Docente, Doutor em Medicina, Professor Adjunto da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.
3. Cirurgião cardiovascular, Labcor Laboratório, Belo Horizonte, MG, Brasil.
4. Cirurgião cardiovascular, Labcor Laboratório, Belo Horizonte, MG, Brasil.
5. Cardiologista.
6. Patologista.
7. Doutor em Cirurgia Cardiovascular; Professor Adjunto da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.
8. Professor Titular de Cirurgia Cardiovascular, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.

Trabalho realizado na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil e no Centro de Pesquisa Labcor Laboratório, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Suporte financeiro: Labcor Laboratório - Financiamento Parcial do Estudo Experimental.

Endereço para correspondência:
Helmton José Brito de Souza
Rua Napoleão de Barros, 715 – 3º andar – São Paulo, SP, Brasil –
CEP: 04024-002
E-mail: helmton@uol.com.br

Artigo recebido em 29 de janeiro de 2012
Artigo aprovado em 25 de junho de 2012

Abreviaturas, acrônimos e símbolos

PEG	Poli(et)ilenoglicol
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

Grupo L-Hydro® (50%) apresentaram aderência das cúspides à parede do tubo ($P=0,228$).

Conclusões: As próteses preservadas em L-Hydro® demonstraram-se mais resistentes à calcificação, quando comparadas às preservadas em glutaraldeído.

Descritores: Bioprótese. Glutaral. Polietilenoglicóis. Próteses valvulares cardíacas. Doenças das valvas cardíacas/cirurgia.

Abstract

Introduction: The cardiac bioprostheses are related to thromboembolic events, infectious and degenerative diseases. Wear is mainly attributed to the denaturation of collagen. Glutaraldehyde, the predominant method of preservation of bioprostheses, favors the calcification process and limits their durability. Several techniques try to contain the degenerative process of bioprostheses.

INTRODUÇÃO

Pacientes portadores de valvulopatia cardíaca, quando indicado o tratamento cirúrgico, convivem com um importante e delicado problema – a escolha do substituto valvar. Os substitutos valvares existentes, entretanto, possuem limitações significativas. Pelo fato de serem tecidos estranhos ao organismo humano, as próteses valvares estão associadas aos riscos de complicações tromboembólicas, degenerativas e infecciosas [1].

Enquanto as próteses mecânicas, altamente trombogênicas, requerem terapia anticoagulante de longa duração, as próteses biológicas, sejam elas criopreservadas ou fixadas em glutaraldeído, apresentam limitação de durabilidade com disfunção progressiva causada principalmente pela degeneração tecidual. A degeneração das biopróteses valvares continua a figurar dentre os principais problemas envolvendo o tratamento de pacientes portadores de cardiopatias valvares. A busca pela confecção de substitutos valvares através de tecidos orgânicos tem sido alvo do estudo de vários autores ao longo dos últimos 60 anos [2-8].

Na tentativa de reduzir o ritmo de desgaste e, conseqüentemente, prolongar a vida útil das próteses biológicas, algumas técnicas de preservação têm sido propostas com o objetivo de reduzir o processo de calcificação [9-15].

Objectives: To evaluate the process of calcification in vivo pulmonary valve heterografts preserved in non-aldehydic (L-Hydro®).

Methods: Seventeen sheep underwent replacement of the pulmonary artery valved tubular grafts of bovine pericardium. The animals were divided into two groups: Group L-Hydro® (test / n = 14) and Group Glutaraldehyde (control / n = 3). About 150 days after implantation the animals were sacrificed, necropsied and implants subjected to a pathological study, radiological evaluation and measurement of calcium by atomic absorption spectrophotometry. Statistical analysis was obtained through the Fisher's exact test, Student's t or Mann-Whitney test (significance: 5%).

Results: The radiological evaluation, the macroscopic and microscopic measurement of serum calcium by atomic absorption spectrophotometry showed increased calcification of the prosthetic group Glutaraldehyde, when compared to denture-HydroR Group L ($P=0.001$). Seven animals in Group L-Hydro® (50%) had adherence of the leaflets to the wall of the tube ($P=0.228$).

Conclusions: Prostheses preserved in L-Hydro® were more resistant to calcification when compared with glutaraldehyde preserved.

Descriptors: Bioprosthesis. Glutaral. Polyethylene glycols. Heart valve prosthesis. Heart valve diseases/surgery.

As biopróteses valvares, comumente, são preservadas em glutaraldeído. Esse método está associado à maior agregação de fibrina, macrófagos, cálcio e material trombótico à superfície da prótese [16,17]. O glutaraldeído contido na superfície do tecido protético é citotóxico. A principal desvantagem da fixação das biopróteses em glutaraldeído é a conseqüente calcificação dos tecidos ao longo do tempo [1,16,17], o que favorece a disfunção e a necessidade de substituição cirúrgica da prótese.

O desafio atual de engenharia tecidual é estudar e propor a criação de substitutos teciduais e valvares cardíacos a partir de estruturas artificiais e biológicas que sejam biocompatíveis, não-trombogênicas, não-teratogênicas, duráveis e que possibilitem o acompanhamento do crescimento do hospedeiro [18-20]. Teoricamente, a alternativa seria a utilização de próteses que, tratadas, permitissem a epitelização espontânea com células do hospedeiro [21].

Em 2005, Nina et al. [22] e, em 2007, Santos et al. [23] testaram o método de preservação em L-Hydro® (polietilenoglicol - PEG). Os dois primeiros compararam próteses preservadas por esse método com biopróteses preservadas em glutaraldeído, implantadas em posição mitral e aórtica, respectivamente, de carneiros jovens. As próteses tratadas convencionalmente, em glutaraldeído,

apresentaram calcificação macroscópica e microscópica, além de deposição de material trombótico. Já aquelas preservadas em L-Hydro® apresentavam reendotelização espontânea por células do hospedeiro, conferindo maior resistência à calcificação e à trombogenicidade. Em 2011, Rey et al. [24] compararam morfológica e funcionalmente, homoenxertos pulmonares preservados pelo método L-Hydro®, com homoenxertos a fresco, implantados em carneiros jovens, e avaliados após um período de 320 dias. Os autores concluíram que homoenxerto tratado pelo método L-Hydro® apresentou evidência histológica de repopulação celular intersticial e endotelial. Recentemente, Furlanetto et al. [25] demonstraram que xenoenxerto valvado pulmonar porcino, com preservação L-Hydro®, colocado em posição pulmonar de carneiros recém-nascidos e acompanhados até a fase adulta, apresentavam crescimento do enxerto, ausência de calcificação e preservação da função valvar pulmonar.

Nesse contexto, o presente estudo avança na avaliação do processo de endotelização espontânea dos substitutivos valvares, dessa vez, testando o desempenho do modelo de preservação em polietilenoglicol (L-Hydro®) em próteses tubulares valvadas, implantadas no tronco da artéria pulmonar de carneiros.

O objetivo deste estudo é avaliar os processos de degeneração estrutural, *in vivo*, de heteroenxertos pulmonares valvados, preservados em L-Hydro® e implantados em ovinos, com período mínimo de observação de cinco meses.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Quatorze animais receberam o implante da bioprótese a ser testada (L-Hydro®) - Grupo L-Hydro® (teste). Três animais receberam o implante da bioprótese controle, preservada em glutaraldeído - Grupo Glutaraldeído (controle). As mortes que ocorreram antes de 24 horas de pós-operatório foram consideradas mortes cirúrgicas e os animais foram excluídos do estudo, sendo incluídos animais adicionais. Os animais que morreram antes da data prevista para o sacrifício foram examinados e submetidos à necropsia.

A prótese utilizada consiste em um retalho de pericárdio bovino corrugado, tratado pelo processo L-Hydro®. O fechamento do tubo é feito com dois planos de sutura. Uma válvula, confeccionada de pericárdio porcino, com tratamento em L-Hydro®, é fixada no interior do tubo. Uma vez montado, o tubo é testado quanto à competência da válvula e verificada a não existência de vazamentos. Aprovada, a prótese é esterilizada em solução de peróxido de hidrogênio e etanol e, posteriormente, embalada em solução de etanol a 50%. Teste de esterilidade é feito por

meio de amostras incubadas em meios de cultura FTM, Middlebrook e STB durante 14 dias. Comprovada a esterilidade, a prótese é liberada. A técnica de preservação em L-Hydro® consiste de três etapas distintas: 1ª Etapa: Extração dos antígenos e oxidação química dos antígenos remanescentes com polietilenoglicol; 2ª Etapa: Esterilização em peróxido de hidrogênio; 3ª Etapa: Estoque das próteses em solução de etanol a 50%.

Os animais foram deixados em jejum 24 horas antes da cirurgia. A indução anestésica foi feita com tiopental, via intravenosa. O animal foi intubado, colocado em ventilação mecânica, passada sonda nasogástrica, monitorização eletrocardiográfica e tricotomia torácica esquerda. A partir de uma toracotomia esquerda no quarto espaço intercostal, o pulmão esquerdo foi afastado, feita a abertura do saco pericárdico e a dissecação do tronco pulmonar. Após heparinização, foi realizada a canulação da aorta ascendente e da aurícula direita com o estabelecimento da circulação extracorpórea com hemodiluição total, normotermia e sem pinçamento aórtico.

Após a secção completa do tronco pulmonar, os folhetos nativos da válvula pulmonar foram retirados. Um segmento do enxerto de aproximadamente 4 cm, contendo as cúspides foi anastomosado à porção proximal na via de saída do ventrículo direito e na porção do tronco pulmonar relacionada com a bifurcação, com sutura contínua, com fio polipropileno 5-0. Após a hemostasia, a circulação extracorpórea foi interrompida. Após reposição de todo o volume sanguíneo, foram retiradas as cânulas e administrado cloridrato de protamina. Um dreno torácico foi colocado, o pericárdio aproximado e a incisão torácica fechada. O dreno foi retirado quando o animal passava a respirar espontaneamente. Os animais foram deixados em observação por sete dias e, após esse período, transferidos ao biotério de pós-operatório, onde continuava a ser observado e avaliado diariamente durante o período pré-determinado de 150 dias, ou enquanto sobrevivesse. Avaliação hematológica e bioquímica do sangue foi realizada no 7º e 90º dia de pós-operatório, e no dia do sacrifício.

Após o sacrifício com injeção de cloreto de potássio, as próteses foram explantadas e submetidas à avaliação macroscópica. Após fixação em formaldeído a 10%, o estudo histológico foi realizado para avaliar a deposição de cálcio e material trombótico na superfície das próteses. As biopróteses foram cortadas, desidratadas em álcool, embebidas em parafina e seccionadas em fragmentos de quatro micrômetros e, então, tratadas com hematoxilina-eosina para avaliação de depósitos de cálcio. As lâminas foram observadas em microscópio óptico, por patologista, sem que este soubesse o grupo que estaria analisando (avaliação "cega"). Tanto na avaliação macroscópica quanto microscópica, o grau de calcificação foi quantificado

(avaliação semiquantitativa) pelo exame anatomopatológico, considerando a graduação: 0- calcificação inexistente; 1- calcificação leve; 2- calcificação moderada; 3- calcificação importante.

As necropsias foram realizadas em todos os casos. Foram coletadas amostras para bacteriologia com *swabs*. As amostras foram submetidas ao estudo radiológico para determinação da distribuição e intensidade dos depósitos de cálcio nos folhetos valvulares, bem como no tubo, sendo utilizado um mamógrafo Senographe DMR (GE, Buc. França). O grau de calcificação foi classificado de zero a três (0 a 3). Fragmentos do tubo e das cúspides foram desidratados em estufa a 50°C e mineralizados em forno de Mufla a 800°C, dissolvidas em ácido nítrico (HNO₃ - 2,5M), determinado-se a quantidade de cálcio (expressa em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido seco) pelo método da espectrofotometria de absorção atômica, através do espectrofotômetro Perkin Elmer de 1,000 mg/L com adição de cloreto de lantânio a 1% [27].

Todos os dados categóricos estão expressos em proporções, enquanto que as variáveis quantitativas estão expressas em média \pm desvio padrão. Foram construídos histogramas para avaliar a distribuição normal dos dados quantitativos. Optou-se por utilizar o teste exato de Fisher para comparar as frequências observadas no Grupo L-

Hydro® (grupo teste) com as frequências observadas no Grupo Glutaraldeído (grupo controle). Para comparar os dados quantitativos entre os grupos (casos *versus* controles), escolheu-se o teste T de Student ou o teste de Mann-Whitney, quando apropriado. O nível de significância foi pré-estabelecido em 5%. O *software* utilizado foi o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

RESULTADOS

Dezenove animais foram submetidos ao procedimento de substituição do tronco pulmonar por enxerto tubular valvado. A mortalidade operatória foi de 10,53% (dois animais). A causa da mortalidade foi choque hipovolêmico secundário a sangramento intraoperatório. Os dezessete animais restantes foram incluídos no estudo. O Quadro 1 resume as informações relacionadas ao estudo.

No Grupo L-Hydro®, dois animais morreram antes do sacrifício. O primeiro, no 86º dia de pós-operatório, teve como causa *mortis* endocardite, confirmada por necropsia. O segundo animal foi encontrado morto no 165º dia de pós-operatório, enquanto aguardava o sacrifício. Necropsia não mostrou evidência de endocardite. Havia, entretanto, sinais de infecção respiratória no pulmão direito (congestão e edema).

Quadro 1. Dados cirúrgicos.

	Gênero	Peso (kg)	Idade (meses)	Cec (min)	Sobrevida (dias)	Tamanho Prótese	Status
Grupo L-Hydro®							
1	F	34	8,13	76	165	17	Óbito
2	M	30	7,93	93	197	17	Sacrificado
3	F	35	6,77	79	194	17	Sacrificado
4	M	30	6,13	76	151	17	Sacrificado
5	M	27	6,20	62	168	15	Sacrificado
6	M	30	7,37	100	174	17	Sacrificado
7	M	35	6,73	49	162	17	Sacrificado
8	M	35	6,73	71	162	17	Sacrificado
9	M	33	6,60	48	86	17	Óbito
10	M	33	6,67	28	161	17	Sacrificado
11	M	32	6,77	34	161	17	Sacrificado
12	M	32	6,77	30	162	17	Sacrificado
16	F	30	7,67	39	154	19	Sacrificado
17	M	28	8,33	35	154	19	Sacrificado
	Gênero	Peso (kg)	Idade (meses)	Cec (min)	Sobrevida (dias)	Tamanho Prótese	Status
Grupo Glutaraldeído							
13	M	35	6,30	38	161	17	Sacrificado
14	M	33	6,30	30	161	17	Sacrificado
15	M	33	6,50	25	161	17	Sacrificado

M = masculino, F = feminino

A detecção de calcificação, pela técnica mamográfica, das próteses preservadas em L-Hydro®, limitou-se à zona de costura da prótese (Figura 1). Já nas próteses preservadas em glutaraldeído, essa calcificação ocorreu em todas as próteses e se estendeu à parede do tubo e das cúspides valvares (Figura 2). O caso 13 apresentou calcificação moderada (grau 2) e os casos 14 e 15, calcificação importante (grau 3) - (Tabela 1).

A análise estatística revelou diferença significativa ($P = 0,001$) na comparação entre os Grupos L-Hydro® e Glutaraldeído, conforme demonstrado na Tabela 2.

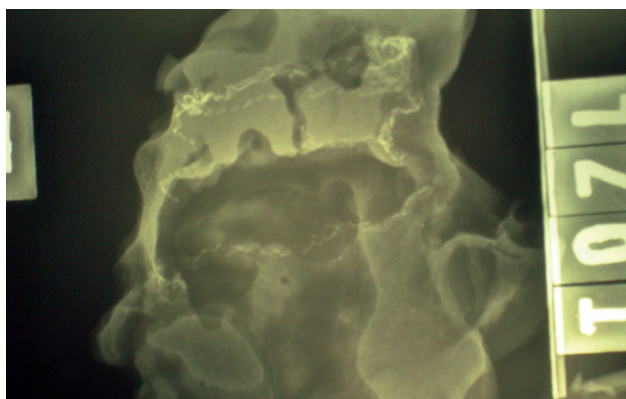


Fig. 1 - Aspecto radiológico de prótese preservada em L-Hydro® (ausência de calcificação)

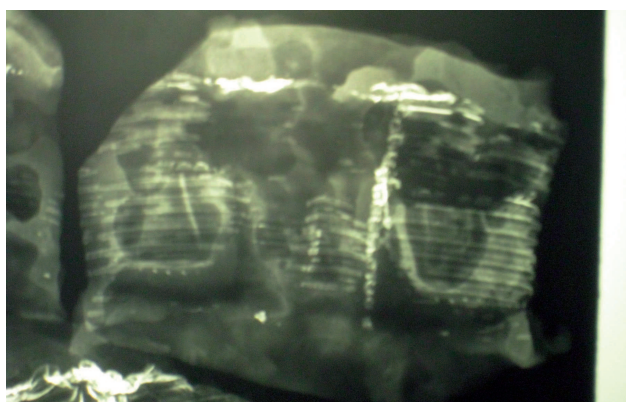


Fig. 2 - Aspecto radiológico de prótese preservada em glutaraldeído (calcificação difusa)

Tabela 1. Mensuração de calcificação: 0- Ausência de calcificação; 1- Calcificação leve; 2- Calcificação moderada; 3- Calcificação importante.

Grupo L-Hydro®	Calcificação de folheto mamografia	Calcificação do tubo mamografia
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
16	0	0
17	0	0
Grupo Glutaraldeído	Calcificação de folheto mamografia	Calcificação do tubo mamografia
13	2	2
14	3	3
15	3	3

A avaliação macroscópica das próteses foi realizada em todos os animais. Em quatro animais (L-Hydro®), foi observada a presença de vegetação compatível com endocardite. Um desses animais foi encontrado morto no 86º dia de pós-operatório. Apesar disso, não houve crescimento bacteriano que confirmasse a impressão macroscópica. Todas as próteses do Grupo Glutaraldeído mostravam calcificação macroscópica dos folhetos e do tubo. Em duas destas próteses, a calcificação foi quantificada como importante. Já dentre as próteses do Grupo L-Hydro®, duas (14,3%) demonstravam calcificação quantificada como leve, do tubo. Apenas em um dos folhetos de uma das próteses foi verificada a presença de calcificação, quantificada como leve (Tabela 3).

Outro achado verificado na avaliação macroscópica foi a aderência parcial ou total dos folhetos à parede do tubo (Figura 3). Isso ocorreu em sete (50%) animais, todos do Grupo L-Hydro®. Em três (21,4%) animais, todos os folhetos da prótese estavam aderidos à parede do tubo.

Tabela 2. Análise estatística mamografia (Grupos L-Hydro® e Glutaraldeído).

Variável*	Grupo L-Hydro® (n=14)	Grupo Glutaraldeído (n=3)	Valor de P^{\dagger}
Calcificação (moderada/importante) dos folhetos (mamografia)	—	3 (100%)	0,001
Calcificação (moderada/importante) do tubo (mamografia)	—	3 (100%)	0,001

Tabela 3. Mensuração de calcificação: 0- ausência de calcificação; 1- calcificação leve; 2- calcificação moderada; 3- calcificação importante. Avaliação de aderência de folhetos.

Grupo L-Hydro®	Calcificação de folheto	Calcificação do tubo	Aderência de folheto(s) - (N)
1	0	0	3
2	0	1	0
3	0	0	0
4	0	0	2
5	1	0	0
6	0	1	0
7	0	0	1
8	0	0	1
9	0	0	3
10	0	0	0
11	0	0	3
12	0	0	2
16	0	0	0
17	0	0	0
Grupo Glutaraldeído	Calcificação de folheto	Calcificação do tubo	Aderência de folheto(s) - (N)
13	2	2	0
14	3	3	0
15	3	3	0

(N = número de folhetos aderidos)

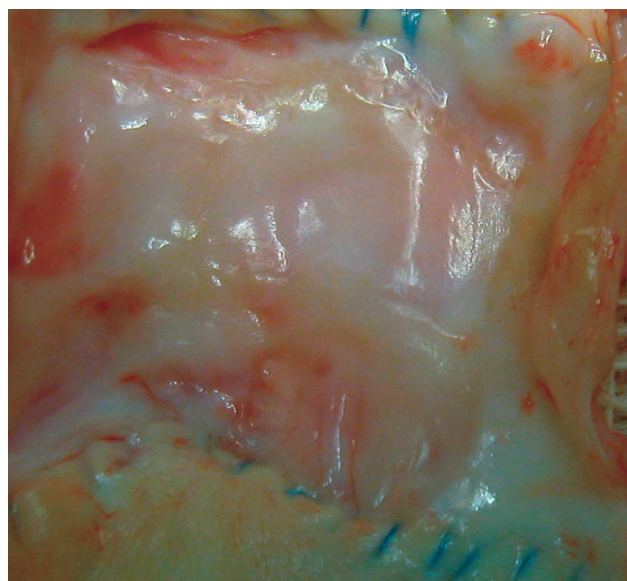


Fig. 3 - Aspecto macroscópico pós-explante. Aderência total das cúspides à parede do tubo (Grupo L-Hydro®)

Dois (14,3%) animais apresentavam um dos folhetos aderidos e em outros dois (14,3%) animais, dois folhetos encontravam-se aderidos à parede do tubo. Não havia sinais de aderência de folhetos à parede do tubo nos animais do Grupo Glutaraldeído.

Nas variáveis calcificação de tubos e calcificação de folhetos houve significância ($P=0,001$) na comparação entre os Grupos L-Hydro® e Glutaraldeído. Já na variável aderência de folhetos, essa diferença estatística não foi observada ($P=0,228$), conforme demonstrado na Tabela 4.

A avaliação microscópica foi realizada em 16 animais, sendo 13 do Grupo L-Hydro® e três do Grupo Glutaraldeído (Tabela 5). A coloração pelo método hematoxilina-eosina demonstrou sinais de calcificação nas cúspides de sete dos 13 animais do Grupo L-Hydro® (53,8%), bem como no tubo de dez dos 13 animais desse mesmo grupo (77%). Essa calcificação, entretanto, foi quantificada como leve em todos os casos. Nenhum animal do Grupo L-Hydro® teve calcificação moderada ou importante de suas cúspides ou tubo (Figura 4).

Tabela 4. Análise estatística da macroscopia (Grupos L-Hydro® e Glutaraldeído).

Variável*	Grupo L-Hydro® (n=14)	Grupo Glutaraldeído (n=3)	Valor de P^{\dagger}
Calcificação (moderada/importante) das cúspides (macroscopia)	—	3 (100%)	0,001
Calcificação (moderada/importante) do tubo (macroscopia)	—	3 (100%)	0,001
Aderência dos folhetos (microscopia)	7 (50%)	—	0,228

A avaliação microscópica dos animais do Grupo Glutaraldeído demonstrou calcificação importante de todas as cúspides e fragmentos de tubo avaliados. A microscopia revelou, ainda, processo inflamatório macrofágico com depósitos fibrinoides e ausência de trombos ou coágulos nas amostras analisadas de ambos os grupos (Figura 5).

A análise estatística dos resultados demonstra diferença significativa ($P=0,001$) nas variáveis calcificação de cúspides e de tubo na comparação entre os Grupos L-Hydro® e

Glutaraldeído (Tabela 6).

A dosagem de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica demonstrou maior concentração de cálcio nas próteses preservadas em glutaraldeído, quando comparadas àquelas preservadas em L-Hydro®. A análise estatística dos dados demonstrou diferença significativa quanto à dosagem de cálcio, quando comparados os Grupo L-Hydro® e Glutaraldeído ($P= 0,017$). A Tabela 7 demonstra os valores obtidos a partir dessa técnica.

Tabela 5. Mensuração de calcificação: 0- ausência de calcificação; 1- calcificação leve; 2- calcificação moderada; 3- calcificação importante.

Grupo L-Hydro®	Calcificação do folheto	Calcificação do tubo
1	NA	NA
2	1	1
3	1	1
4	0	0
5	1	1
6	0	1
7	0	1
8	0	0
9	1	1
10	0	1
11	1	1
12	1	1
16	1	1
17	0	0
Grupo Glutaraldeído	Calcificação do folheto	Calcificação do tubo
13	3	3
14	3	3
15	3	3

NA = Não avaliada

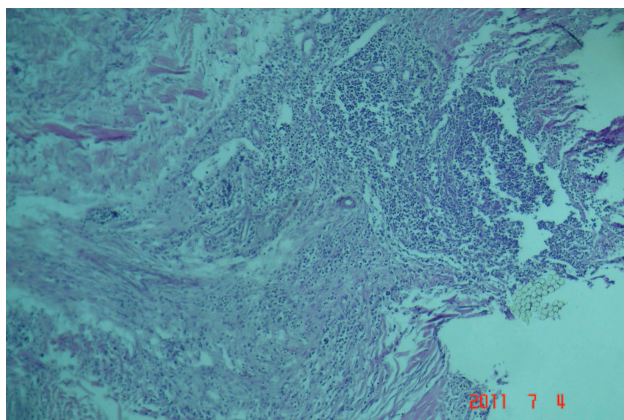


Fig. 5 - Aspecto microscópico (microscopia ótica) das próteses preservadas em glutaraldeído. Coloração em hematoxilina-eosina. Em lilás, regiões de calcificação difusa e grave

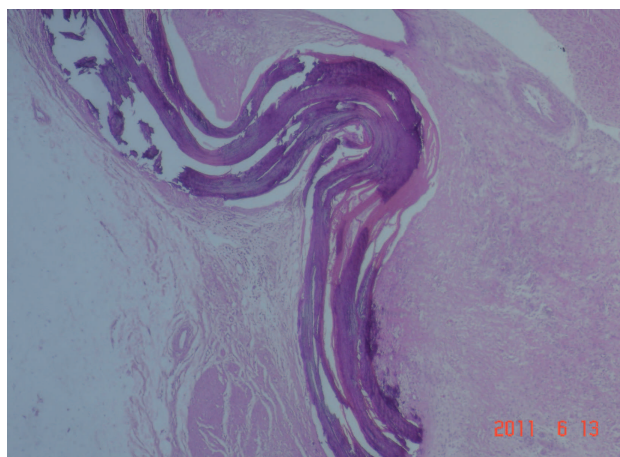


Fig. 4 - Aspecto microscópico das próteses preservadas em L-Hydro®. Coloração em hematoxilina-eosina. Em lilás, os pontos isolados de calcificação

Tabela 6. Análise estatística microscopia (Grupos L-Hydro® e Glutaraldeído).

Variável*	Grupo L-Hydro® (n=14)	Grupo Glutaraldeído (n=3)	Valor de P†
Calcificação (moderada/ importante) das cúspides (microscopia)	--	3 (100%)	0,001
Calcificação (moderada/ importante) do tubo (microscopia)	--	3 (100%)	0,001

Tabela 7. Dosagem de cálcio (ig/mg) por espectrofotometria de absorção atômica.

Grupo L-Hydro®	Absorção Atômica
1	43,84
2	139,44
3	48,7
4	14,2
5	25,7
6	240,9
7	206,6
8	98,3
9	58,39
10	53,76
11	38,97
12	22,4
16	64,04
17	50,01
Grupo Glutaraldeído	Absorção Atômica
13	318,3
14	193,32
15	720,3

DISCUSSÃO

O implante de próteses valvares biológicas que permitam e promovam o revestimento espontâneo com células do hospedeiro foi proposto por Frater et al. [21] e é o princípio que embasou o desenvolvimento da preservação em L-Hydro®, utilizada neste estudo. No presente estudo, utilizou-se como agente de preservação o L-Hydro® em tubo valvado de pericárdio bovino, implantado na via de saída do ventrículo direito de carneiros. Esses animais têm sido utilizados por diversos autores e possuem a característica de serem dóceis e permitirem o fácil manejo durante todo o período de teste. Por se tratar de animal de grande porte e por possuir crescimento e desenvolvimento rápido, as alterações fisiopatológicas se assemelham àquelas que ocorrem no homem durante a vida. O tempo de, pelo menos 150 dias, foi necessário para que o carneiro apresentasse seu desenvolvimento pôndero-estatural adequado compatível com a vida adulta [26], podendo-se constatar ou não a ocorrência de calcificação, assim como analisar, nesse tipo de bioprótese, o desempenho hemodinâmico da mesma, tanto quanto seu desgaste.

A exemplo dos estudos de Nina et al. [22], em 2003, Santos et al. [23], em 2007, e Rey et al. [24], em 2011, a avaliação radiológica, no presente estudo, demonstrou diferença significativa na verificação de calcificação das próteses que tiveram preservação em L-Hydro®, em comparação àquelas que foram preservadas em glutaraldeído. Essas últimas com maior grau de calcificação. Do mesmo modo, a exemplo desses estudos, as avaliações macroscópica e microscópica demonstraram maior grau de calcificação nas biopróteses

preservadas em glutaraldeído. Em relação à microscopia, os resultados demonstram maior calcificação das próteses preservadas em glutaraldeído, assim como os estudos de Nina et al. [22] e Santos et al. [23]. No caso das próteses preservadas em L-Hydro®, Nina et al. [22] constataram, com a utilização da microscopia eletrônica de varredura, a formação de um novo endotélio, resistente à insudação de proteínas plasmáticas e sais, que são precursoras da degeneração bioprotética. Em suas observações, Nina et al. [22] concluíram que a ausência de toxicidade, característica da preservação em L-Hydro®, permitiu que a matriz das próteses do grupo teste se tornasse biocompatível, possibilitando a reendotelização espontânea, favorecendo maior resistência à calcificação e trombogenicidade.

Com o uso da microscopia eletrônica de varredura e da microscopia eletrônica de transmissão, Rey et al. [24] demonstraram evidência histológica de repopulação intersticial e endotelial, na superfície de homoenxertos preservados em L-Hydro®, implantados em carneiros. É atribuída ao PEG a propriedade imunossupressora, na qual se fundamenta a preservação L-Hydro®. Conforme demonstrado por Collins et al. [11], em 1991, antígenos que se combinam com o PEG apresentam redução da antigenicidade. Wicomb et al. [15], em 1992, demonstraram a reduzida toxicidade do PEG, quando adicionaram essa substância à solução de preservação miocárdica, garantindo viabilidade ao órgão por tempo mais prolongado, quando comparadas às soluções cardioplégicas convencionais.

Constatou-se a ocorrência de aderência de parte ou de todas as cúspides das próteses do Grupo L-Hydro® (sete animais), em comparação ao Grupo Glutaraldeído, onde esse evento não foi verificado. Uma possível explicação para tal aderência é o fato das biopróteses preservadas em L-Hydro® terem, desde sua preparação, uma característica menos espessa e mais flexível, se comparadas às próteses preservadas em glutaraldeído. Sendo a via de saída do ventrículo direito uma zona de baixa pressão, as cúspides mais flexíveis estariam suscetíveis a aderirem à parede do tubo. A alteração do desenho da prótese com a confecção de seios imediatamente acima do plano valvar poderia, talvez, reduzir a incidência das aderências.

Nesse sentido, estudos posteriores, testando esse novo modelo de prótese, permitiriam a avaliação do seu desempenho. Rey et al. [24], em estudo experimental com homoenxertos preservados em L-Hydro®, encontraram, a partir da microscopia óptica, cúspides pouco retraídas, com adelgaçamento progressivo em direção à borda livre. A espectrofotometria por absorção atômica, assim como as avaliações macro e microscópica, demonstrou maiores concentrações de cálcio nas próteses do Grupo Glutaraldeído. Houve diferença estatisticamente significativa, o que comprova a viabilidade na avaliação de cálcio por esse método [27].

O presente estudo apresenta como limitação a impossibilidade de reproduzir o efeito da doença cardíaca e o perfil de coagulação comparável ao do homem, a exemplo de outros que utilizaram animais de grande porte na avaliação de novas tecnologias de preservação ou substituição de tecidos cardíacos [5,17]. Ademais, os modelos animais, apesar da anatomia semelhante à humana, possuem antigenicidade diferente, o que pode levar a resultados não reprodutíveis quando do uso clínico [12].

No presente estudo, a substituição do tronco pulmonar por enxerto tubular valvado com preservação em L-Hydro® mostrou-se adequada para avaliação como modelo experimental, já que permite analogia ao que possa ocorrer com a espécie humana. A preservação com L-Hydro® indicou redução significativa da calcificação no tubo e nas cúspides da bioprótese utilizada. Novas avaliações de desempenho deverão ser realizadas, a partir deste estudo, visando à observação e à aplicabilidade clínica. A comprovação quanto à existência e viabilidade de repopulação tecidual e intersticial poderá ser obtida em estudos complementares.

CONCLUSÃO

As próteses preservadas em L-Hydro® (não-aldeídicas) mostraram-se mais resistente ao processo de degeneração tecidual, especialmente à calcificação, quando comparadas àquelas preservadas em glutaraldeído.

REFERÊNCIAS

1. Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM, et al. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation*. 2000;102(19 Suppl 3):III22-9.
2. Barratt-Boyes BG. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax*. 1964;19:131-50.
3. Buffolo E. Substituição da válvula aórtica ou mitral por válvula aórtica homóloga montada em suporte [Tese de doutoramento]. São Paulo:Escola Paulista de Medicina;1973.
4. Fischlein T, Fasol R. In vitro endothelialization of bioprosthetic heart valves. *J Heart Valve Dis*. 1996;5(1):58-65.
5. Schoen FJ. Future directions in tissue heart valves: impact of recent insights from biology and pathology. *J Heart Valve Dis*. 1999;8(4):350-8.
6. Palma JHF. Substituição da válvula mitral por válvula aórtica homóloga montada em suporte e conservada em glutaraldeído [Dissertação de mestrado]. São Paulo:Escola Paulista de Medicina;1988.
7. Puig LB, Verginelli G. Válvulas cardíacas de dura-máter homóloga. Nota prévia. *Rev Paul Med*. 1971;78(1):3335.
8. Puig LB, Verginelli G, Belotti G, Kawabe L, Frack CC, Pileggi F, et al. Homologous dura mater cardiac valve. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1972;64(1):154-60.
9. 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.
10. Carpentier A, Deloche A, Relland J, Fabiani JN, Forman J, Camilleri JP, et al. Six-year follow-up of glutaraldehyde-preserved heterografts. With particular reference to the treatment of congenital valve malformations. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1974;68(5):771-82.
11. 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.
12. 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.
13. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg*. 2005;79(3):1072-80.
14. Vesely I, Barber JE, Ratliff NB. Tissue damage and calcification may be independent mechanisms of bioprosthetic heart valve failure. *J Heart Valve Dis*. 2001;10(4):471-7.
15. 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.
16. Grabenwöger M, Sider J, Fitzal F, Zelenka CJ, Windberger U, Grimm M, et al. Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material. *Ann Thorac Surg*. 1996;62(3):772-7.
17. Levy RJ. Glutaraldehyde and the calcification mechanism of bioprosthetic heart valves. *J Heart Valve Dis*. 1994;3(1):101-4.
18. Cebotari S, Tudorache I, Schilling T, Haverich A. Heart valve and myocardial tissue engineering. *Herz*. 2010;35(5):334-41.
19. Sacks MS, Schoen FJ, Mayer JE. Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*. 2009;11:289-313.

-
20. Knight RL, Wilcox HE, Korossis SA, Fisher J, Ingham E. The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves. *Proc Inst Mech Eng H*. 2008;222(1):129-43.
 21. Frater RW, Gong G, Hoffman D, Liao K. Endothelial covering of biological artificial heart valves. *Ann Thorac Surg*. 1992;53(3):371-2.
 22. Nina VJ, Pomerantzeff PM, Casagrande IS, Cheung DT, Brandão CM, Oliveira SA. Comparative study of the L-hydro process and glutaraldehyde preservation. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2005;13(3):203-7.
 23. Santos PC, Gerola LR, Casagrande I, Buffolo E, Cheung DT. Stentless valves treated by the L-hydro process in the aortic position in sheep. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2007;15(5):413-7.
 24. Rey NA, Moreira LFP, Cheung DT, Casagrande ISJ, Benvenuti LA, Stolf NAG. Estudo experimental comparativo do enxerto homólogo pulmonar tratado pelo processo L-Hydro com homoenxerto pulmonar a fresco. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2011;26(2):282-90.
 25. Furlanetto G, Passerino CH, Siegel R, Chueng DT, Levitsky S, Casagrande IS. Biointegration and growth of porcine valved pulmonary conduits in a sheep model. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2009;7(4):350-6.
 26. Grehan JF, Casagrande I, Oliveira EL, Santos PC, Pessa CJ, Gerola LR, et al. A juvenile sheep model for the long-term evaluation of stentless bioprostheses implanted as aortic root replacements. *J Heart Valve Dis*. 2001;10(4):505-12.
 27. Baucia JA, Leal Neto RM, Rogero JR, Nascimento N. Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído: comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2006;21(2):180-7.