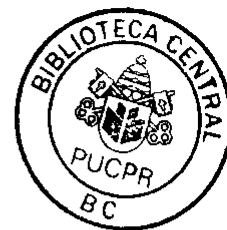


SERGIO AUGUSTO VEIGA LOPES



**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE HETEROENXERTOS
PULMONARES PORCINOS DESCELULARIZADOS E HOMOENXERTOS
CRIOPRESERVADOS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM OVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina.

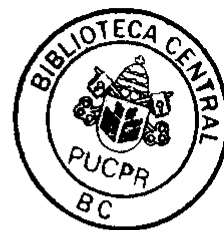
Orientador: Prof. Josué Bruginski de Paula

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa

CURITIBA

2005

SERGIO AUGUSTO VEIGA LOPES



**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE
HETEROENXERTOS PULMONARES PORCINOS
DESCELULARIZADOS E HOMOENXERTOS
CRIOPRESERVADOS :
ESTUDO EXPERIMENTAL EM OVINOS**

**MESTRADO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
PUCPR**

CURITIBA

2005

L84a
2005

Lopes, Sergio Augusto Veiga
Análise do comportamento biológico de heteroenxertos pulmonares
porcinos descelularizados e homoenxertos criopreservados: estudo
experimental em ovinos / Sergio Augusto Veiga Lopes ; orientador, Josuê
Bruginski de Paula; co-orientador, Francisco Diniz Affonso da Costa. – 2005
xiii, 71 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2005
Inclui bibliografia

1. Cirurgia. 2. Coração – Cirurgia. 3. Ovino. 4. Modelos animais em
pesquisa. I. Paula, Josuê Bruginski de. II. Costa, Francisco Diniz Affonso
da. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-
Graduação em Clínica Cirúrgica. IV. Título.

CDD-20.ed.617
617.412

FOLHA DE APROVAÇÃO

LOPES, Sergio Augusto Veiga

Análise do comportamento biológico de heteroenxertos pulmonares porcinos descelularizados e homoenxertos criopreservados: estudo experimental em ovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de mestre em medicina.

Aprovado em

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

Fernando Pessoa

“À minha esposa Luciane, pelo incentivo, pelo ideal compartilhado e pelo companheirismo; ao meu filho Artur pela inspiração e aos meus pais pelo estímulo à pesquisa.”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa, pela orientação precisa e incentivo na realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Josué Bruginski de Paula pelo apoio e orientação deste trabalho.

Ao Dr. Iseu Elias Affonso da Costa pelo exemplo e incentivo às questões acadêmicas.

Ao Prof. Dr. Pascal Maria Dhomen pelo incentivo às novas tecnologias.

Ao Prof. Felipe Phol de Souza pelo empenho, organização e seriedade na condução do projeto.

Ao Prof. Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani pela dedicação e competência na realização dos procedimentos anestésicos.

Ao Prof. Antônio Felipe Paulino de Figueredo Wolk pela apoio e confiança depositados nesse trabalho.

Ao Prof. Sergio Ossamu Ioshii e pessoal técnico do laboratório de patologia que viabilizaram o preparo e análise do material histológico.

Ao Prof. Marconi Rodrigues de Farias, diretor do Hospital Veterinário pela compreensão e incentivo à produção científica.

À Dra. Lorena Reichert pela disponibilidade e apoio na realização dos exames ecocardiográficos.

Aos colegas Dra. Andréa Dunsh de Aragon Ferreira, Dr. Evandro Antônio Sardetto , Dr. Claudinei Colatusso e Dr. Carlos Henrique Gori Gomes pelo valioso auxílio prestado e compreensão nos momentos de ausência.

Ao Biólogo Eduardo Discher Vieira, pela total dedicação, organização e planejamento operacional em vários aspectos do projeto.

À Bióloga Marise Brenner Affonso da Costa pelo apoio técnico e cooperação junto ao Banco de Homoenxertos.

À Bióloga Ana Paula Camargo Martins do laboratório de Patologia pela dedicação e pelo preparo do material histológico.

À Bióloga Márcia Regina Inácio pelo empenho, dedicação e competência no preparo do material histológico para imunohistoquímica.

Ao Farmacêutico João Gabriel Roderja Vieira pelo apoio técnico e sugestões pertinentes.

À farmacêutica Ângela Maria Peruzzo pela disponibilidade e cooperação na realização do preparo das amostras para a quantificação de cálcio.

Ao Residente de cirurgia veterinária Tiago Sillas pelo importante auxílio nas cirurgias.

A todos os profissionais que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização dessa dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xii
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 OBJETIVOS.....	04
2 REVISÃO DA LITERATURA	05
3 MÉTODO.....	10
3.1 AMOSTRA	11
3.2 PREPARO DO ENXERTO	11
3.2.1 Homoenxertos Criopreservados	11
3.2.2 Heteroenxertos Descelularizados	12
3.3 PRÉ-OPERATORIO	13
3.4 ANESTESIA E PREPARO CIRÚRGICO	14
3.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	15
3.6 PÓS-OPERATÓRIO	16
3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	16
3.8 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO	17
3.8.1 Análise Ecocardiográfica	17
3.8.2 Análise Macroscópica	18
3.8.3 Confecção dos Segmentos Valvares	19
3.8.4 Análise de Cálcio	19
3.8.5 Análise Histológica	20
3.8.6 Análise por Imunohistoquímica	20
3.8.7 Análise Estatística	21
4 RESULTADOS	22
4.1 SEGUIMENTO DA AMOSTRA	23
4.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA	23
4.3 ANÁLISE DO DIÂMETRO VALVAR NO EXPLANTE	25
4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA	26
4.4.1 Dos Condutos Valvares	26
4.4.2 Das Cúspides Valvares	34
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE CÁLCIO	41
4.6 ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA	42
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÕES	54
7 REFERÊNCIAS.....	56
NORMAS ADOTADAS	63
ABSTRACT	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diâmetro das valvas criopreservadas e descelularizadas aferidas no explante	25
Tabela 2 – Quantificação de cálcio das cúspides e condutos das valvas descelularizadas e criopreservadas	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A) Fotografia do homoenxerto pulmonar criopreservado após processo de descongelamento demonstrando o conduto e a camada muscular. B – Fotomicrografia de corte histológico de conduto pulmonar corado com Hematoxilina-Eosina (H.E. 20x)	12
Figura 2 – A) Fotografia de heteroenxerto pulmonar porcino descelularizado após processo de descelularização com ácido deoxicólico, demonstrando o conduto e a camada muscular. B) Fotomicrografia de corte histológico de conduto, pulmonar corado com Hematoxilina-Eosina (H.E. 20x).....	13
Figura 3 – Fotografia demonstrando monitorização do carneiro na sala de cirúrgica	14
Figura 4 – Fotografia demonstrando aspecto final do procedimento cirúrgico de implante do heteroenxerto pulmonar descelularizado na via de saída do ventrículo direito	15
Figura 5 – Fotografia demonstrando explante do homoenxerto pulmonar criopreservado	17
Figura 6 – Fotografia de exame ecocardiográfico demonstrando valva pulmonar descelularizada implantada na via de saída do ventrículo direito no 60º pós-operatório	18
Figura 7 – Fotografia de segmento longitudinal da artéria pulmonar demonstrando cúspide e conduto	19
Figura 8 – Fotografia da superfície interna do enxerto pulmonar criopreservado após o explante	24
Figura 9 – Fotografia de superfície interna de valva pulmonar do Grupo HeteroD explantada com 270 dias	24
Figura 10 – Gráfico representando o aumento do diâmetro das valvas criopreservadas e descelularizadas no explante	25
Figura 11 – Fotomicrografias de corte histológico, coloração H.E., aumento 10x, conduto de artéria pulmonar. A. Conduto de valva do grupo HomoC, observa-se a ausência da estrutura trilaminar valvar e raras células na matriz. B. Conduto da valva do grupo HeteroD, observa-se a presença de células intersticiais predominantemente na adventícia e camada média e estrutura trilaminar valvar preservada.....	27
Figura 12 – Fotomicrografias de corte histológico, coloração Weigert, aumento 10x, conduto de artéria pulmonar. A. Conduto da valva HomoC, observa-se a presença de fibras elásticas rotas. B conduto da valva HeteroD observa-se a presença de fibras elástica íntegras.....	28
Figura 13 – Fotomicrografias de corte histológico, coloração Gomori, aumento 20x, conduto de artéria pulmonar. A. Conduto da valva HomoC, observa-se degeneração das fibras colágenas. B. conduto da valva HeteroD, observa-se fibras colágenas íntegras.....	29

Figura 14 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para CD68, aumento 40X, camada adventícia da artéria pulmonar. A. Conduto valvar HomoC, observa-se raras células mononucleares na adventícia. B. Conduto valvar HeteroD, observa-se presença de <i>vasa-vasorum</i> circundado por células inflamatórias mononucleares.....	30
Figura 15 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para Vimentina, aumento 40x, camada média do conduto da artéria pulmonar. A. Conduto valvar HomoC, observa-se raras células com morfologia para fibroblastos B Conduto valvar HeteroD, observa-se células com morfologia para fibroblastos.....	31
Figura 16 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para CD3, aumento 40x, camada média do conduto. A. Conduto valvar do grupo HomoC, observa-se presença de linfócitos. B Conduto valvar do grupo HeteroD, observa-se raras células linfocitárias.....	32
Figura 17 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para fator VIII, aumento 40x, camada íntima do conduto da artéria pulmonar. A. Conduto valvar do grupo HomoC, evidencia-se células endoteliais dispostas em ilhas. B. Conduto valvar grupo HeteroD, observa-se células endoteliais dispostas em ilhas.....	33
Figura 18 – Fotomicrografias de corte histológico, coloração H.E., aumento de 10x, cúspide da artéria pulmonar. A. Cúspide valvar do grupo HomoC, observa-se presença padrão acelular. B. cúspide valvar do grupo HeteroD observa-se presença de células intersticiais na base do conduto.....	34
Figura 19 – Fotomicrografias de corte histológico, coloração Weigert, aumento 10X, base da cúspide da valva pulmonar. A Cúspide valvar do grupo HomoC, observa-se presença de fibras elásticas rotas, distribuídas na face ventricular da cúspide. B Cúspide valvar do grupo HeteroD, observa-se fibras elásticas íntegras.....	35
Figura 20 – Fotomicrografias de corte histológico, coloração gomori, aumento 10x, cúspide da valva pulmonar. A. Observa-se na cúspide valvar do grupo HomoC a presença de degeneração das fibras colágenas B. Observa-se na cúspide valvar do grupo HeteroD fibras elásticas íntegras	36
Figura 21 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para CD68, aumento 40x, cúspide da valva pulmonar. A. Observa-se na porção média da cúspide valvar do grupo HomoC, presença de macrófagos. B. Observa-se na porção média da cúspide do grupo HeteroD presença de macrófagos	37
Figura 22 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para vimentina, aumento 40x, cúspide de valva pulmonar. A. Observa-se na porção basal da cúspide do grupo HomoC, presença de raros fibroblastos. B. Observa-se na porção basal da cúspide do grupo HeteroD presença de fibroblastos	38

Figura 23 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para CD3, aumento 40x, cúspide da artéria pulmonar. <i>A.</i> Porção média da cúspide valvar do grupo HomoC, observa-se presença de linfócitos. <i>B.</i> Porção distal da cúspide valvar do grupo HeteroD, observa-se presença de linfócitos	39
Figura 24 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para Fator VIII, aumento 40x, camada íntima do conduto da artéria pulmonar. <i>A.</i> Observa-se cúspide valvar do grupo HomoC com presença de células endoteliais dispostas em ilhas. <i>B</i> Observa-se cúspide valvar do grupo HeteroD com presença de células endoteliais dispostas de modo confluyente	40
Figura 25 – Demonstração gráfica do conteúdo de cálcio do conduto das valvas criopreservadas e descelularizadas.....	41
Figura 26 – Demonstração gráfica do conteúdo de cálcio nas cúspides das valvas descelularizadas e criopreservadas.....	42

RESUMO

Introdução: Os homoenxertos, como substitutos valvares, apresentam adequada função hemodinâmica e baixo risco de tromboembolismo. Estudos demonstram que homoenxertos despertam reação imunológica aos elementos celulares do doador. Com o propósito de diminuir sua antigenicidade, sugere-se o uso de homoenxertos descelularizados. **Objetivo:** Avaliar comparativamente o comportamento biológico do heteroenxerto pulmonar porcino descelularizado e do homoenxerto criopreservado na posição pulmonar em carneiros. **Métodos:** Utilizaram-se 10 carneiros jovens da raça Soulfok separados em dois grupos. Nos 5 animais do grupo HomoC, foram implantados homoenxertos pulmonares criopreservados e nos 5 do grupo HeteroD, foram implantados heteroenxertos pulmonares porcinos descelularizados com ácido deoxicólico 1% e etanol 70%. Os animais foram acompanhados no período de 280 dias com a realização de ecocardiografias 30 dias após o procedimento cirúrgico e 30 dias antes do explante. Após o explante, as valvas foram avaliadas macroscopicamente, sendo aferidos os diâmetros do conduto. Após, foram analisadas por microscopia ótica utilizando-se coloração de H.E., Gomori e Weigert e imunohistoquímica para Fator VIII, CD3, Vimentina e CD68. Além disso, foi procedida a quantificação de cálcio por absorção atômica. **Resultados:** Ocorreu um óbito no grupo B no 40º pós-operatório. As valvas HomoC demonstraram perda de sua celularidade e degeneração da matriz extracelular, enquanto que as do HeteroD demonstraram repopulação da matriz com células do receptor e integridade da matriz colágena. Comparativamente, observou-se, ainda, maior presença de linfócitos nas valvas do grupo HomoC. A análise de cálcio por absorção atômica demonstrou maior calcificação das cúspides e dos condutos do HomoC ($p < 0,05$). As ecocardiografias evidenciaram função valvar normal nos dois grupos. O diâmetro valvar médio no explante foi maior nas valvas do HeteroD 21,9mm ($dp \pm 1,79$) quando comparado com o HomoC 17,38mm ($dp \pm 0,49$). **Conclusão:** Heteroenxertos valvares descelularizados foram parcialmente repopulados por células autógenas, exibiram menor infiltrado linfocitário e mínima tendência à calcificação. Apresentaram, também, maior diâmetro valvar quando comparados com os heteroenxertos criopreservados.

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que o número de pacientes que necessitam de cirurgia para substituição valvar seja de 170.000 no mundo (WILCOX, KOROSSIS, BOOTH, WATTERSON, KEARNEY e FISHER, 2005). Apesar dos avanços tecnológicos na área, ainda não existe o substituto valvar ideal. As próteses biológicas apresentam boa função hemodinâmica, não requerem o uso de medicação anti-coagulante no pós-operatório, mas apresentam durabilidade limitada, especialmente em pacientes jovens (SCHOEN, HIRSCH, BIANCO, LEVY, 1994). As próteses mecânicas são duráveis, mas necessitam o uso de anti-coagulantes continuamente no pós-operatório, o que aumenta as morbidades, principalmente os eventos hemorrágicos (PETERSEIM, CEN, CHERUVU, LANDOLFO, BASHORE e LOWE, 1999).

O primeiro implante ortotópico de um homoenxerto valvar aórtico foi feito em 1962 por Donald Ross (ROSS, 1962). Nessa fase inicial, os homoenxertos eram preservados em solução nutriente com antibióticos, denominados "homoenxertos frescos" (BARRAT-BOYES, ROCHE, SUBRAMANYAN, PEMBERTON e WHITLOCK, 1987). Os resultados clínicos de homoenxertos assim tratados foram satisfatórios e demonstraram boa durabilidade, adequada função hemodinâmica e baixa incidência de tromboembolismo em períodos de até 7 a 10 anos de seguimento (THOMPSON, YACOUB, AHMED, SOMERVILLE e TOWERS, 1980).

O maior inconveniente para o emprego de homoenxertos frescos foi o período limitado de estocagem que era de, no máximo, 4 a 6 semanas. Ficou logo evidente que métodos de preservação que permitissem a estocagem por períodos prolongados se faziam necessários. Vários métodos foram propostos para resolver este problema, juntamente com diversos processos de esterilização, dentre eles, a beta irradiação, formaldeído, clorexidine, propiolactona e óxido etileno mas, em geral, os resultados não foram satisfatórios (MERIN, DWIGHT e McGOON, 1973).

O'Brien foi o primeiro a usar a criopreservação para estocagem dos homoenxertos valvares. As valvas eram colhidas, esterilizadas em meio com

antibiótico e criopreservadas na presença de crioprotetores, utilizando-se vapor de nitrogênio líquido à temperatura de -150°C . Além da adequada preservação da matriz valvar e manutenção da viabilidade celular, a criopreservação possibilitou a estocagem dos homoenxertos por tempos prolongados, tornando-se o método de eleição.

O'BRIEN, STAFFORD, GARDNER, POHLNER , McGIFFIN e JOHNSTON (1987a) demonstraram resultados a longo prazo, sugerindo que a durabilidade dos homoenxertos criopreservados era maior que a dos homoenxertos a fresco. Alguns estudos de enxertos explantados demonstraram a presença de fibroblastos viáveis e a análise cromossômica demonstrou serem células do doador (O'BRIEN, STAFFORD, GARDNER, POHLNER , McGIFFIN e KIRKLIN, 1987b).

Apesar dos homoenxertos criopreservados apresentarem viabilidade celular e boa durabilidade, também estão sujeitos a processo progressivo de degeneração (MITCHELL, JONAS e SCHOEN, 1995). Estudos com enxertos criopreservados explantados demonstraram que, após um período de resposta inflamatória não específica, inicia-se progressiva degeneração da musculatura lisa, ocorre decréscimo na viabilidade celular, e, tardiamente, fragmentação das fibras elásticas levando à fibrose e calcificação (NEVES, GULBENKIAN, RAMOS, MARTINS, CALDAS e MASCARENHAS, 1997).

Apesar da degeneração dos homoenxertos ser multifatorial, acredita-se que a resposta imunológica desempenha importante papel neste processo. Estudos demonstram que a antigenicidade dos homoenxertos está relacionada a elementos celulares presentes na valva, pois células endoteliais, fibroblastos e células dendríticas expressam antígenos leucocitários classe I e classe II (OEI, WELTERS, VAESSEN, STEGMANN, BORGES e WEIMAR, 2000). Em decorrência disso, linhas de pesquisas têm dado enfoque a processos que diminuam a antigenicidade dos homoenxertos (ELKINS, GOLDSTEIN, HEWITT, WALSH, DAWSON, e OLLERENSHAW, 2001). A remoção das células e, conseqüente redução de antígenos de histocompatibilidade tipo I e II e outros epítomos presentes no tecido conjuntivo da matriz, resultam em material acelular, não antigênico, permitindo inclusive o implante valvar entre espécies diferentes (ELKINS, et. al., 2001).

Estudos experimentais demonstraram que homoenxertos descelularizados implantados na via de saída do ventrículo direito de ovinos sofrem processo de remodelação, repovoamento celular por elementos celulares do hospedeiro, além de apresentarem menor índice de calcificação (LEYH, WILHELMI, REBE, FISCHER, KOFIDIS e HAVERICH, 2003). Esses dados sugerem que homoenxertos descelularizados possam apresentar durabilidade aumentada quando comparados com homoenxertos criopreservados.

1.1 OBJETIVO

Avaliar, comparativamente, o comportamento biológico do heteroenxerto pulmonar porcino descelularizado e do homoenxerto pulmonar criopreservado implantados na via de saída do ventrículo direito de carneiros jovens. Como parâmetro de avaliação, serão enfatizadas a análise qualitativa histológica e imunohistoquímica do potencial de repovoamento dos enxertos por células do receptor, a análise morfométrica com velas de Hegar pré e pós-implante e a análise quantitativa da ocorrência de deposição de cálcio nos enxertos.

2 LITERATURA

O uso clínico de tecidos humanos para reconstrução vascular foi inicialmente reportado por Gross 1949, baseado nos trabalhos experimentais de Carrel e colaboradores no início do século XX (CARREL, 1912; GROSS, BILL e PEIRCE, 1949). Somente 50 anos após, iniciaram-se estudos experimentais com homoenxertos valvares. LAM, ARAM e MUNNELLI (1952) implantaram homoenxertos aórticos, em posição heterotópica, na aorta torácica descendente de cães.

MURRAY (1960) relatou o uso de um homoenxerto aórtico a fresco implantado na aorta torácica descendente em humanos para correção de uma insuficiência aórtica. KERWIN, LENKEI e WILSON (1962) implantaram nove homoenxertos a fresco na aorta torácica descendente de pacientes com insuficiência aórtica, e, após seguimento de 6 anos, descreveram que as cúspides dos homoenxertos implantados mantinham-se delgadas, possibilitando uma adequada performance valvar. DURAN e GUNNING (1962) relataram a técnica de implante ortotópico em posição subcoronária da aorta. No mesmo período, o uso clínico do homoenxerto aórtico utilizando-se a técnica subcoronária foi reportado de modo independente por Donald Ross na Inglaterra e Brian Barratt-Boyes na Nova Zelândia (ROOS, 1962; BARRATT-BOYES, 1964)

Inicialmente, os transplantes valvares eram realizados utilizando-se valvas a fresco em posição ortotópica, implantadas pouco tempo depois da dissecação. O limitado número de doadores e a necessidade de esterilização e estoque das valvas levou ao surgimento de várias abordagens técnicas. Apesar de várias destas aumentarem a disponibilidade e possibilitarem o estoque dos enxertos, resultaram em dano estrutural da valva levando à disfunção precoce após o implante (MERIN e McGOON, 1973). HEIMBECKER, ALDRIDGE e LEMIRE (1968) demonstraram que o tratamento com irradiação gama ou beta-propiolactona diminuía acentuadamente a durabilidade dos homoenxertos. Os métodos menos agressivos de esterilização

levavam a uma disfunção valvar de 50% em 7 anos, o que era compatível com as valvas biológicas (xenoenxertos) e mecânicas da época (WAIN, GRECO e IGNEGERI, 1980).

Durante o final da década de 70, a atenção voltou-se para o uso de homoenxertos esterilizados em antibiótico e estocados a 4°C em solução nutriente contendo antibiótico. Várias séries demonstraram bons resultados em seguimento médio de 7 a 10 anos (THOMPSON et. al., 1980). ROSS, MARTELLI e WAIN(1979) reportaram o seguimento de 615 valvas preservadas com técnicas diferentes após seguimento de 15 anos e demonstraram claramente a superioridade dos homoenxertos a fresco. PENTA, QURESHI, RADLEY-SMITH e YACOUB (1984) obtiveram resultados semelhantes, demonstrando que 90% dos pacientes estavam livres de complicações ou mortalidade em 10 anos.

Problemas relacionados a disponibilidade, tempo limitado de estoque, falta de normatização e controle relacionado às técnicas utilizadas limitaram o uso dos homoenxertos. O'BRIEN et. al.(1987a) começou uma série de trocas valvares utilizando enxertos submetidos à esterilização com antibiótico, curto tempo de isquemia e criopreservados em dimetilsulfoxido (DMSO). Obtiveram bons resultados utilizando 192 homoenxertos criopreservados entre junho de 1975 e dezembro de 1986 constatando que, 92% dos pacientes estavam livres de reoperação após 10 anos. Um dos mais interessantes aspectos de seus relatos, foi demonstrar a origem cromossômica de fibroblastos provenientes do doador em uma valva implantada com mais de nove anos. (O'BRIEN et. al., 1987b)

Um dos propósitos da criopreservação dos enxertos era manter a viabilidade dos fibroblastos com o objetivo de aumentar a durabilidade do enxerto (ARMIGER, 1995). YANKAH, WOTTGE , MULLER-HERMELINK, FELLER, LANGE e WESSEL (1987) relataram a identificação de células endoteliais em enxertos explantados precocemente, capazes de expressar antígenos de histocompatibilidade de superfície. SALOMON, FRIEDMAN, CALLOW, PAYNE, LIBBY e MASS(1993) demonstraram que, embora a viabilidade de alguns elementos celulares pudesse aumentar relativamente a durabilidade do enxerto, algumas células eram capazes de expressar antígenos de histocompatibilidade classe II que estimulam a resposta imunológica celular por parte do receptor. HOGAN, DUPLOCK, GREEN, SMITH,

GALL e FRAZER (1996) sugerem que homoenxertos aórticos despertam uma reação imunológica específica a elementos celulares do doador. OEI et. al. (2000) avaliaram a resposta imunológica de 50 pacientes que receberam homoenxertos e observaram linfócitos T citotóxicos apresentando alta atividade para antígenos do doador, sugerindo que existe uma resposta imunológica específica que desempenha um papel importante na degeneração dos homoenxertos.

MALONE, BRENDEL, DUHAMEL, e REINERT (1984) foram os primeiros a proporem o uso de detergente em vasos de pequeno calibre com a intenção de remover as células de enxertos homólogos, diminuindo, assim, a reação imunológica do hospedeiro. WILSON, COURTMAN, KLEMENT, LEE e YEGER (1994) propuseram o uso da descclularização dos homoenxertos com detergentes, com a intenção de remover os elementos antigênicos do doador. Diversos tratamentos químicos capazes de descclularizar as cúspides valvares e as paredes arteriais dos condutos tem sido propostas, incluindo o uso de tripsina, dodecilsulfato de sódio (SDS), octilfenoxietoxietanol (Triton X-100), ácido deoxicólico, soluções hipo e hipertônicas, enzimas como a RNase e DNase, etanol e glicerol (GRAUSS, HAZEKAMP, OPPENHUIZEN, VAN MUNSTEREN, GITTENBERGER e DeRUITER, 2005). Independente da metodologia empregada, essas técnicas tem por objetivo final obter um tecido acelular, entretanto, sem danificar os componentes da matriz extracelular como o colágeno e as fibras elásticas, além de manter a proporção das macromoléculas intacta. Dessa forma, procurou-se obter uma matriz imunologicamente inerte, com propriedades biomecânicas preservadas, não citotóxica e que seja totalmente biocompatível (WILCOX et. al., 2005).

GOLDSTEIN, CLARKE, WALSH, BLACK e O'BRIAN (2000) relataram o uso do transplante valvar entre espécies de uma valva porcina descclularizada implantada em caráter experimental em carneiro. ELKINS et. al. (2001) demonstraram que heteroenxertos porcinos descclularizados, quando implantados em carneiros jovens, tiveram desempenho hemodinâmico normal por períodos de até 11 meses, não se observando calcificação nem retração tecidual. Os mesmos autores sugerem que os heteroenxertos descclularizados apresentam um potencial de remodelamento e possibilitam recelularização por células endoteliais e intersticiais do receptor.

Em outro estudo experimental em carneiros, demonstrou-se que heteroenxertos descelularizados com Tripsina/EDTA foram repopulados *in vivo* por células do receptor em 24 semanas (LEYH et. al., 2003). NUMATA, FUJISATO, NIWAYA, ISHIBASHI-UEDA, NAKATANI e KITAMURA (2004) relatam que os homoenxertos descelularizados reduzem a resposta inflamatória desencadeada pelo receptor, sugerindo aumento da durabilidade quando comparados com valvas criopreservadas. DHOMEN, COSTA, LOPES, YOSHI, SOUSA, KONERTZ (2005) demonstram em estudo experimental em carneiros que os heteroenxertos descelularizados apresentam potencial de remodelamento, constatando a produção de novas fibras de colágeno pelos fibroblastos. DHOMEN et al. (2005) sugerem, também, através de análise ecocardiográfica, que os heteroenxertos apresentam potencial de crescimento. STEINHOFF, STOCK, NAJIBULLA, HEIKE, TIMKE e MELISS (2000) propõem o uso de enxertos (homoenxertos ou heteroenxertos) semeados *in vitro* com células endoteliais e miofibroblastos do receptor com a intenção de proteger os componentes sub-endoteliais da matriz extracelular, favorecendo, assim, a produção de colágeno e o remodelamento valvar.

3 MÉTODO

3.1 AMOSTRA

A amostra foi constituída por dez carneiros jovens da raça Soulfok, com idade média de 16,6 semanas (dp \pm 1,14 ; min 14 ; máx 18) e peso médio de 37,1Kg (dp \pm 2,55 ; min 33 ; máx 41), os quais foram separados em dois grupos. Nos 5 animais do grupo HomoC, foram implantados, na via de saída do ventrículo direito, homoenxertos pulmonares criopreservados e, nos 5 animais do grupo HeteroD, foram implantados, na via de saída do ventrículo direito, heteroenxertos pulmonares porcinos descelularizados com ácido deoxicólico a 1% e etanol a 70%. Os animais foram acompanhados por um período médio de 278,8 dias (dp \pm 7,9) até o momento do explante da valva.

3.2 PREPARO DO ENXERTO

3.2.1 Homoenxertos Criopreservados

Os homoenxertos pulmonares (figura 1.A) foram colhidos de carneiros jovens em abatedouros da região metropolitana de Curitiba. Os corações foram transportados até as dependências do Laboratório de Engenharia e Transplante Celular PUCPR, onde foram dissecadas as valvas pulmonares sob fluxo laminar (Trox Brasil, FLU CL1), sendo nessa etapa aferidos os diâmetros com vela de Hegar. Foram selecionadas para o estudo, as valvas com diâmetro de 17mm. Em seguida, foram imersas em meio nutriente Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma, cód:r6504) contendo antibióticos cefoxitina (Mefoxin®, Merck Sharp & Dohme) 240 μ g/ml, lincomicina (Lincomicina Royton®, Royton) 120 μ g/ml, polimixina B (Maxitrol®, Alcon) 100 μ g/ml e vancomicina (Cloridrato de Vancomicina®, Abbott) 50 μ g/ml por 24 horas, segundo protocolo vigente no Banco de Homoenxertos da

Santa Casa de Curitiba. Finalizada essa etapa, as valvas foram lavadas em solução salina a 0,9%, colocadas em RPMI acrescentando-se dimetilsulfoxido 10% (Sigma cód:D5879) e soro bovino fetal a 10% (Gibco cód:102270-106) sendo então, criopreservadas em freezer de congelamento programado (Planer III, KRYO 10 series) à velocidade de - 1°C/min até -80°C. Após o processo de criopreservação, as valvas foram mantidas em freezer mecânico de armazenamento (Sanyo, Ultra-low temperature) à temperatura de -150°C em vapor de nitrogênio líquido.

O descongelamento foi realizado 24 horas antes do implante com soro fisiológico à temperatura de 42 à 50 graus, com RPMI e soro bovino fetal à 10% para diluir o DMSO. Realizou-se controle histológico após o processo de criopreservação (figura 1.B).

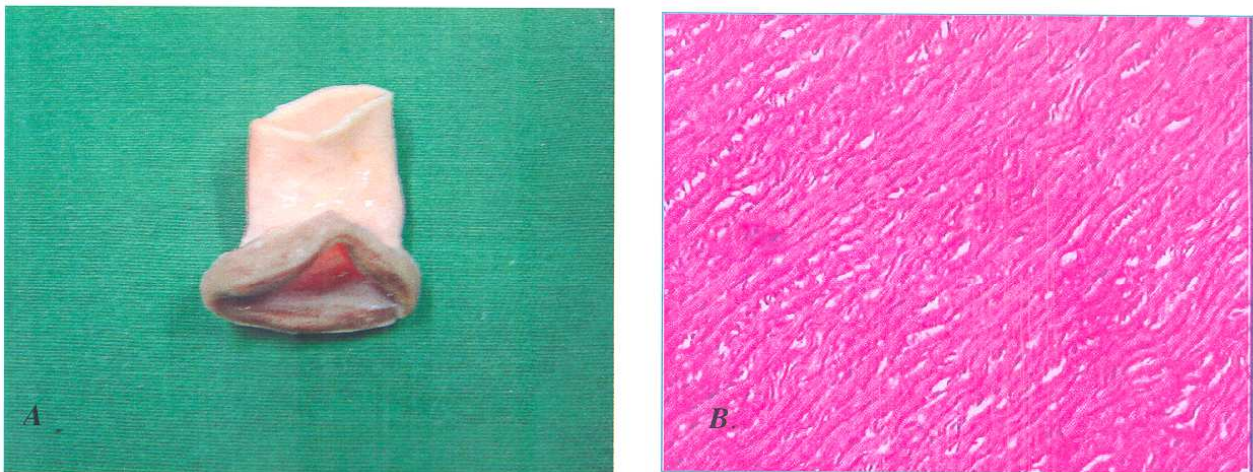


Figura 1 – **A.** Fotografia do homoenxerto pulmonar criopreservado (HomoC) após processo de descongelamento demonstrando o conduto e a camada muscular. **B.** Fotomicrografia de corte histológico de conduto pulmonar criopreservado (HomoC) corado com Hematoxilina-Eosina (H.E. 20x). Observa-se a presença de células na matriz.

3.2.2 Heteroenxertos Descelularizados

Os heteroenxertos porcinos (figura 2.A) foram colhidos em abatedouros da região metropolitana de Curitiba, dissecados em fluxo laminar com processo de mensuração e manutenção em solução com antibiótico idênticos aos dos homoenxertos criopreservados. Posteriormente, foram imersos em ácido deoxicólico

a 1% e mantidos sob agitação em *shaker* (QUIMIS®) à temperatura ambiente por 18h. Eram então submetidos a 5 lavagens de 10 minutos com solução salina a 0,9%, sob agitação em *shaker* e em temperatura ambiente. Após, foram imersas em etanol a 70% e também mantidas sob agitação à temperatura ambiente por 30 minutos. Ao fim dessa etapa, foram realizadas 5 lavagens de 10 minutos com solução salina 0,9% sob agitação em temperatura ambiente. As valvas foram mantidas, até o implante, em meio nutriente RPMI com antibióticos à 4°C. Ao final do processo, realizou-se análise histológica de controle (figura 2.B).

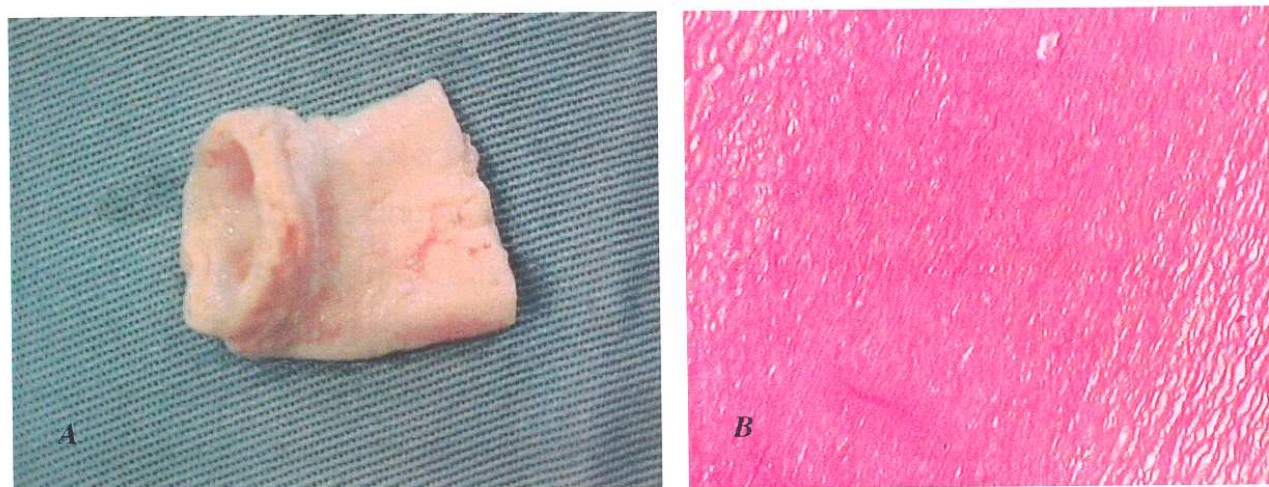


Figura 2 – **A.** Fotografia de heteroenxerto pulmonar porcino descelularizado (HeteroD) após processo de descelularização com ácido deoxicólico, demonstrando o conduto e a camada muscular. **B.** Fotomicrografia de corte histológico de conduto pulmonar descelularizado (HeteroD) corado com Hematoxilina-Eosina (H.E. 20x). Observa-se ausência de células na matriz

3.3 PRÉ-OPERATÓRIO

Os animais foram admitidos por uma equipe de veterinários, sendo submetidos à avaliação clínica e pesagem. Também foram realizados exames laboratoriais que incluíram: hematócrito, dosagem de hemoglobina, ferro sérico e eletrólitos. Foram vacinados contra *Clostridium C* e *D* e receberam toxóide tetânico. Adicionalmente, foi administrado, por via E.V., Levamisol (Ripercol®, Cyanamida) 7,5mg/Kg IM e Ivermectina (Ivomec®, Merck) 200µg/Kg IM para prevenção de infecção parasitária. Após atingirem peso mínimo de 30Kg, hematócrito de 28% e estarem adequadamente imunizados e desverminados, os animais foram liberados

para a operação. Todos os animais ficaram em jejum pré-operatório para sólidos de 36 horas e para líquidos de 12 horas.

3.4 ANESTESIA E PREPARO CIRÚRGICO

Na sala cirúrgica, foi realizada tricotomia torácica à esquerda e puncionada veia periférica no membro anterior esquerdo. Procedeu-se a medicação pré-anestésica com Diazepan® (Nova Química-Sigma Pharma) 0,5mg/Kg e tartarato de butorfanol (Turbogesic®, Forte Dodge) 0,4mg/Kg e cateterizada a artéria dorsal da orelha para monitorização invasiva da pressão arterial. Os animais foram monitorizados com eletrodos para registro contínuo de eletrocardiograma e instalado oxímetro de pulso, na língua do animal, para aferição da saturação arterial de oxigênio (figura 3). Foi realizada dose profilática de antibiótico, cefitiofur (Ceftiofur Exenel®, Pfizer) 1mg/kg e colhida uma amostra de sangue usada como controle para valores hematológicos.

A indução anestésica consistiu de 4mg/Kg de propofol (Diprivan®, Aztra Zeneca), sendo, após, realizada intubação orotraqueal. A ventilação mecânica foi feita em respirador a volume oxigel 1722 (Oxigel Mats. Hosps. Ind. E Com. Ltda®), com frequência respiratória de 12 a 15 ventilações por minuto e realizou-se a manutenção anestésica com propofol (Diprivan®, Aztra Zeneca) a 0,6mg/Kg/min.

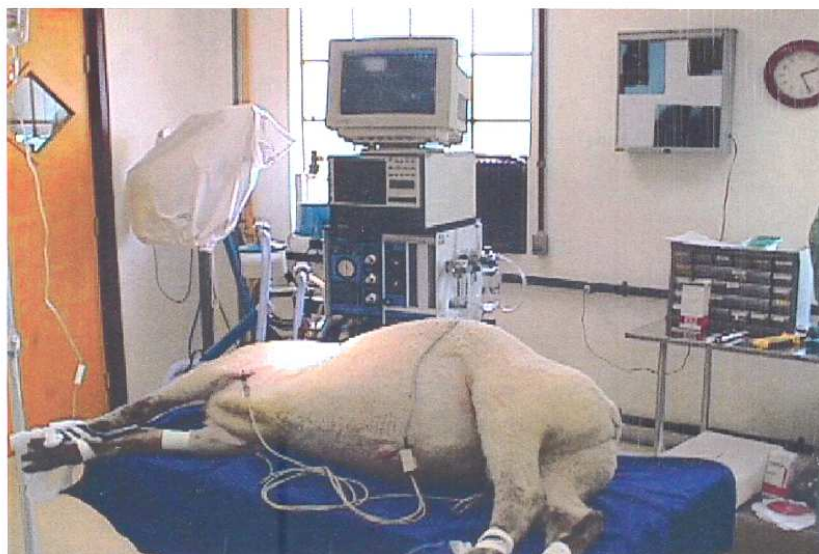


Figura 3 – Fotografia demonstrando monitorização do carneiro na sala cirúrgica

3.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no centro cirúrgico do Hospital Veterinário para Pequenos Animais no Campus II-PUCPR. Foi realizada toracotomia lateral esquerda no 4º espaço intercostal. Visualizado o pericárdio, o mesmo era aberto para permitir acesso à aorta torácica descendente, átrio direito e artéria pulmonar. Os animais foram então heparinizados com 250U/kg de heparina (Liquemine®, Roche) e feita a canulação arterial na aorta torácica descendente com cânula número 18 e canulação do átrio direito com cânula venosa número 32.

Após procedida a canulação, instiuu-se circulação extracorpórea normotérmica e o procedimento realizado sem o clampeamento da aorta e com o coração batendo. Em seguida, foi realizada a secção transversa da artéria pulmonar e ressecadas as cúspides pulmonares nativas. A via de saída do ventrículo direito foi reconstruída com implante da valva pulmonar selecionada, mediante sutura contínua com polipropileno 4.0 em sua porção proximal e distal (figura 4). Nos primeiros 5 animais, foram implantados heteroenxertos descelularizadas e nos 5 seguintes, homoenxertos criopreservados. Após término do implante valvar, a circulação extracorpórea foi descontinuada. Foi realizada revisão da hemostasia e fechamento anatômico do tórax, mantendo dreno torácico que foi removido após 1 hora de pós-operatório, quando o animal adotou posição de decúbito ventral.

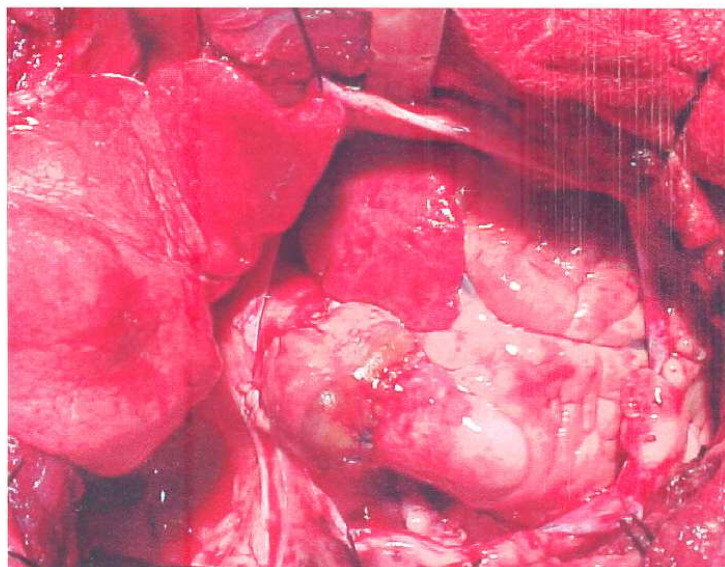


Figura 4 – Fotografia demonstrando aspecto final do procedimento cirúrgico de implante do heteroenxerto pulmonar descelularizado (HeteroD) na via de saída do ventrículo direito

3.6 PÓS-OPERATÓRIO

Os animais permaneceram por 24h no Hospital Veterinário para Pequenos Animais onde receberam analgesia com flumexil meglumine (Banamine®, Shering Plough) 1,5mg/Kg endovenoso e cuidados pós-operatórios. Após, foram encaminhados para o Hospital Veterinário na Fazenda Gralha Azul - PUCPR, onde mantiveram-se confinados com alimentação adequada. Realizaram-se exames laboratoriais de controle, mantida antibioticoterapia com ceftiofur (Ceftiofur Exenel®, Pfizer) 1mg/Kg ao dia e gentamicina (Gentaminina®, Neo-química) 4mg/Kg à cada doze horas por 5 dias. Os animais foram submetidos a exames ecocardiográficos em 30 dias do pós-operatório e, tardiamente, nos 30 dias que precederam o explante.

3.7 EUTANÁSIA

Os animais foram submetidos à eutanásia com 278,8 dias \pm 7,9 (min:267 máx:290) de evolução após o procedimento operatório. Os procedimentos foram feitos no centro cirúrgico e em condições assépticas. Realizou-se tricotomia torácica lateral esquerda e acesso venoso em membro anterior esquerdo. Após ser feita medicação pré-anestésica com cloridrato de ketamina (Vetarnecol®, König) 12mg/Kg, os animais foram intubados e mantidos com anestesia inalatória com halotano (Fluothane®, Astra Zeneca) a 2% e ventilação mecânica.

Após essa etapa, foi realizada toracotomia lateral esquerda seguida de heparinização plena com 250U/Kg de heparina (Liquemine®, Roche) e abertura da cavidade torácica, quando avaliados o aspecto macroscópico da valva e o grau de aderência existente no mediastino. Realizou-se, então, a dissecação das aderências existentes e, antes do explante definitivo da valva, foi administrado 40 mEq de cloreto de potássio endovenoso. Procederam-se, então, a retirada da valva para análise macroscópica, aferição de diâmetro do conduto e documentação fotográfica (figura 5).

Após a eutanásia, os animais foram encaminhados para o departamento de anatomia patológica do Hospital Veterinário da PUCPR para descarte da carcaça.

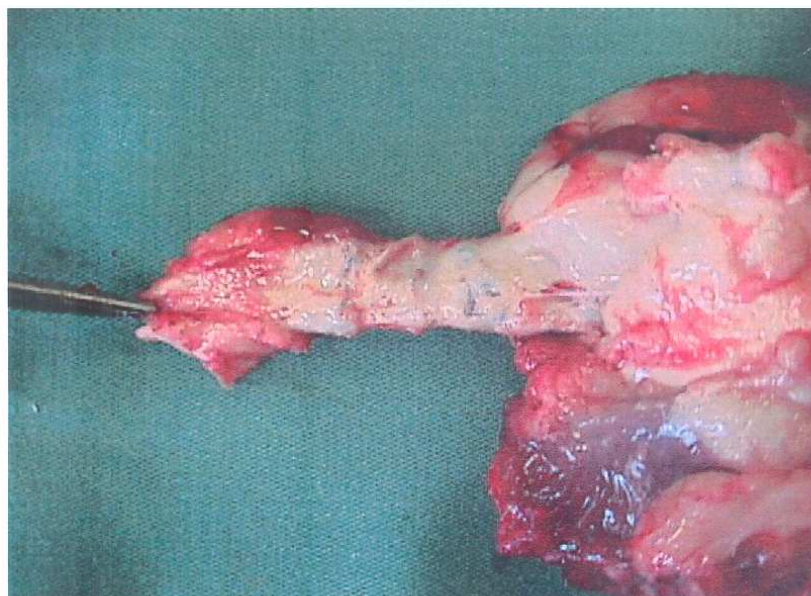


Figura 5 – Fotografia demonstrando o explante de homoenxerto pulmonar criopreservado (HomoC). Observa-se a diferença de diâmetro entre o conduto pulmonar nativo e o enxerto.

3.8 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO

3.8.1 Análise Ecocardiográfica

Os animais foram submetidos a exames ecocardiográficos (SONOS,5500, PHILIPS) realizados no departamento de cirurgia experimental-PUCPR, nos primeiros 30 de pós-operatório e, tardiamente, nos 30 dias antecedentes ao explante. Foram analisados o diâmetro do conduto do enxerto pulmonar em seu 1/3 médio obtido por janela transversa infra-axilar esquerda; as velocidades instantâneas máxima e média de fluxo por análise de Doppler contínuo e pulsado; gradiente instantâneo máximo e médio transvalvar pela equação modificada de Bernoulli. Avaliaram-se, também, função e mobilidade valvar (Figura 6).



Figura 6 – Fotografia de exame ecocardiográfico demonstrando valva pulmonar descellularizada (HeteroD) implantada na via de saída do ventrículo direito no 60° pós-operatório. Observam-se, na seta, as cúspides da artéria pulmonar descellularizada.

3.8.2 Análise Macroscópica

Após o explante, realizou-se a inspeção macroscópica da valva observando-se as condições gerais da valva, consistência do enxerto, a existência e distribuição de áreas de calcificação no conduto e na cúspide e presença de trombo ou vegetação. Em seguida, foi estimado o diâmetro pulmonar por meio de vela de Hegar e realizada documentação fotográfica com máquina digital (Sony Cyber-Shot 4.1).

A aferição da medida valvar consistiu na medida do diâmetro do conduto da artéria pulmonar com velas de Hegar, instrumento padronizado para aferição de diâmetros valvares, com anéis de 15 a 30mm de diâmetro, a intervalos de 1mm.

3.8.3 Confeção dos Segmentos Valvares

Posteriormente à análise macroscópica, as valvas foram divididas, por meio de secção longitudinal ao nível das comissuras, em três segmentos compostos por cúspide e conduto para serem encaminhadas respectivamente à microscopia ótica, quantificação de cálcio por absorção atômica e imunohistoquímica (figura 7).



Figura 7 – Fotografia de segmento longitudinal da artéria pulmonar demonstrando cúspide e conduto

3.8.4 Análise de Cálcio

Um dos segmentos da valva explantada foi encaminhado para quantificação de cálcio por espectrometria de absorção atômica, sendo, utilizado para análise, uma amostra de 1cm² da porção central da cúspide e outra de igual tamanho do conduto. Os segmentos foram pesados, triturados com lâmina de bisturi em fragmentos menores e mantidos em HCl 6N por 8 horas à temperatura de 72°C. Após, as amostras foram enviadas para a análise de quantificação de cálcio por espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (PERKIN ELMER, 4100).

3.8.5 Análise Histológica

Para a análise histológica, um segmento da parede arterial do enxerto foi embocado de maneira a permitir um corte de perfil, mostrando a continuidade da cúspide com sua inserção no conduto. Esse segmento foi fixado em formaldeído 10%, sendo, em seguida, preparados os blocos de parafina e realizados cortes de 4µm de acordo com as técnicas convencionais de embocamento. Foram então coradas com Hematoxilina-Eosina para avaliar distribuição celular e a presença de infiltrado inflamatório, Weigert para análise das fibras elásticas e Gomori para avaliação da distribuição e arquitetura das fibras colágenas.

3.8.6 Análise por Imunohistoquímica

O material foi incluído em parafina e foram realizados cortes de 4 µm sobre lâminas sinalizadas. A seguir, os cortes foram submetidos à desparafinização, hidratação e recuperação antigênica em tampão citrato (ph 6.0) por vinte minutos. Após banho em tampão fosfato, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena mergulhando-se as lâminas em peróxido de hidrogênio à 3% durante 5 minutos. O material foi submetido a bloqueador de proteínas específico para carneiro. Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos primários Fator VIII (Dako-cód.0082), específico para células endoteliais, CD3 (Dako-cód.A0452), específico para linfócitos, Vimentina (Dako-cód.M0725), específico para células de origem mesenquimal e CD-68 (Dako-cód.M0814), específico para macrófagos. Permaneceram incubados em lâminas separadas por 12h à temperatura de 4°C. Após banho em tampão fosfato, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotilado por 30 minutos em temperatura ambiente e mergulhados no complexo streptavidina-peroxidase por 30 minutos em temperatura ambiente. A marcação foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina. As lâminas foram então contra-coradas com hemoatoxilina.

3.8.7 Análise Estatística

Para análise dos resultados referentes a diâmetro, gradiente valvar e quantificação de cálcio foi utilizado o teste Mann-Whitney para análise de dados não paramétricos. Considerou-se significância estatística para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EVOLUÇÃO CLÍNICA

Ocorreu um óbito tardio, por endocardite, de um animal do grupo HeteroD no 40° dia de pós-operatório o qual foi descartado do experimento. Os demais apresentaram boa evolução clínica até o momento do explante. Os animais foram submetidos à eutanásia no grupo HomoC após uma média de 276,6 dias ($dp\pm 5,22$) e no grupo HeteroD após uma média de 281,7 dias ($dp\pm 10,6$). O grupo HomoC apresentou peso médio de 36Kg ($dp\pm 2,77$; min 33 ; máx 40) no momento do implante e de 62,7Kg ($dp\pm 3,36$; min 58 ; máx 63) no momento do explante, com aumento ponderal de 74,16%. O grupo HeteroD apresentou peso médio de 38Kg ($dp\pm 2,23$; min 35 ; máx 41) no momento do implante e 60,2Kg ($dp\pm 2,58$; min 57 máx 64) no momento do explante com, aumento ponderal de 57,89%. Não houve significância estatística no aumento ponderal entre os dois grupos ($p>0,05$).

4.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA

A avaliação macroscópica não mostrou evidências de endocardite, trombo ou ruptura valvar em nenhum dos grupos. À visualização e à palpação, os condutos e as cúspides de ambos os grupos apresentavam-se bem preservados. Em ambos os grupos houve sinal de calcificação nas linhas de sutura proximal e distal. Em 3 condutos do grupo HomoC (figura 8), e em 1 conduto do grupo HeteroD, observou-se presença macroscópica de calcificação focal. Nos demais condutos, constatou-se aspecto macroscópico normal (figura 9). No grupo HomoC, observou-se, em três oportunidades, que as cúspides apresentavam-se com aspecto branco opaco nacarado, não translúcido, espessadas. Em uma delas encontramos pequena calcificação focal. As cúspides das valvas do grupo HeteroD apresentavam aspecto macroscópico normal, sem espessamento ou calcificação.

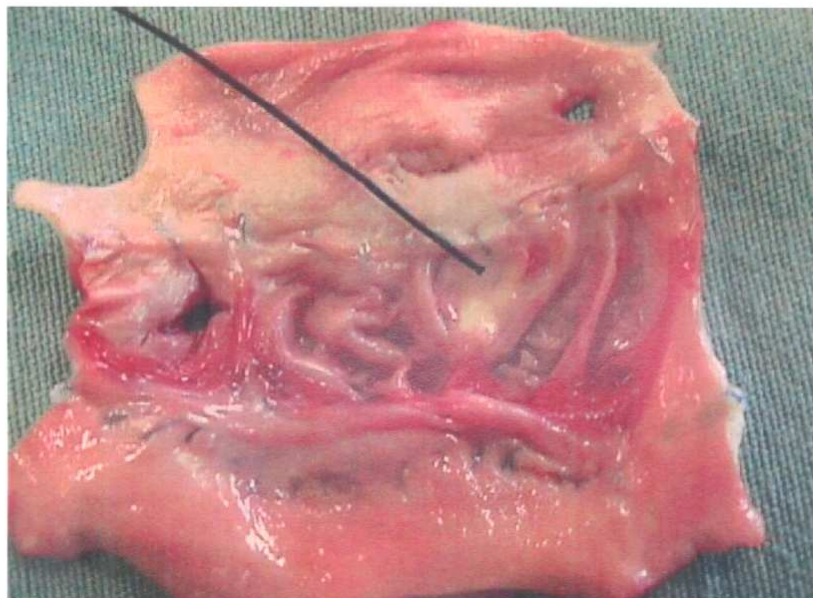


Figura 8 – Fotografia da superfície interna do enxerto pulmonar do grupo HomoC após o explante. Observa-se no detalhe a presença de calcificação focal do conduto.



Figura 9 – Fotografia de superfície interna de valva pulmonar do Grupo HeteroD após explante. Observa-se ausência de calcificação ou espessamento das cúspides.

4.3 ANÁLISE DO DIÂMETRO VALVAR NO EXPLANTE

O diâmetro valvar médio aferido com vela de Hegar no grupo HomoC foi de 17,38mm ($dp\pm 0,49$), enquanto que o diâmetro médio no grupo HeteroD foi de 21,9mm ($dp\pm 1,79$). Observou-se diâmetro maior nas valvas descelularizadas quando comparado com as criopreservadas (figura 10).

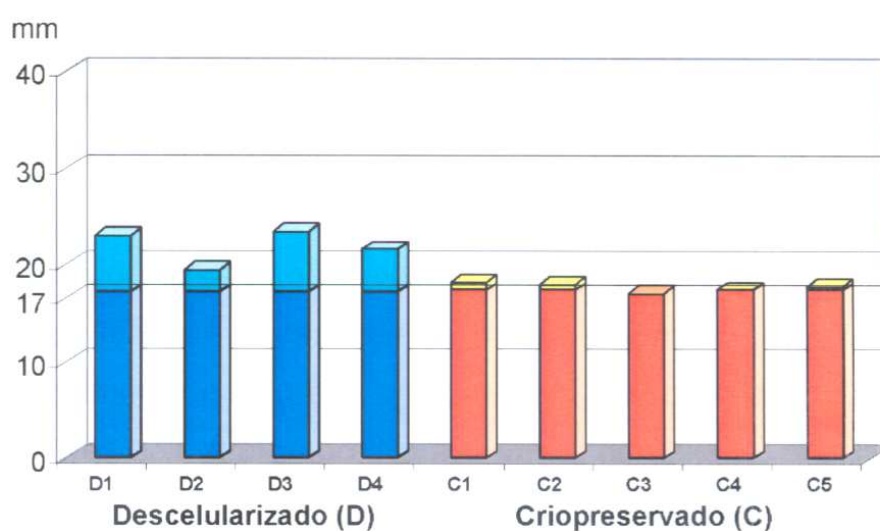


Figura 10 – Gráfico representando o aumento do diâmetro das valvas criopreservadas (HomoC) e descelularizadas (HeteroD) no explante ($p=0,016$)

Tabela 1 – Diâmetro das valvas criopreservadas e descelularizadas aferidas no explante

Descelularizado (HeteroD)	Criopreservado (HomoC)
23,0	18,2
19,5	18,0
23,5	17,0
21,6	17,4
	17,7
Diâmetro da valva pulmonar em mm ($p=0,016$)	

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

4.4.1 Dos Conduitos Valvares

Hematoxilina-eosina: No grupo HomoC observou-se ausência da estrutura trilaminar valvar e alterações estruturais da matriz extracelular, compatíveis com áreas de necrose e degeneração mucóide. Próximo à linha de sutura proximal, região de transição entre o conduto pulmonar nativo e o enxerto, evidenciou-se intenso infiltrado inflamatório crônico e áreas sugestivas de calcificação distrófica nas proximidades do fio utilizado na sutura. Nos conduitos observou-se menor quantidade de células quando comparado com as valvas do grupo HeteroD. Também evidenciou-se células inflamatórias distribuídas de modo disperso (figura 11.A).

No grupo HeteroD observou-se a estrutura trilaminar do conduto mantida. Evidenciou-se também a presença de reação inflamatória crônica na transição entre o conduto pulmonar nativo e o enxerto, com áreas de calcificação de distribuição semelhante aos do outro grupo. Na adventícia do enxerto, encontrou-se a presença de *vasa-vasorum* circundados por células inflamatórias. Na camada média observou-se focos com padrão frouxo de matriz extracelular, característica de matriz jovem. Também evidenciaram-se células intersticiais e células inflamatórias distribuídas de modo disperso. Na região sub-intimal observaram-se raras células inflamatórias, e menor quantidade de células quando comparadas com a camada média. (Figura 11.B).

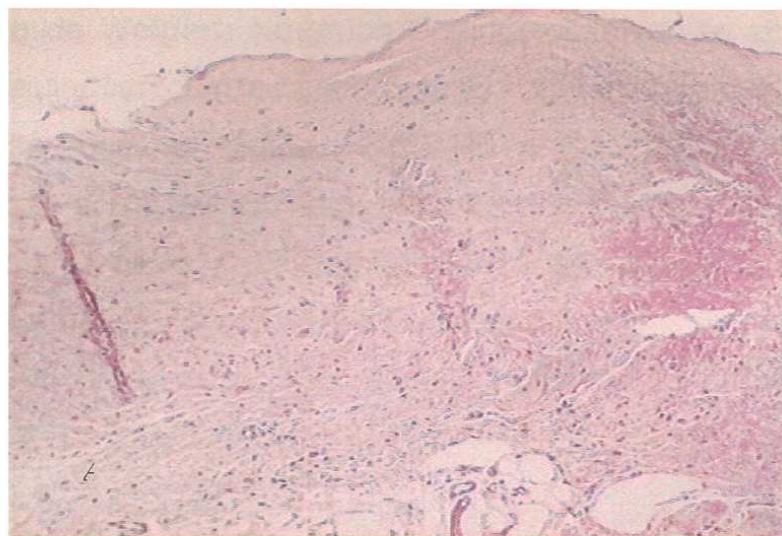


Figura 11 – Fotomicrografias de corte histológico, coloração H.E., aumento 10x, conduto de artéria pulmonar. **A.** Conduto de valva do grupo HomoC, observa-se a ausência da estrutura trilaminar valvar e raras células na matriz. **B.** Conduto da valva do grupo HeteroD, observa-se a presença de células intersticiais predominantemente na adventícia e camada média e estrutura trilaminar valvar preservada.

Coloração de Weigert: No grupo HomoC, observou-se alteração estrutural da matriz extracelular caracterizada por ruptura, fragmentação das fibras elásticas e compactação das mesmas (figura 12.A). No grupo HeteroD, constatou-se na camada média fibras elásticas com orientações diversas caracterizando uma organização de matriz jovem. A túnica média tornou-se mais compacta com menores espaços interlamelares. Evidenciou-se a presença de alguns pontos de rupturas das fibras elásticas em uma valva. Nas demais observou-se arquitetura das fibras elásticas preservadas (figura 12.B).

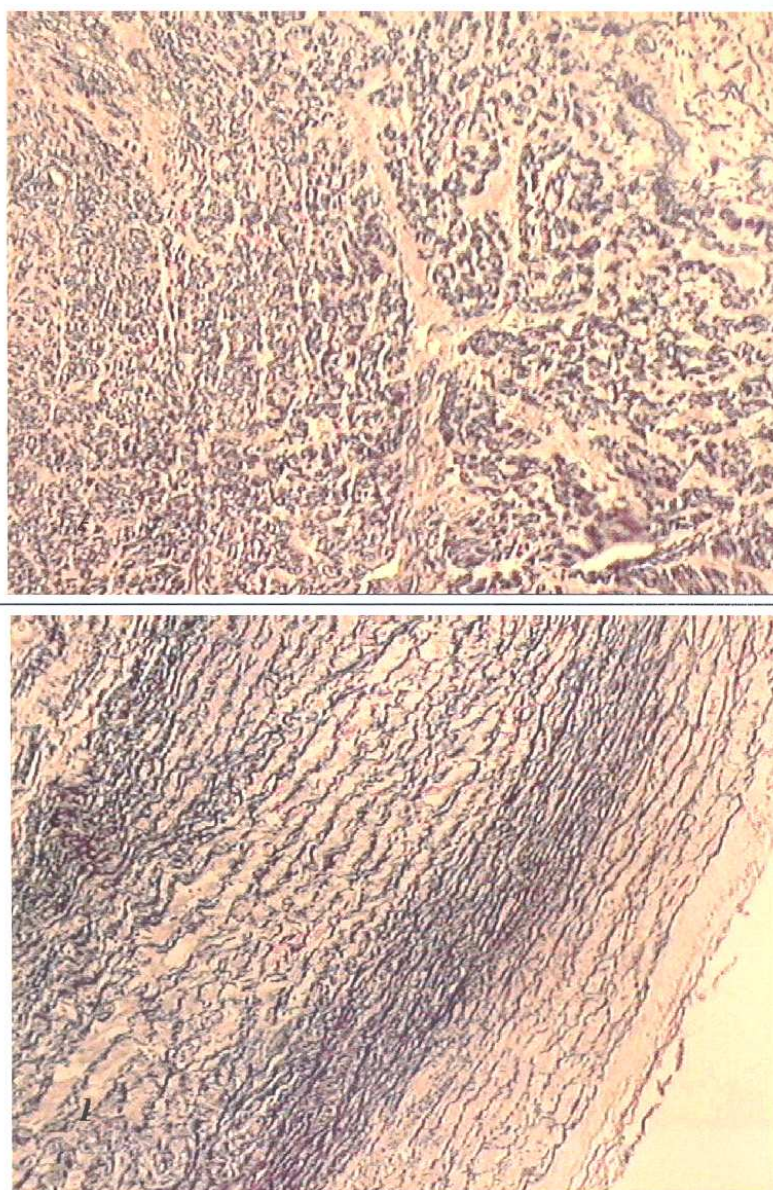


Figura 12 – Fotomicrografias de corte histológico, coloração Weigert, aumento 10x, conduto de artéria pulmonar. **A.** Conduto da valva HomoC, observa-se a presença de fibras elásticas rotas. **B.** Conduto da valva HeteroD, observa-se a presença de fibras elástica íntegras.

Coloração de Gomori: Nas valvas do grupo HomoC observou-se alteração da arquitetura das fibras colágenas, caracterizado por ruptura e degeneração das mesmas nas camadas adventícia e predominantemente na média. Também observaram-se áreas de necrose da matriz extracelular (figura 13.A). Nas valvas do grupo HeteroD encontrou-se arquitetura normal das fibras colágenas nas túnica média e adventícia (figura 13.B).

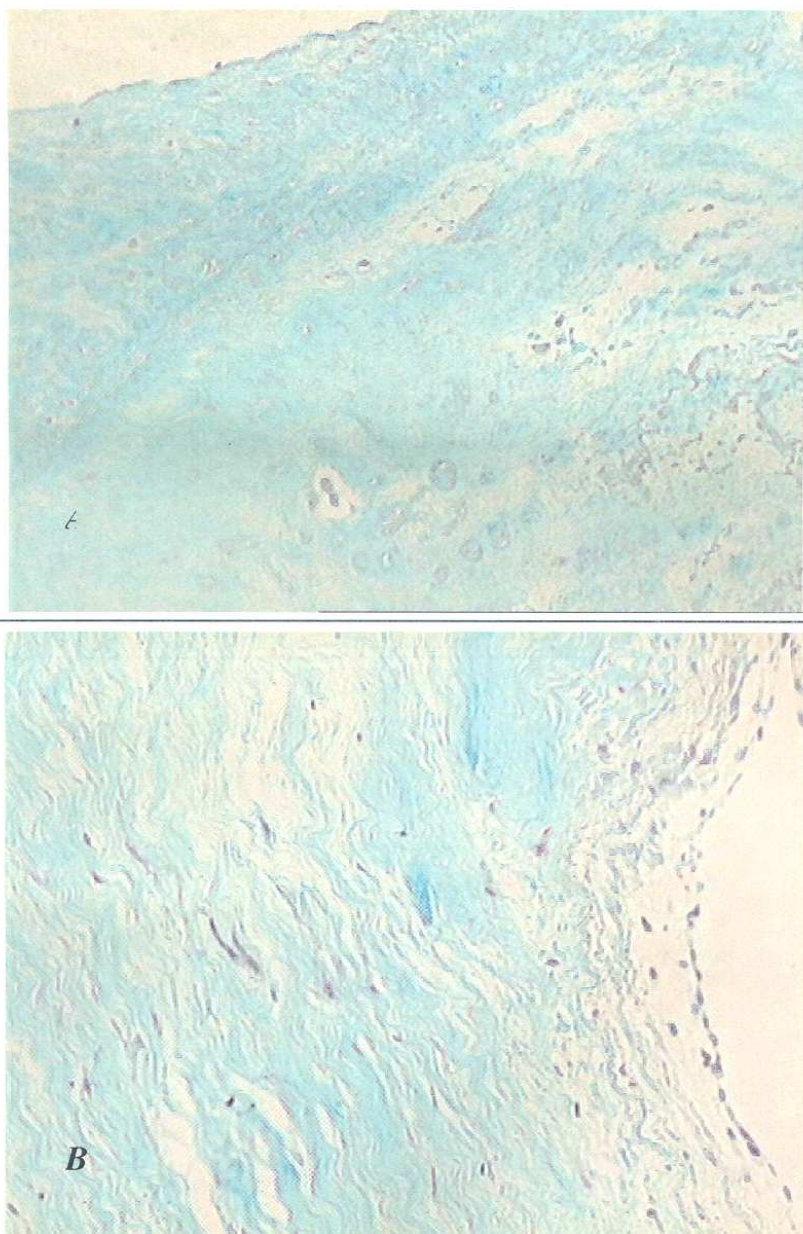


Figura 13 – Fotomicrografias de corte histológico, coloração Gomori, aumento 20x, conduto de artéria pulmonar. *A.* conduto da valva HomoC, observa-se degeneração das fibras colágenas. *B.* Conduto da valva HeteroD, observa-se fibras colágenas íntegras.

Anticorpos monoclonais para CD68: No grupo HomoC evidenciou-se a presença de raros monócitos distribuídos na camada adventícia e presença de macrófagos na camada média (figura 14.A). No grupo HeteroD observou-se presença de raros macrófagos na camada média e infiltrado mononuclear com predomínio para monócitos circundando os *vasa-vasorum* na camada adventícia (figura 14.A).

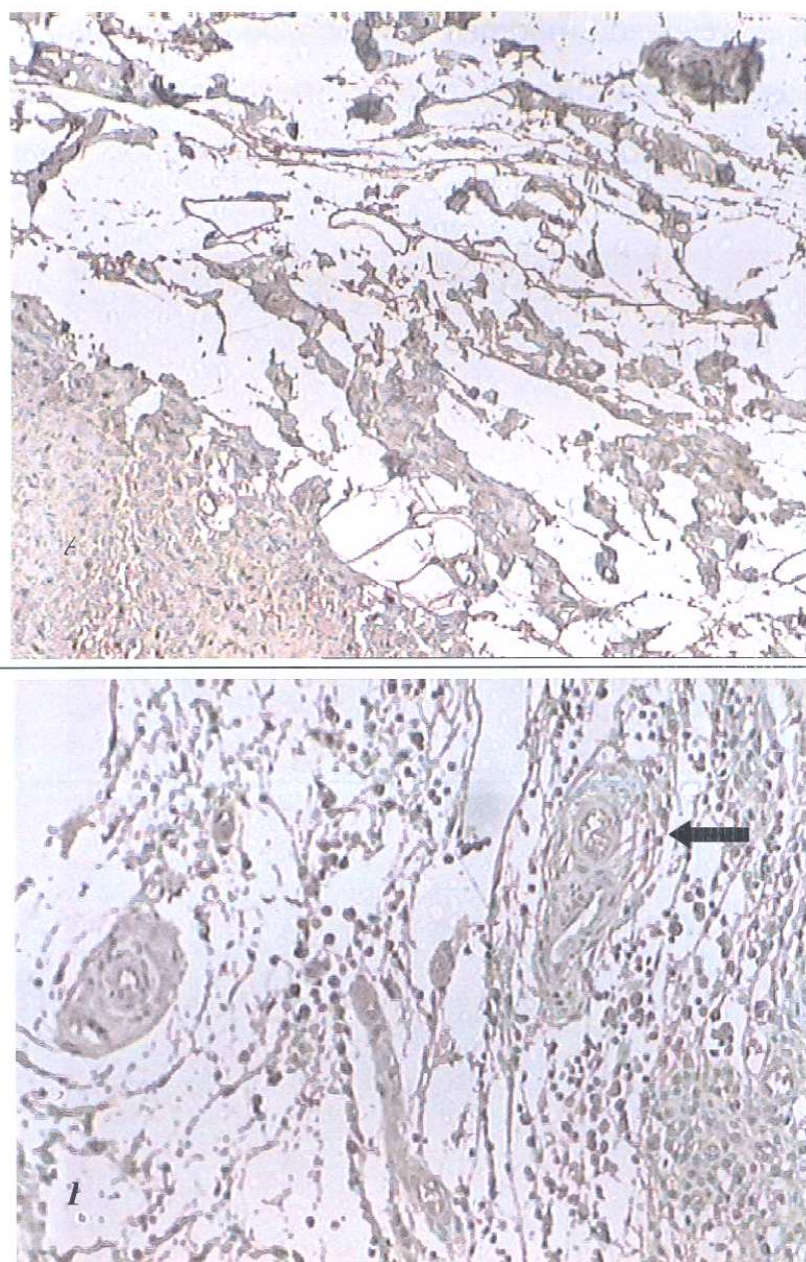


Figura 14 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para CD68, aumento 40x, camada adventícia da artéria pulmonar. **A.** Conduto valvar HomoC, observa-se raros monócitos na adventícia. **B.** Conduto valvar HeteroD observa-se presença de *vasa-vasorum* circundado por monócitos e outras células mononucleares.

Anticorpos monoclonais para Vimentina: Nos enxertos do grupo HomoC evidenciaram-se raras células de origem mesenquimal com morfologia para fibroblastos na camada média e na adventícia. Em duas valvas observaram-se quase ausência de células de origem mesenquimal no conduto (figura 15.A).

Nos enxertos do grupo HeteroD observaram-se células de origem mesenquimal predominantemente na camada média do conduto. Nessa região encontraram-se células com morfologia para fibroblastos, com núcleo grande e com um padrão confluyente de distribuição. Também observou-se menor quantidade fibroblastos na adventícia do enxerto quando comparados com a camada média. Na região sub-intimal encontraram-se raras células de origem mesenquimal (figura 15.B).

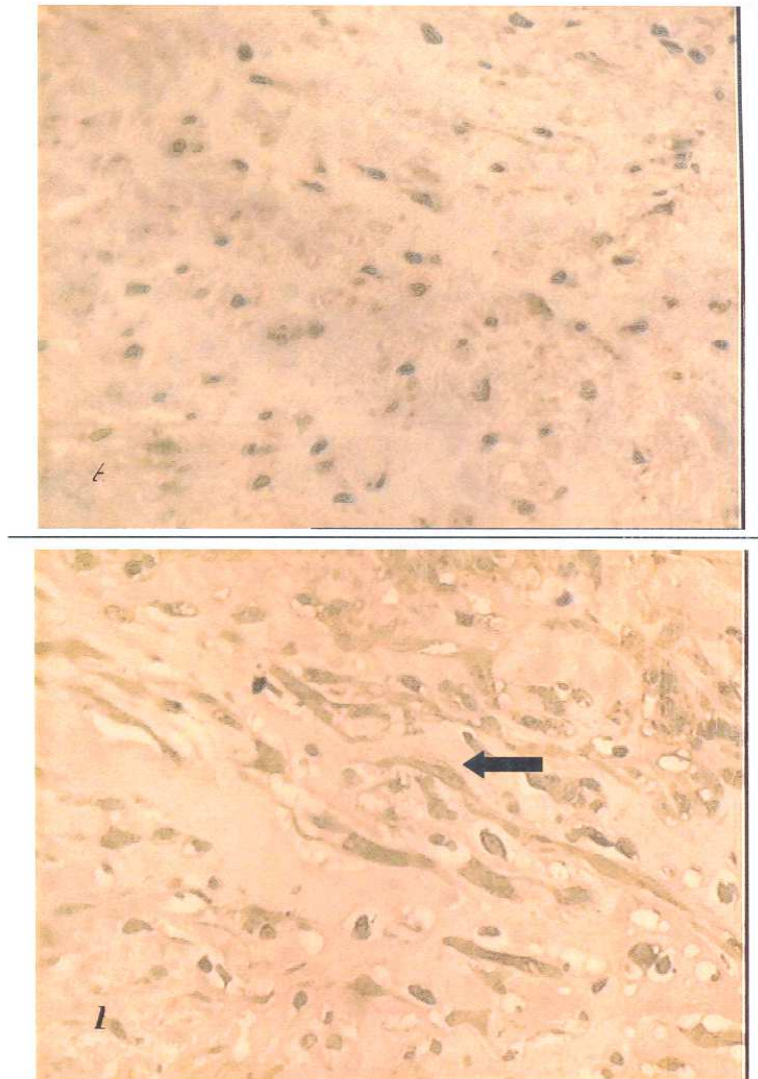


Figura 15 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para Vimentina, aumento 40x, camada média do conduto da artéria pulmonar. **A.** conduto valvar HomoC, observa-se ausência de células com morfologia para fibroblastos **B.** Conduto valvar HeteroD, observa-se células com morfologia para fibroblastos.

Anticorpos monoclonais para CD3: Evidenciaram-se nos condutos das valvas do grupo HomoC presença de linfócitos distribuídos predominantemente na camada adventícia. Na interface valvar doador-receptor, nas proximidades da linha de sutura proximal encontrou-se infiltrado linfocitário caracterizando reação inflamatória crônica (figura 16.A). Nas valvas do grupo HeteroD observou-se presença de raras células linfocitárias no conduto (figura 16.B).

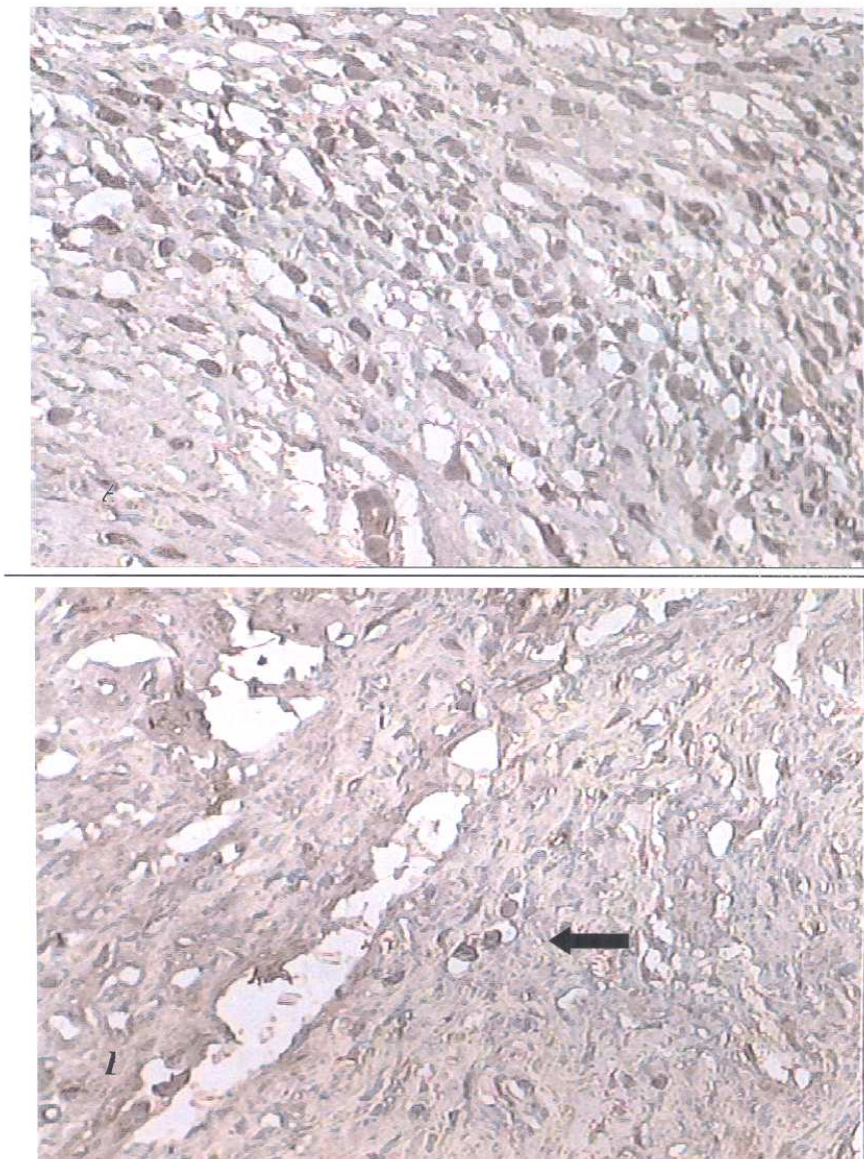


Figura 16 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para CD3, aumento 40x, camada média do conduto. **A.** Conduto valvar do grupo HomoC, observa-se presença de linfócitos. **B.** Conduto valvar do grupo HeteroD, observam-se raras células linfocitárias.

Anticorpo monoclonal para Fator VIII: Nos enxertos do grupo HomoC constatou-se em 4 valvas a presença de células endoteliais distribuídas em ilhas na camada íntima do enxerto e, em uma valva não se evidenciou a presença de células endoteliais (figura 17.a). No grupo HeteroD observaram-se, em três valvas, células endoteliais distribuídas em ilhas. Em 1 valva observaram-se raras células endoteliais (figura 17.b).

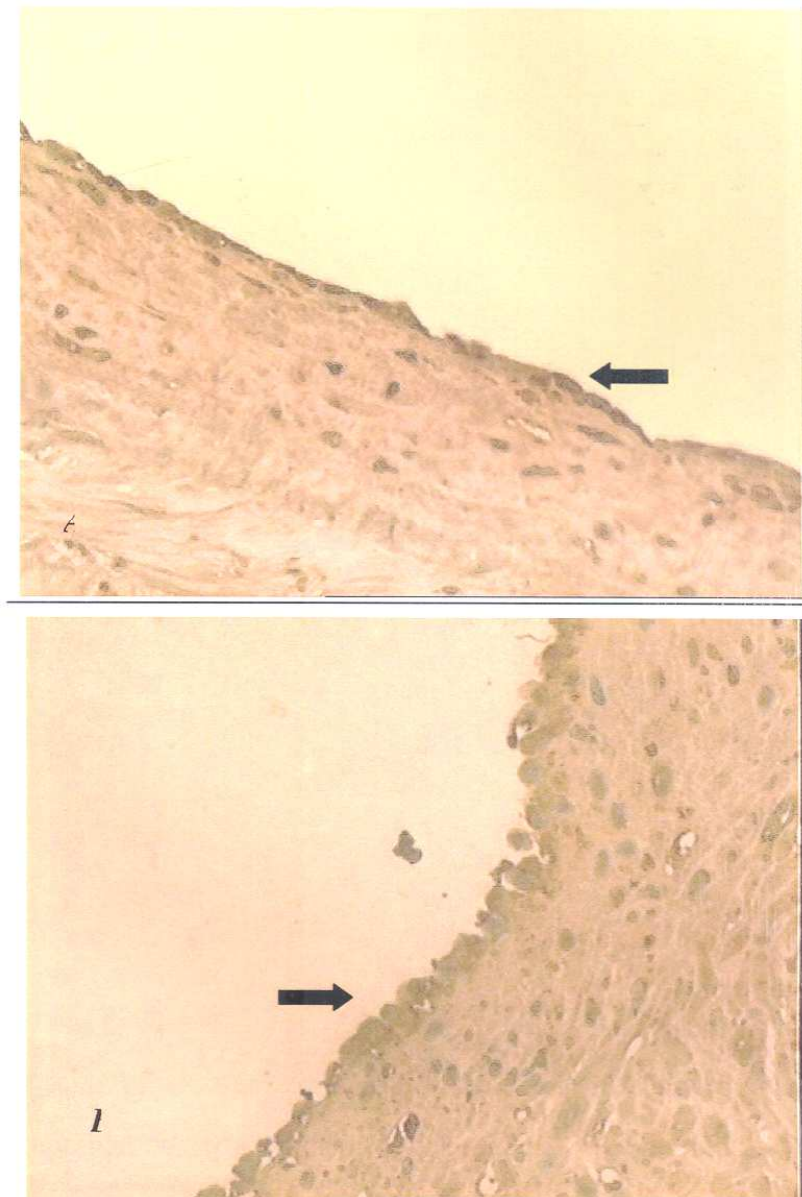


Figura 17 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para fator VIII, aumento 40x, camada íntima do conduto da artéria pulmonar. **A.** Conduto valvar do grupo HomoC evidenciando-se células endoteliais. **B.** Conduto valvar grupo HeteroD, observa-se células endoteliais.

4.4.2 Das Cúspides Valvares

Hematoxilina-eosina: Nos enxertos do grupo HomoC constatou-se em duas cúspides ausência completa de células e, em 3 cúspides, observaram-se raras células distribuídas de modo disperso (figura 18.A). Nos enxertos do grupo HeteroD observou-se a presença de células na base e no terço médio da cúspide. Constatou-se, também, que o terço distal apresentava raras células (figura 18.B).

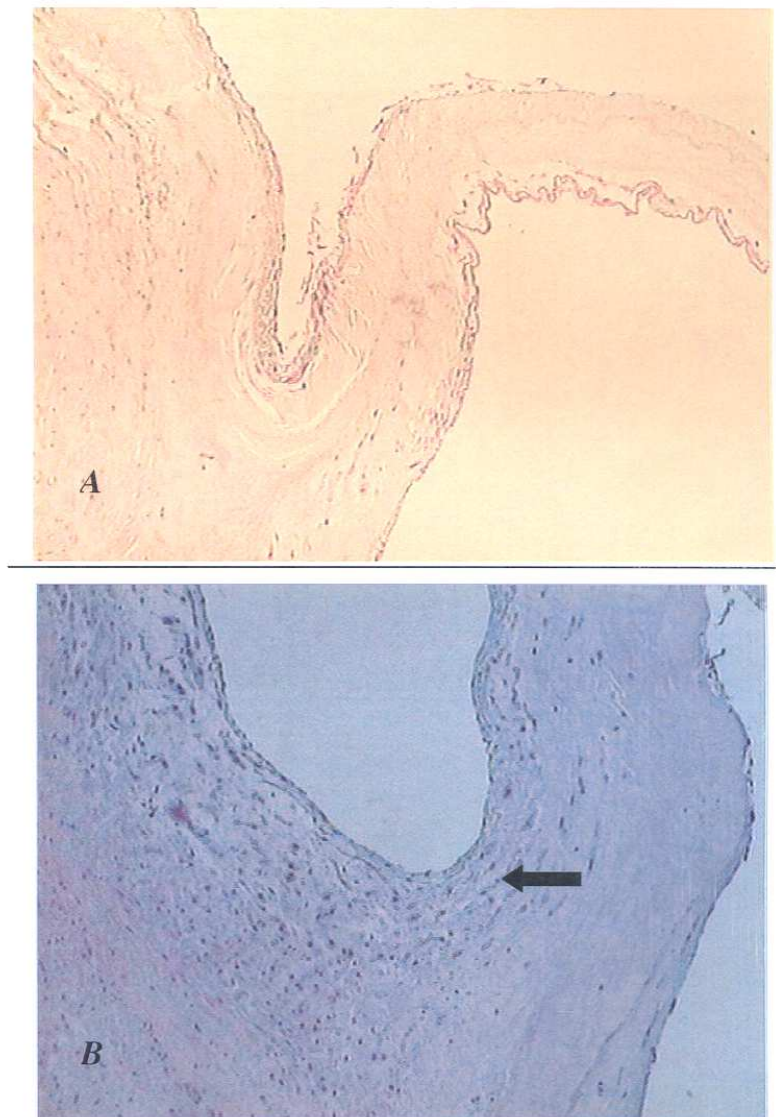


Figura 18 – Fotomicrografias de corte histológico, coloração H.E., aumento de 10x, cúspide da artéria pulmonar. **A.** Cúspide valvar do grupo HomoC, observa-se presença padrão acelular. **B.** Cúspide valvar do grupo HeteroD, observa-se presença de células intersticiais na base do conduto.

Coloração de Weigert: Nas valvas do grupo HomoC observaram-se fibras elásticas na base das cúspides, distribuídas predominantemente na face ventricular, as quais apresentavam-se, em sua maioria, rotas e com aspecto degenerativo (figura 19.A). Nas valvas do grupo HeteroD também observaram-se fibras elásticas distribuídas na face ventricular da cúspide, mantendo aspecto morfológico normal (figura 19.B).

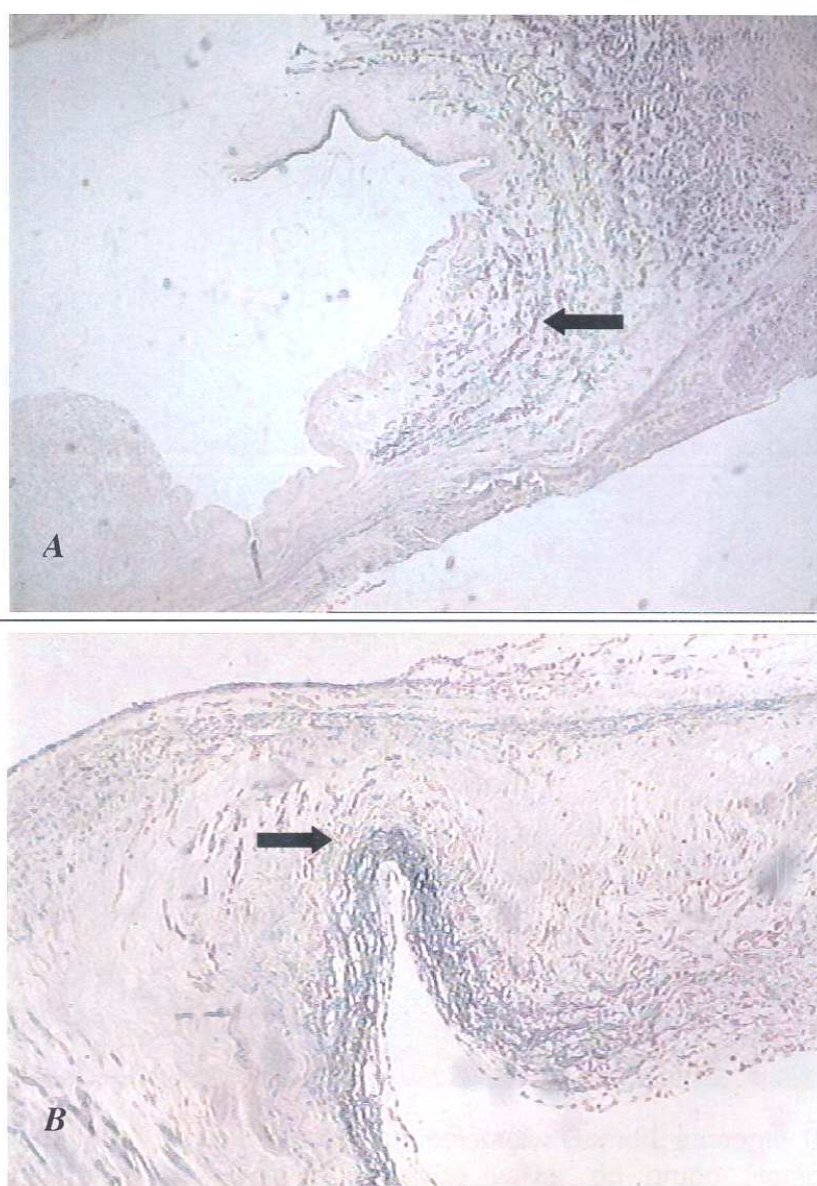


Figura 19 – Fotomicrografias de corte histológico, coloração Weigert, aumento 10X, base da cúspide da valva pulmonar. **A.** Cúspide valvar do grupo HomoC, observa-se presença de fibras elásticas rotas, distribuídas na face ventricular da cúspide. **B.** Cúspide valvar do grupo HeteroD, observam-se fibras elásticas íntegras.

Coloração de Gomori: Os enxertos do grupo HomoC apresentavam padrão amorfo de matriz extracelular com degeneração das fibras colágenas (figura 20.A). As valvas do grupo HeteroD encontravam-se, em sua maioria com aspecto morfológico normal (figura 20.B), exceto por uma valva que apresentava focos de degeneração na região sub-intimal

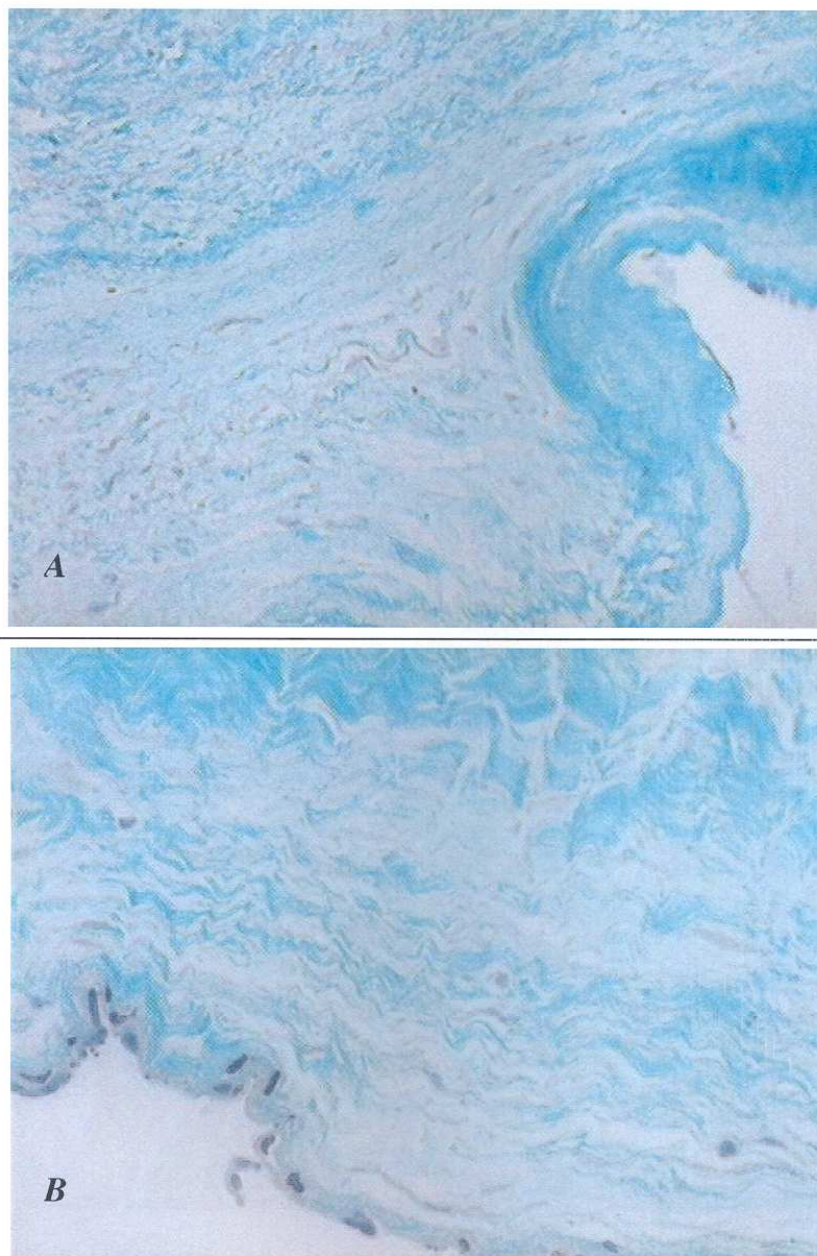


Figura 20 – Fotomicrografias de corte histológico, coloração Gomori, aumento 10x, cúspide da valva pulmonar. **A**. Observa-se na cúspide valvar do grupo HomoC a presença de degeneração das fibras colágenas **B**. Observa-se na cúspide valvar do grupo HeteroD fibras elásticas íntegras.

Anticorpos monoclonais para CD68: Nos enxertos do grupo HomoC observou-se a presença de macrófagos distribuídos de modo disperso (figura 21.A). Nos enxertos do grupo HeteroD evidenciou-se a presença macrófagos predominantemente na porção média da cúspide e sua inexistência na porção distal da cúspide. (figura 21.B) Nesta última região foram encontradas células com morfologia para granulócitos/neutrófilos.

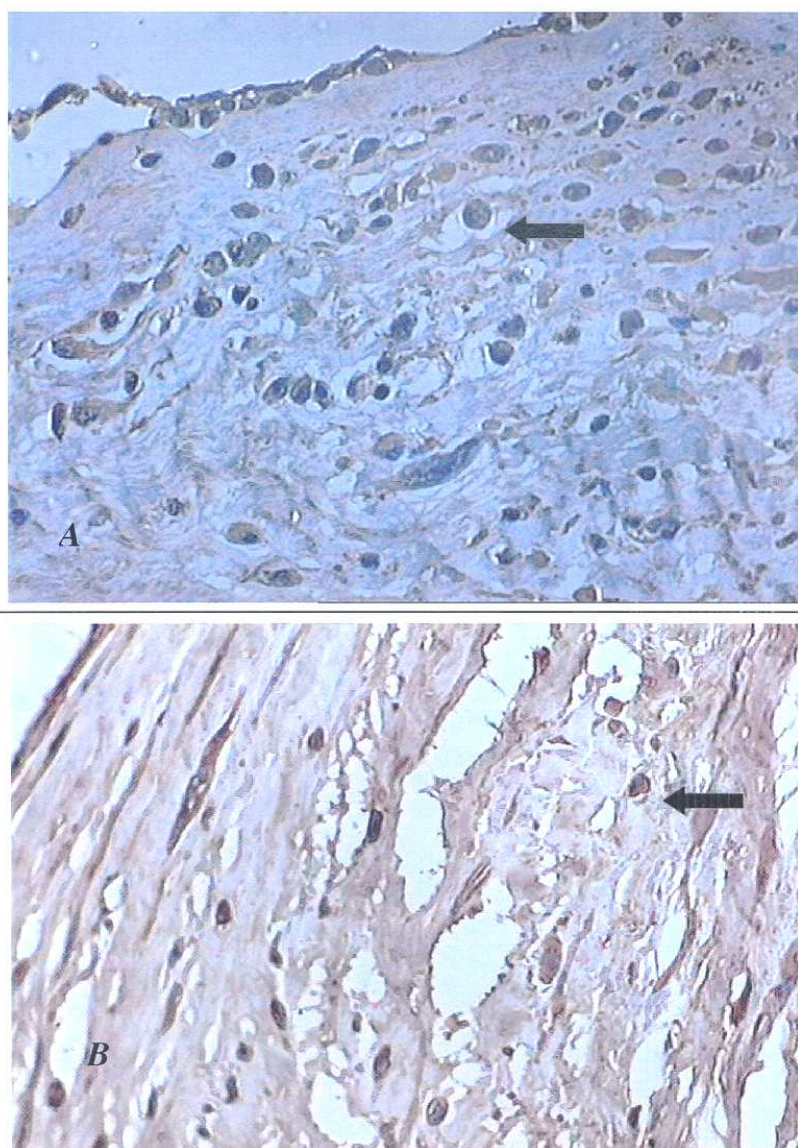


Figura 21 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para CD68, aumento 40x, cúspide da valva pulmonar. *A.* Observa-se na porção média da cúspide valvar do grupo HomoC presença de macrófagos. *B.* Observa-se na porção média da cúspide do grupo HeteroD presença de macrófagos.

Anticorpos monoclonais para Vimentina: Nos enxertos do grupo HomoC encontraram-se raras células de origem mesenquimal com morfologia de fibroblastos dispostos de modo disperso (figura 22.A). Nos enxertos do grupo HeteroD encontraram-se células de origem mesenquimal com morfologia para fibroblastos dispostos predominantemente na base e no terço médio da cúspide (figura 22.B).

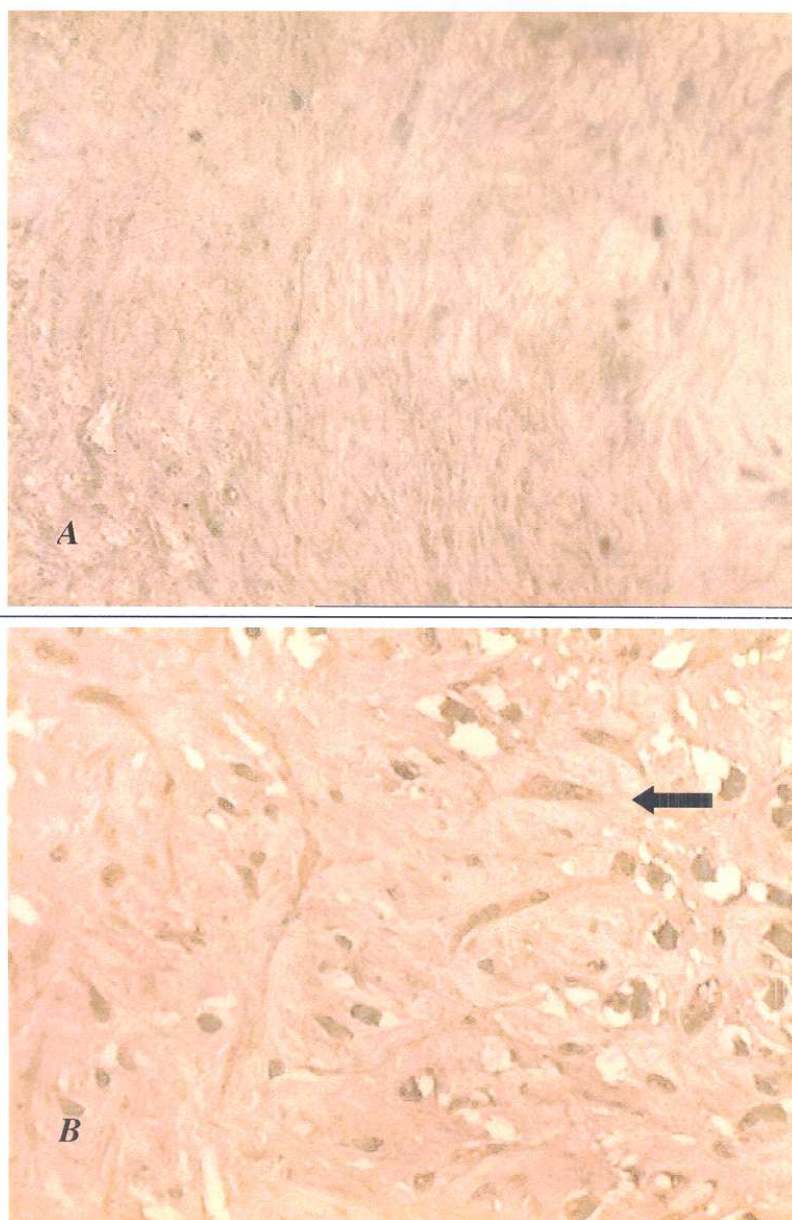


Figura 22 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para vimentina, aumento 40x, cúspide da valva pulmonar. **A.** Observa-se na porção basal da cúspide do grupo HomoC presença de raros fibroblastos. **B.** Observa-se na porção basal da cúspide do grupo HeteroD presença de fibroblastos.

Anticorpos monoclonais para CD3: Nas cúspides do grupo HomoC observou-se em 4 valvas a presença de linfócitos distribuídos de modo disperso (figura 23.A). Em uma valva observou-se a presença de raros linfócitos. Nos enxertos do grupo HeteroD encontraram-se linfócitos na região distal das cúspides e ausência na região média e basal. (figura 23.B).

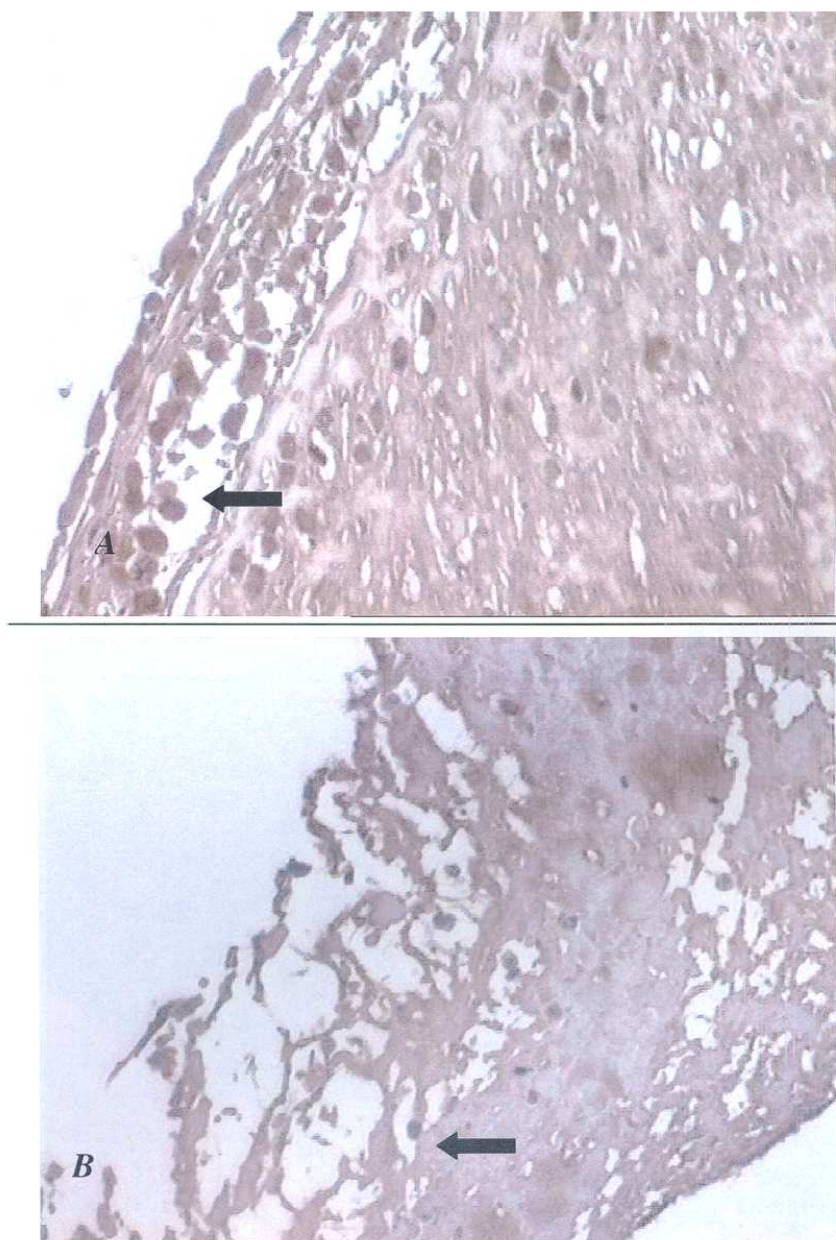


Figura 23 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para CD3, aumento 40x, cúspide da artéria pulmonar **A**. Porção média da cúspide valvar do grupo HomoC, observa-se presença de linfócitos. **B**. Porção distal da cúspide valvar do grupo HeteroD, observa-se presença de linfócitos.

Anticorpos para Fator VIII: Nos enxertos do grupo HomoC observou-se a presença de células endoteliais distribuídas em ilhas em 3 enxertos. Em dois deles não se observou a presença de células endoteliais (figura 24.A). Nas valvas do grupo HeteroD observou-se a presença de células endoteliais dispostas em ilhas em duas cúspides. Nas demais observou-se um padrão confluyente de células endoteliais (figura 24.B).

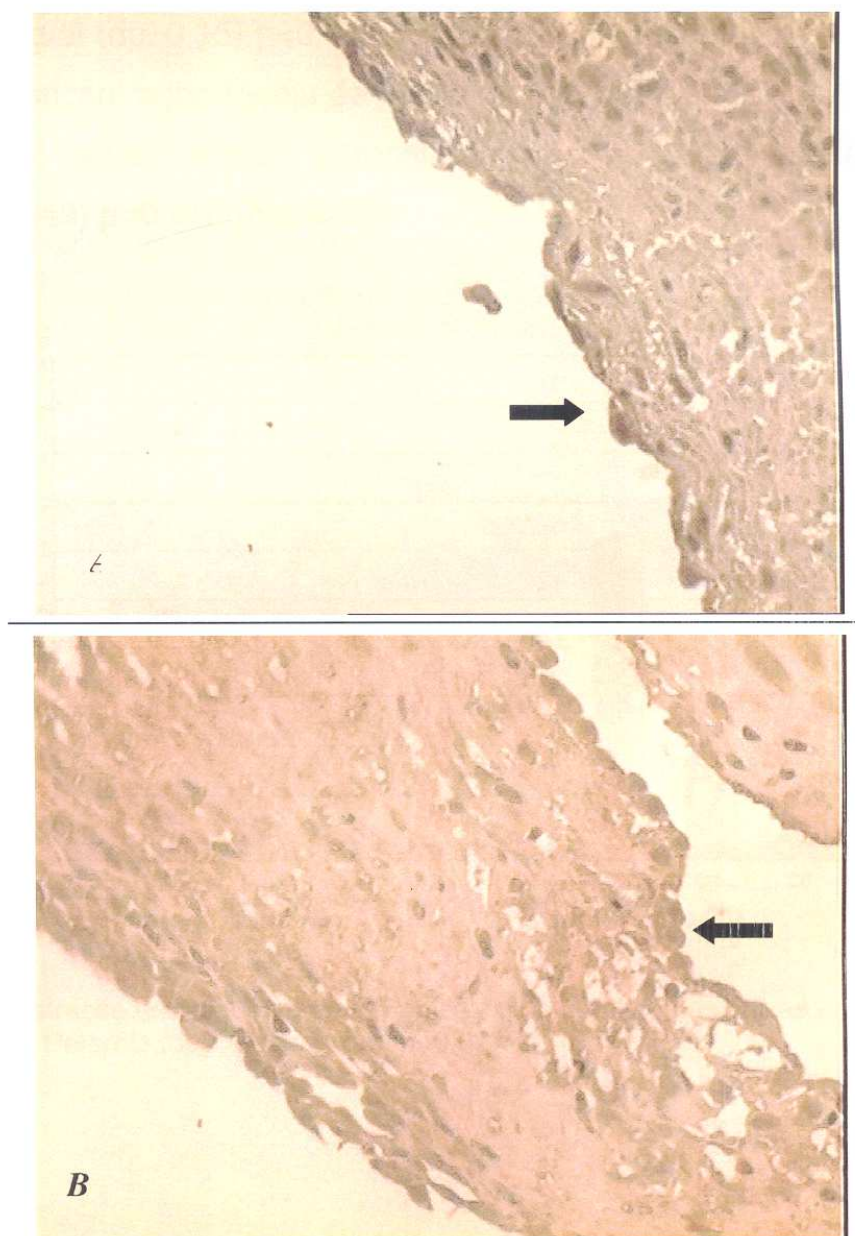


Figura 24 – Fotomicrografias de corte histológico, imunohistoquímica para Fator VIII, aumento 40x, camada íntima do conduto da artéria pulmonar. **A.** Observa-se cúspide valvar do grupo HomoC com presença de células endoteliais **B.** Observa-se cúspide valvar do grupo HeteroD com presença de células endoteliais dispostas de modo confluyente.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE CÁLCIO

A análise quantitativa de cálcio realizada por absorção atômica revelou maior concentração de cálcio nos condutos e cúspides do grupo HomoC quando comparada com as do grupo HeteroD. Os condutos das valvas do grupo HomoC apresentaram concentração média de cálcio de 1,59mg/dl (dp \pm 1,02), enquanto que os condutos das valvas do grupo HeteroD apresentaram concentração média de cálcio de 0,26mg/dl (dp \pm 0,15) p=0,014 (figura 25). As cúspides das valvas HeteroD apresentaram concentração média de cálcio de 0,49mg/dl (dp \pm 0,30), enquanto que as cúspides das valvas HomoC apresentaram concentração média de cálcio de 1,66mg/dl (dp \pm 0,49) p=0,016 (figura 26).

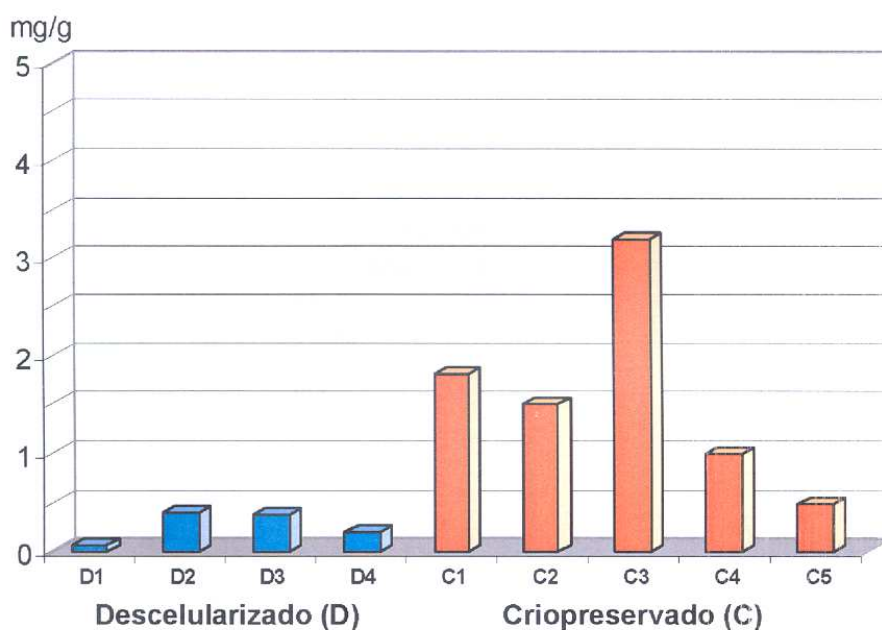


Figura 25 – Demonstração gráfica do conteúdo de cálcio do conduto das valvas do grupo HomoC (criopreservadas) e HeteroD (descelularizadas) p=0,014

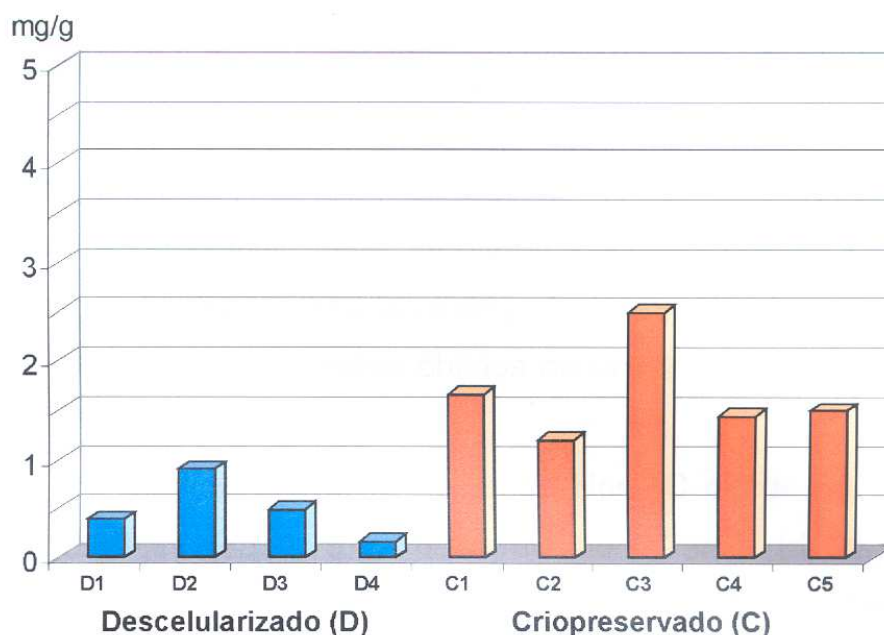


Figura 26 – Demonstração gráfica do conteúdo de cálcio nas cúspides das valvas do grupo HeteroD (descelularizadas) e HomoC (criopreservadas) $p=0,016$

Tabela 2 - Quantificação de cálcio das cúspides e condutos das valvas HetroD (decelularizadas) e HomoC (criopreservadas)

Descelularizado		Criopreservado	
Cusp	Cond	Cusp	Cond
0,4	0,07	1,66	1,81
0,9	0,4	1,2	1,5
0,5	0,38	2,5	3,2
0,16	0,2	1,44	0,99
		1,5	0,49

Cusp: Cúspide; Cond: Conduto; Qualificação de cálcio por absorção atômica em mg/g de tecido ($p= 0,016$)

4.6 ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA

Foram realizadas análise do diâmetro valvar, gradiente transvalvar médio e instantâneo máximo, velocidade de fluxo médio e análise da função valvar, no período de 30 dias de pós-operatório e tardiamente nos 30 dias que precederam o explante. No grupo HetroD (descelularizado) constatou-se que todos os enxertos mantiveram arquitetura valvar e função preservadas, ausência de espessamento valvar, insuficiência ou estenose. No grupo HomoC (criopreservado) observou-se

que um enxerto apresentava espessamento das cúspides e insuficiência valvar leve; os demais apresentavam boa função valvar. No grupo HomoC os gradientes transvalvares médios na ecocardiografia realizada com 30 dias após o implante foi em média 2,18mmHg ($dp\pm 1,39$) e no exame tardio 2,24mmHg ($dp\pm 0,97$). No grupo HeteroD o gradiente transvalvar médio na primeira ecocardiografia foi de 2,55mmHg ($dp\pm 1,47$) e no segundo exame de 2,56mmHg ($dp\pm 0,85$). Não houve diferença entre os grupos com relação aos gradientes obtidos na ecocardiografia imediata e tardia ($p>0,05$).

A velocidade média transvalvar no grupo HomoC obtida na ecocardiografia imediata foi de 0,69m/s ($dp\pm 0,16$) e na tardia de 0,73m/s ($dp\pm 0,13$). No grupo HeteroD foi 0,66m/s ($dp\pm 0,16$) e na tardia 0,7mmHg ($dp\pm 0,14$). Também não se encontrou diferença entre os grupos.

Com relação ao diâmetro valvar dos enxertos do grupo HeteroD, observou-se na análise ecocardiográfica com 8 meses um diâmetro médio de 27,5mm ($dp\pm 2,08$), aumento médio de 61% com relação ao diâmetro inicial de 17mm. No grupo HomoC, o diâmetro médio valvar com 8 meses de pós-operatório foi de 22,5mm ($dp\pm 1,44$), aumento médio de 29% com relação ao diâmetro inicial de 17mm. Observa-se assim um aumento significativo do diâmetro valvar dos enxertos descelularizados quando comparados com os criopreservados ($p<0,05$).

5 DISCUSSÃO

O substituto valvar cardíaco ideal deveria apresentar viabilidade celular e, conseqüentemente, potencial de regeneração celular e de crescimento, além de não ser suscetível ao processo de degeneração e calcificação. Atualmente, apenas os autoenxertos pulmonares apresentam tais características. Apesar dos homoenxertos criopreservados apresentarem boa função hemodinâmica, diversos estudos também demonstram que sua durabilidade é limitada. O'BRIEN, HARROCKS, STAFFORD, GARDNER, POHLNER, TESAR (2001) apresentaram estudo mostrando que a percentagem de pacientes livres de reoperação em 15 anos de evolução foi de 47% em pacientes entre 0-20 anos e 94% em pacientes acima de 60 anos.

O método de criopreservação mantém a viabilidade dos fibroblastos e das células endoteliais, as quais podem despertar reação imunológica por parte do receptor. As células endoteliais estão na superfície do enxerto, são mais antigênicas e estão envolvidas diretamente na resposta imunológica desencadeada. Estima-se que, após o processo de criopreservação, 14% das células endoteliais permanecem no enxerto, as quais são capazes de expressar antígenos de histocompatibilidade classe I e II, desencadeando, assim, um processo imunológico (LUPINETTI, TSAI, KNEEBONE, e BOVE, 1993). Evidências sugerem que em uma fase precoce do implante desenvolve-se agressão tecidual mediada por resposta imunológica transitória, demonstrada pela presença de moléculas de adesão leucocitária (ICAM) nos folhetos valvares (KOOLBERGEN, HAZEKAMP, HEER, BRUGGEMANS, HUYSMANS e DION, 2002).

Para minimizar essa reação imunológica pós-implante, vários métodos que removem as células dos enxertos valvares têm sido propostos. Os resultados da aplicação desses métodos têm mostrado grande variabilidade com relação ao grau de descelularização dos enxertos, a preservação da matriz colágena e o comportamento biológico em estudos experimentais. Atualmente não existe um consenso sobre qual o melhor método e o tipo de valva a ser utilizada. Alguns

autores optam pelo uso do homoenxerto e argumentam que as matrizes dos heteroenxertos possam expressar elementos antigênicos e despertar resposta humoral (ALLAIRE, BRUNEVALL, MANDET, BECQUEMIM e MICHEL, 1997). Outros preferem o uso dos heteroenxertos e sugerem que não existe diferença estrutural da matriz colágena entre as espécies. Também afirmam que os heteroenxertos apresentam maior facilidade de obtenção que os homoenxertos. (WILCOX et. al., 2005).

É imperativo que o uso de qualquer novo tipo de substituto valvar seja precedido de extensa avaliação *in vitro* e *in vivo*. Dentre os diversos modelos animais, é bem estabelecido que o implante de próteses em carneiros jovens fornece importantes informações não somente sobre o seu desempenho hemodinâmico, mas também sobre o comportamento biológico de diferentes tecidos quando na circulação sanguínea. O carneiro como modelo experimental para cirurgia cardíaca, apresenta a vantagem de ter anatomia cardiovascular semelhante à do homem, é facilmente adquirido e apresenta um manejo pós-operatório simples, o que reduz custos quando comparado a outros modelos animais. (ALI, KUMAR, BJORNSTAD e DURAN, 1996)

No presente estudo, utilizou-se o heteroenxerto porcino descelularizado com ácido deoxicólico e observou-se que o método manteve as propriedades estruturais da matriz colágena e proporcionou condições adequadas para o remodelamento do tecido por células intersticiais e endoteliais do receptor. Também constatou-se que as valvas apresentaram um bom perfil hemodinâmico e ausência de processo degenerativo.

KOOLBERGEN et. al.(2002), ao analisarem a histologia de 40 homoenxertos frescos, afirmam que após o implante as células do doador desaparecem rapidamente e são pobremente substituídas por células intersticiais e endoteliais do receptor. Nesse estudo pela coloração de H.E., observou-se que a estrutura trilaminar do conduto valvar estava alterada. Visualizou-se, também, uma menor quantidade de células intersticiais no conduto e na cúspide dos homoenxertos criopreservados quando comparados com o grupo descelularizado.

A análise da matriz extracelular demonstrou que as fibras elásticas das valvas criopreservadas apresentavam-se na sua maioria fragmentadas e com um

padrão compacto de distribuição. Observou-se, também, áreas de necrose e degeneração mucóide da matriz, a qual, devido à alterações morfológicas provavelmente não oferece um substrato apropriado para a reendotelização *in vivo* por células do receptor. NEVES et. al. (1997), ao estudar o mecanismo de degeneração dos homoenxertos em carneiros, relata que após um período inicial de reação inflamatória não específica existe uma progressiva degeneração da musculatura lisa, fragmentação das fibras elásticas, hialinização da matriz extracelular e fibrose. O estudo também demonstrou infiltrado linfocitário no conduto e nas cúspides dos homoenxertos explantados. Nesse estudo também observou-se a presença de linfócitos na cúspide e principalmente no conduto dos homoenxertos criopreservados, que pode sugerir que o processo de degeneração seja mediado por reação imunológica. KOOLBERGEN et. al. (2002) também relata que existe um significativo aumento dos linfócitos T nos condutos de homoenxertos criopreservados explantados entre 1 e 5 anos. Refere que o aumento do número de linfócitos inicia-se após o primeiro ano de implante conseqüente a um infiltrado inflamatório com predomínio para macrófagos que ocorre em uma fase mais precoce. Por outro lado, o estudo também sugere que a ausência de neutrófilos e depósito de complemento são indicativos que a redução no número celular dos enxertos possa estar mediada por processo de apoptose.

HOGAN et. al. (1996), estudando por cultura mixta de linfócitos e *crossmatch* 20 pacientes que receberam homoenxertos aórticos, demonstrou que todos os receptores formaram IgG e reações mediadas por células T a antígenos HLA do doador. Sugere que a reação imunológica a antígenos do doador pode destruir os fibroblastos viáveis da matriz e, na ausência de suas funções reparadoras, ocorre acelerada deteriorização da matriz colágena ocasionando degeneração e falência valvar. Considerando-se que o potencial de rejeição de órgãos implantados está diretamente associado a um infiltrado mononuclear linfocitário local e que os linfócitos T CD4 apresentam potencial de reconhecer moléculas HLA classe II existentes em células endoteliais, acreditamos que o infiltrado linfocitário encontrado nas valvas criopreservadas seja conseqüente a uma substancial resposta imunológica a antígenos do doador.

Nas cúspides dos homoenxertos criopreservados observou-se um padrão amorfo de matriz extracelular indicando um processo de degeneração da matriz e uma pequena quantidade de células distribuídas de modo disperso, compostas predominantemente por linfócitos e plasmócitos. Curiosamente evidencia-se a presença de células endoteliais revestindo de modo focal e por vezes confluyente, a camada íntima e segmentos da cúspide.

JONAS, ZIEMER, BRITTON e ARMIGER, 1988 em estudo experimental com valvas criopreservadas em carneiros, também relata a presença de células endoteliais nas cúspides valvares diferindo dos achados de autópsia de homoenxertos criopreservados em humanos nos quais não se observa a presença de células endoteliais (KOOLBERGEN et. al., 2002). Acreditamos que o fato de encontrarmos células endoteliais nas cúspides e nos condutos valvares criopreservados, deva-se à diferença no comportamento biológico do modelo animal quando comparado com o humano.

STEINHOFF et. al. (2000) afirmam que é importante a manutenção das proteínas da matriz extracelular, especialmente as ligandinas de adesão celular e receptores de integrina, para que a matriz mantenha suas propriedades fisiológicas após o processo de descelularização. Também relata que as valvas descelularizadas que não passam por um processo de recelularização *in vitro* apresentam uma menor migração de miofibroblastos e não são capazes de sintetizar procolágeno e, assim, reorganizar a matriz extracelular.

Porém, em nosso estudo, evidenciamos nas valvas descelularizadas um padrão de matriz extracelular organizada, com fibras elásticas e colágenas íntegras e características de matriz jovem, sugerindo um potencial de remodelamento. Acreditamos que estudos que incluam coloração imunohistoquímica para pró-colágeno tipo I sejam importantes para confirmar estes achados.

GRAUSS, HAZEKAMP, VLIET, GROOT e DeRUITER (2003) analisaram a matriz de homoenxertos aórticos descelularizadas com SDS implantados na aorta descendente de ratos e também constataram que não havia perda ou degeneração das fibras elásticas e colágenas do conduto após explante com 21 dias.

LEYH et al. (2003) estudaram heteroenxertos porcinos descelularizados em carneiros e constataram que a matriz descelularizada oferece um substrato

adequado para a reendotelização *in vivo*, e que as mesmas apresentavam-se repopuladas por células endoteliais, miócitos e fibroblastos do receptor após um período de 24 semanas.

ELKINS et al. (2001) implantaram 9 heteroenxertos porcinos descelularizados na via de saída do ventrículo direito de carneiros e constataram no explante com 12 semanas que as porções média e proximal da cúspide encontravam-se densamente povoadas por células do receptor, enquanto que a porção distal da cúspide mantinha ausência de células. A imagem histológica sugere um padrão de migração celular, da porção basal em direção à margem livre da cúspide, com substituição progressiva das células inflamatórias por células intersticiais. A caracterização celular das cúspide suporta esta evidência, pois na base da cúspide encontraram um menor número de células inflamatórias e presença de células intersticiais, enquanto que na porção média havia uma menor quantidade de células intersticiais e um predomínio de células inflamatórias compostas principalmente por granulócitos, caracterizando um processo inflamatório mais recente.

Em nosso estudo observamos a presença de células intersticiais na porção proximal e média da cúspide, com predomínio de fibroblastos e presença de raros macrófagos. A porção distal da cúspide apresentava-se quase que acelular com a presença de poucas células inflamatórias, predomínio para granulócitos. Ao contrário, não observamos a presença de granulócitos na porção média da cúspide mas sim, uma fase mais adiantada de remodelação celular caracterizada pela presença de células intersticiais com morfologia de fibroblastos. Acreditamos que essa diferença seja devido aos explantes terem sido feitos em média com 280 dias, representando uma fase mais madura do processo de reendotelização. Evidenciamos também uma menor quantidade de macrófagos na base de implantação da cúspide, quando comparado com a porção média da mesma. Esses achados corroboram com a hipótese de um padrão ascendente de remodelamento inflamatório e migração celular na cúspide da valva descelularizada.

ELKINS et. al. (2001), analisando os achados histológicos de heteroenxertos descelularizadas com 3 meses de evolução referem que o processo inflamatório encontrado na matriz em uma fase inicial do implante não resulta em degeneração do enxerto. Sugerem que as células inflamatórias ajudam a preparar o tecido para

subseqüente repopulação celular por fibroblastos e células musculares lisas. O estudo também demonstra que a porção média da cúspide representa uma fase inicial do remodelamento valvar, onde é encontrada uma população de macrófagos, que segue a uma resposta inflamatória inespecífica composta por granulócitos. À medida que esta reação diminuiu, deu-se início a uma fase mais madura a qual é representada pela população de células intersticiais representadas por fibroblastos e miofibroblastos encontradas na base da cúspide.

O'BRIEN, GOLDSTEIN, WALSH, BLACK, ELKINS e CLARKE (1999) em estudo experimental, implantaram, na via de saída do ventrículo direito de carneiros, valvas porcinas sem suporte que passaram por processo de descelularização e criopreservação. Constataram na análise histológica uma forte evidência que as células inflamatórias dispostas na matriz da cúspide de modo não focal representaram um processo de remodelamento tecidual e não uma resposta imunológica.

Nos heteroenxertos descelularizados, encontramos a presença de um padrão confluyente de células endoteliais, principalmente, na base e porção média da cúspide. NUMATA, et. al. (2004) em estudo experimental com heteroenxertos descelularizados com Triton X e explantados com 30 dias, também encontraram a presença de células endoteliais dispostas em ilhas de modo confluyente. STEINHOFF et. al. (2000) ao estudarem o comportamento biológico dos homoenxertos descelularizados com tripsina, encontraram um padrão confluyente de células endoteliais na cúspide após três meses de implante e sugerem que nos heteroenxertos descelularizados os achados podem ser semelhantes. ELKINS et.al (2001), analisando a histologia de heteroenxertos descelularizados com Tripsina, ao contrário do sugerido, não encontraram a presença de células endoteliais nas cúspides das valvas explantadas com 160 dias de evolução. GRAUSS et. al. (2005), em estudo comparativo do efeito de diversos métodos de descelularização na matriz extracelular, refere que valvas tratadas com Triton X-100 ou Tripsina resultam em perda acentuada de fibronectina e laminina as quais desempenham importante papel na adesão, crescimento e migração celular. O estudo conclui que o potencial de reendotelização *in vivo* é dependente de possíveis danos causados à matriz pelos diferentes métodos de descelularização.

Nosso estudo também demonstrou um padrão de repovoamento celular no conduto dos heteroenxertos descelularizados, evidenciando uma maior quantidade de células na adventícia e na camada média, quando comparados com a camada íntima do enxerto. Na adventícia do enxerto descelularizado, há grande quantidade de células inflamatórias com predomínio para monócitos, circundando os *vasa-vasorum*, o que suporta a hipótese de um processo de remodelamento celular proveniente desta região. ELKINS et al. (2001) sugerem que o remodelamento celular observado no conduto é proveniente de vasos neoformados na camada adventícia e também por contigüidade, do miocárdio adjacente.

Outro achado relevante é o padrão da matriz extracelular da adventícia e da camada média, onde as fibras colágenas e elásticas íntegras, dispostas de modo aleatório e circundadas por substância líquida, conferem à organização um aspecto de matriz jovem. Na adventícia e predominantemente na camada média do enxerto encontramos a presença de células com morfologia para fibroblastos apresentando como característica núcleos grandes, sugestivo de células jovens. Observamos no conduto da valva descelularizada a presença de um padrão focal, em ilhas, de células endoteliais distribuídas ao longo da superfície valvar. NUMATA et al. (2004) ao estudarem experimentalmente o repovoamento celular dos homoenxertos porcinos descelularizados relatam que a superfície do enxerto também encontra-se repopulada por células endoteliais do receptor em torno de um mês após o implante.

Uma vez que o autor relata a presença de células endoteliais na superfície valvar com um mês de implante, acreditamos ser necessária a análise mais precoce do padrão histológico das valvas descelularizadas para melhor compreendermos o mecanismo de reendotelização.

Com relação a quantificação de cálcio por meio de absorção atômica, encontramos maior calcificação nos homoenxertos criopreservados quando comparados com os heteroenxertos descelularizados. LEYH et al. (2003) afirmam que os debris e restos celulares, bem como os organofosforados induzem à calcificação precoce. A fonte dos organofosforados pode derivar dos debris celulares e restos de DNA.

O'BRIEN et al. (1999), em estudo com heteroenxertos descelularizados afirmam que a matriz da cúspide descelularizada não calcificou, sugerindo que

possa haver um componente imunológico que resulte na calcificação dos homoenxertos criopreservados. STTEINHOFF et. al. (2000) implantaram 4 homoenxertos descelularizados em estudo experimental em carneiros sendo que uma valva apresentou calcificação que ocorreu predominantemente na área subvalvar. Sugeriram que esse achado pode ser conseqüência da descelularização incompleta no componente muscular do enxerto. Também associaram a calcificação na área subvalvar com o achado histológico de um infiltrado leucocitário intenso em uma fase precoce após o implante, indicando a reação inflamatória crônica como mecanismo de base para a calcificação.

No presente estudo também observamos a presença de um maior número de células inflamatórias com predomínio para linfócitos na região subvalvar e presença de pequenos focos de calcificação próximos à linha de sutura. Supõe-se que o processo inflamatório encontrado nesta região, seja secundário ao trauma cirúrgico provocado pela linha de sutura e a calcificação distrófica, um processo reacional ao trauma. Também concordamos que a descelularização não proporciona uma completa retirada das células na parte muscular no enxerto, sendo esta, outra possível causa para os focos de calcificação encontradas nesse local.

Na análise ecocardiográfica, os dois grupos apresentaram um bom desempenho hemodinâmico, demonstrando que todos os enxertos apresentavam-se livres de disfunção valvar moderada ou severa no período de 8 meses pós implante, sendo que o maior valor registrado para gradientes médios foi inferior à 4,1mmHg. GOLDSTEIN et. al. (2000) em estudo experimental com valvas descelularizadas com Tripsina em ovinos observaram na ecocardiografia com 360 dias de pós-operatório gradientes médios entre 8 e 12mmHg e referem que o aumento nos gradientes nesse período foi secundário ao crescimento dos carneiros gerando uma desproporção entre a valva implantada e o sítio receptor.

Com relação ao diâmetro valvar analisado por ecocardiografia, observamos um aumento significativo do mesmo nos heteroenxertos descelularizados quando comparados com os homoenxertos criopreservados. Analisando o diâmetro da valva no momento do explante constatou-se que os valores obtidos no grupo HeteroD foram maiores que no grupo HomoC. A ausência de insuficiência valvar central na análise ecocardiográfica, a preservação da matriz extracelular, constatada por meio

6 CONCLUSÕES

1. Os heteroenxertos foram repovoados por células do receptor, enquanto os homoenxertos tornaram-se praticamente acelulares;
2. O infiltrado linfocitário nos heteroenxertos descelularizados foi qualitativamente menos intenso do que nos homoenxertos criopreservados;
3. As células que repovoaram os heteroenxertos pulmonares porcinos descelularizados apresentaram aspecto morfológico funcional, visto a presença de matriz extracelular com características jovens, com adequada preservação das fibras colágenas e elásticas, evidenciadas pelas colorações de Weigert, Gomori e vimentina;
4. O aumento no diâmetro dos heteroenxertos descelularizados foi significativamente maior do que os homoenxertos criopreservados, embora estudos mais detalhados ainda sejam necessários para a total compreensão deste fenômeno;
5. O conteúdo de cálcio encontrado nas cúspides e nos condutos das valvas descelularizadas foi significativamente menor do que nas valvas criopreservadas;

Considerando esses achados concluímos que o comportamento biológico dos heteroenxertos porcinos pulmonares descelularizados, quando implantados na via de saída do ventrículo direito de carneiros, por período de até 280 dias, foi diferente dos homoenxertos criopreservados implantados sob as mesmas condições.

Allaire E, Bruneval P, Mandet C, Becquemin JP, Michel JB. The immunogenicity of the extracellular matrix in arterial xenografts. *Surgery*. 1997;122:73-81.

Ali ML, Kumar SP, Bjornstad K, Duran MG. The sheep as an animal model for heart valve research. *Cardiovascular Surgery*. 1996;4:543-549

Armiger LC. Viability studies of human valves prepared for use as allografts. *Ann Thorac Surg*. 1995;60:S118-S121.

Barrat-Boyes BG. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax*. 1964;19:131-150.

Barrat-Boyes BG, Roche AHG, Subramanyan R, Pemberton JR, Whitlock ML. Long-term follow-up of patients with the antibiotic-sterilized aortic homograft valve inserted freehand in the aortic position. *Circulation*. 1987;4:768-777.

Carrel A. The preservation of tissues and its applications in surgery. *Clin Orthop Relat Res*. 1912;(278):2-8

Dohmen PM, Costa F, Lopes SV, Yoshi S, Souza FP, Vilani R, Konertz W. Results of a decellularized porcine heart valve implanted in a juvenile sheep model. *Heart Surg Forum*. 2005;8(2):100-104.

Duran CG, Gunning AJ. A method for placing a total homologous aortic valve in the subcoronary position. *The Lancet*. 1962; 2: 488-489

Elkins RC, Goldstein S, Hewill CW, Walsh Sp, Dawson PE, Ollerenshaw JD, Black KS, Clarke DR, O'Brien MF. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2001;13 (suppl 1): 87-92.

Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, Black KS, O'Brien MF. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. *Ann Thorac Surg*. 2000;70:1962-1969.

Grauss RW, Hazekamp MG, van Vliet S, Gittenberger-de Groot, DeRuiter MC. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2003;126 Nr. 6:256-262.

Grauss RW, Hazekamp MG, openhuizen F, van Musteren CJ, Groot ACG, DeRuiter M. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *European journal of Cardio-thoracic Surg*. 2005;27:566-571.

Gross RE, Bill AH, Peirce EC. Methods for preservation and transplantation of arterial grafts. *Surg Gynecol Obstet*. 1949;88:689.

Heimbecker RO, Aldrige HE, Lemire G. The durability and fate of aortic valve grafts. An experimental study with a long term follow-up of clinical patients. *J Cardiovasc Surg*. 1968; 9(6): 511-7.

Hogan P, Duplock L, Green M, Smith S, Gall KL, Frazer IH, O'Brien MF. Human aortic valve allografts elicit a donor-specific immune response. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996;112:1260-1267.

Jonas RA, Ziemer G, Britton L, Armiger LC. Cryopreserve and fresh antibiotic-sterilized valved aortic homograft conduits in a long-term sheep model. *J Thorac Cardiovasc.* 1988;96:746-755.

Kerwin AJ, Lenkei SC, Wilson DR. Aortic-valve homograft in the treatment of aortic insufficiency. *The New England Journal of Medicine.* 1962;26:852-857.

Koolbergen DR, Hazekamp MG, Heer E, Bruggemans EF, Huysmans E, Dion RA, Bruijn JA. The pathology of fresh and cryopreserved homograft heart valves: An analysis of forty explanted homograft valves. *J Thoracic Cardiovasc Surg.* 2002;124:689-697.

Lam CR, Aram HH, Munnell ER. An experimental study of aortic valve homografts., *Surg Gynecol Obstet.* 1952;94:129-135.

Leyh RG, Wilhelmi M, Rebe P, Fischer S, Kofids T, Haverich A, Mertsching H. In vivo repopulation of xenogeneic and allogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation. *Ann Thorac Surg.* 2003;75:1457-1463.

Lupinetti FM, Tsai TT, Kneebone JM, Bove EL. Effect of cryopreservation on the presence of endothelial cells on human valve allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;106:912-917.

Malone JM, Brendel K, Duhamel RC, Reinert RL. Detergent-extracted small-diameter vascular prostheses. *J Vasc Surg.* 1984;1:181-191

Merin G, McGoon DC. Reoperation after insertion of aortic homograft as a right ventricular outflow tract. *The Annals of Thoracic Surgery.* 1973;16:122-126.

Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Structure-function correlations in cryopreserved allograft cardiac valves. *Ann Thorac Surg.* 1995;60:S108-S113.

Murray G. Aortic. Aortic valve transplants. *Angiology.* 11:99-102,1960

Neves JP, Gullbenkian S, Ramos T, Martins AP, Caldas MC, Mascarenhas R, Guerreiro M, Ferreira AM, Santos R, Monteiro C, Melo JQ. Mechanisms underlying degeneration of cryopreserved vascular homografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997;113:1014-1021.

Numata S, Fujisato T, Niwaya K, Ishibashi-Ueda H, Nakatani T, Kitamura S. Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: Comparison with cryopreserved allograft. *The Journal of Heart Valve Tissue.* 2004;13:984-990.

O'Brien MF, Stafford G, Gardner M, Pohlner P, McGiffin D, Johnston N, Brosnan A, Duffy P. The viable cryopreserved allograft aortic valve. *J Cardiac Surg.* 1987(a);2 (suppl 1):153-167.

O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH, Pohlner PG, McGiffin DC, Kirklin JW. A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987(b);94:812-823.

O'Brien MF, Goldstein S, Walsh S, Black KS, Elkins R, Clarke D. The synergraft valve: a new acellular (nongluteraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 1999;Vol 11, N. 4 (Suppl 1):194-200.

O'Brien MF, Harrocks E, Stafford EG, Gardner MAH, Pohlner PG, Tesar PJ, Stephens, F. The Homograft Aortic Valve: a 29-year, 99,3% follow up of 1,022 valves replacements. *J Heart Valve Dis.* 2001; 10:N.3:334-345

Oei FBS, Stegmann APA, Van der Ham F, Zondervan PE, Vaessen LMB, Baan CC, Weimar W, Bogers AJJC. The presence of immune stimulatory cells in fresh and cryopreserved donor aortic and pulmonary valve allografts. *J Heart Valve Dis.* 2002; 11(3):315-24; 325.

Penta A, Qureshi S, Radley-Smith R, Yacoub MH. Patient status 10 or more years after 'fresh' homograft replacement of the aortic valve. *Circulation.* 1984;70 (Suppl I),I-182.

Peterseim DS, Cen Y, Cheruvu S, Landolfo K, Bashore TM, Lowe JE, Wolfe WG, Glower DD. Long-term outcome after biologic versus mechanical aortic valve replacement in 841 patients. *J Thorac Cardiovasc.* 1991;117:890-897.

Ross DN. Homograft replacement of the aortic valve. *The Lance.* 1962;8:487.

Ross DN, Martelli V, Wain WH. Allograft and autograft valves used for aortic valve replacement. In Ionescu MI (ed): *Tissue Heart Valves.* Boston: Butterworth, 1979. 127-172.

Salomon RN, Friedman GB, Callow AD, Payne DD, Libby P. Cryopreserved aortic homografts contain viable smooth muscle cells capable of expressing transplantation antigens. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;106:1173-1180.

Schoen, F.J.; Hirsch, D.; Bianco, R.W.; Levy, R.J. Onset and progression of calcification in porcine aortic bioprosthetic valves implanted as orthotopic mitral valve replacements in juvenile sheep. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg,* 1994;108:880-887.

Stenhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, Pethig K, Haverich A, Bader A. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: In vivo restoration of valve tissue. *Circulation.* 2000;102 (suppl 19): III-50-III-55.

Thompson R, Yacoub M, Ahmed M, Somerville W, Towers M. The use of "fresh" unstented homograft valves for replacement of the aortic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1980;79:896-903.

Yankah AC, Wottge HU, Muller-Hermelink HK, Feller AC, Lange P, Wessel U, Dreyer H, Bernhard A, Muller-Ruchholtz W. Transplantation of aortic and pulmonary allografts, enhanced viability of endothelial cells by cryopreservation, importance of histocompatibility. *Int J Organs.* 1987;3:169-172.

Wain WH, Greco R, Ignegeri A. et al: Fifteen years experience with 615 homograft and autorograft aortic valve replacements. *Int J Artif Organs.* 1980;3:169-172

Wilcox HE, Korossis SA, Booth C, Watterson KG, Kearney JN, Fischer J, Ingham E. Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *The Journal of Heart Valve Disease.* 2005;14:228-237.

Wilson GJ, Courtman DW, Klement P, Lee JM, Yeger H. Acellular matrix: A biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement. *Ann Thorac Surg.* 1995;60:S353-358

NORMAS ADOTADAS

ABSTRACT

Introduction: The homografts, when used in valvar replacement surgeries, have suitable hemodynamic function and low thromboembolism risk. Studies suggest that homografts elicit immunological reaction against the donor cells. In order to decrease the antigenicity, it is proposed the use of decellularized homografts. **Purpose:** This study evaluated cryopreserved homografts (group HomoC) and porcine heterografts decellularized with deoxicolic acid (group HeteroD) implanted in the right ventricular outflow tract of juvenile sheep. **Method:** Ten juvenile sheep were used and divided into two groups. In the five animals of group HomoC, cryopreserved pulmonary homografts were implanted. In the five sheep of the group HeteroD decellularized porcine pulmonary heterografts were implanted. The technique used in the decellularization process was deoxicolic acid 1% and ethanol 70%. The animals were followed up for 280 days, with echocardiography in the 30° post operative day and lately 30 days before the explantation. The valves were evaluated macroscopically, measuring the conduct diameter. Besides, they were analyzed for optic microscopy using H.E, Gomori and Weigert staining. The immunohistochemical analysis was performed using factor VIII, CD3, Vimentin and CD68 staining. Also, it was analyzed the calcium quantity with atomic absorption. **Results:** A death happened in group HeteroD during the 40° post operative day. The valves of group HomoC showed decrease in the cellularity while the valves of group HeteroD showed matrix repopulation with the cells of the receptor. The calcium analyses demonstrated more calcification of the leaflets and the conduct of group HomoC ($p < 0,05$). The echocardiography pointed out normal valvar function in both groups. The valvar medium diameter in the explantation was bigger than the valves of group HeteroD ($21,9\text{mmHg} \pm 0,49$). **Conclusion:** The decellularized heterografts were repopulated by the receptor's cells, showing low trend to calcification and presented bigger valvar diameter when compared with cryopreserved homografts.

Key words: Decellularized. Heart valves. Sheep