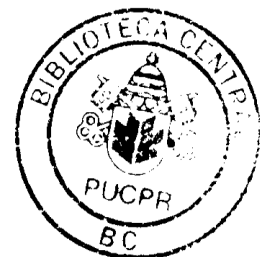




PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA**



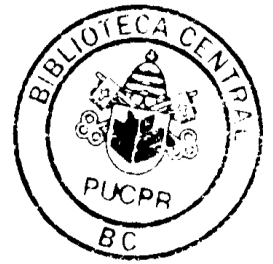
FÁBIO BINHARA NAVARRO

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO E FUNCIONAL DE
HOMOENXERTOS VALVARES PULMONARES DESCELULARIZADOS
COM SOLUÇÃO PUC I: ESTUDO EXPERIMENTAL EM OVINOS**

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO DINIZ AFFONSO DA COSTA

CO-ORIENTADOR: MSC. JOÃO GABRIEL RODERJAN

**CURITIBA
2009**



**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO E FUNCIONAL DE
HOMOENXERTOS VALVARES PULMONARES DESCELULARIZADOS
COM SOLUÇÃO PUC I: ESTUDO EXPERIMENTAL EM OVINOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa

Co-Orientador: Msc. João Gabriel Roderjan

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

Navarro, Fábio Binhara

N322a
2009 Avaliação do comportamento biológico e funcional de homoenxertos
 valvares pulmonares descelularizados com solução PUC I : estudo
 experimental em ovinos / Fábio Binhara Navarro ; orientador, Francisco
 Diniz Affonso da Costa ; co-orientador, João Gabriel Roderjan. – 2009.
 88 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, Curitiba, 2009.

Bibliografia: f. [75]-81

1. Coração – Cirurgia. 2. Coração – Válvulas – Doenças.
3. Transplante de órgãos, tecidos, etc. 4. Transplante homólogo. 5. Rejeição
de enxertos. I. Costa, Francisco Diniz Affonso da. II. Roderjan, João Gabriel.
III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação
em Clínica Cirúrgica. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.41

Biblioteca Central

Avaliação do comportamento biológico e funcional de

Ac. 271871 - R. 835078 Ex. 1

Doação - Doação

28/10/2010



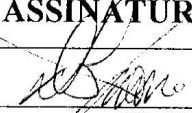
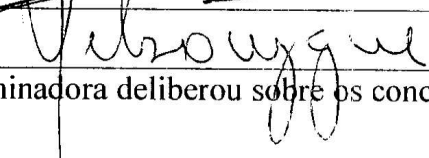
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica

ATA DA SESSÃO DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA AO NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ATA DE DISSERTAÇÃO Nº 48

Aos nove dias do mês de outubro de 2009, realizou-se a sessão de defesa de dissertação “**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE HOMOENXERTOS VALVARES PULMONARES DESCELULARIZADOS COM SOLUÇÃO PUCPR I: ESTUDO EXPERIMENTAL EM OVINOS**” Área de Concentração: Reparação e Cicatrização Tecidual, apresentada por **Fábio Binhara Navarro** sob orientação da Prof. **Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa**. Requisito para obtenção do título de mestre.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes professores:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Dalton Bertolin Précoma	
Prof. Dr. Rui Manuel de Sousa de Almeida	
Prof. Dr. Nelson Itirio Miyague	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Dalton Bertolin Précoma

Avaliação: APROVADO

Prof. Dr. Rui Manuel de Sousa de Almeida

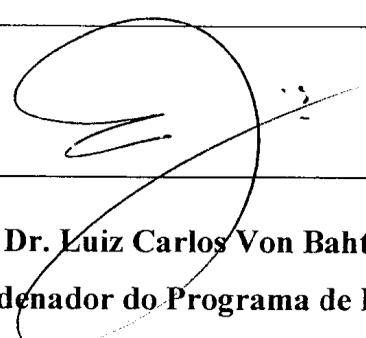
Avaliação: APROVADO

Prof. Dr. Nelson Itirio Miyague

Avaliação: APROVADO

Parecer Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:



Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

**Aos meus pais, João e Rosi,
que me ensinaram os verdadeiros princípios de vida.**

**À minha filha Isabella, que ilumina a minha existência
e me reensinou a amar.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Francisco Diniz Affonso da Costa, professor e incentivador, meu especial agradecimento pela orientação desta dissertação.

Ao Mestre João Gabriel Roderjan, pelas importantes e árduas colaborações no desenvolvimento e co-orientação desta dissertação.

Ao Professor Doutor Leonardo Andrade Mulinari, professor, mentor e amigo, pelo grandioso e contínuo papel que tem na minha formação em cirurgia cardiovascular.

Ao Dr. Gustavo Klug Pimentel, inestimável amigo, não só pelas inúmeras colaborações no desenvolvimento deste trabalho, como também nas atividades profissionais diárias.

Ao Professor Doutor Nelson Itiro Miyague, pela imprescindível colaboração na realização dos ecocardiogramas.

À Professora Doutora Lúcia Noronha, pelo imprescindível trabalho realizado de avaliação histológica.

À Bióloga Ana Paula Camargo Martins, pelo importante auxílio na avaliação histológica.

Ao Biólogo Eduardo Discher Vieira, pelas inúmeras e árduas colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor Ricardo Vilani e Dr. André de Brito Obladen, médicos veterinários, pelo acompanhamento anestésico dos animais.

Ao Professor Doutor Felipe Phol, médico veterinário, pelo acompanhamento clínico dos animais.

Aos Drs. Carlos Eduardo Gori Gomes, Sérgio Augusto Veiga Lopes, Marcelo Pandolfo e Jairo Leal, que prestaram imprescindíveis auxílios nas operações.

RESUMO

Introdução: Não havendo um substituto valvar ideal, os homoenxertos criopreservados são considerados uma boa opção pelo excelente perfil hemodinâmico, baixa incidência de tromboembolismo, resistência a infecções e durabilidade a médio prazo. Porém, estão sujeitos à progressiva degeneração, especialmente em crianças e adultos jovens. Sua antigenicidade desencadeia uma resposta imunológica que contribui para sua degeneração, calcificação e falência. Para diminuir esta antigenicidade, desenvolveu-se o processo de descelularização. Pela ação de detergentes e enzimas, este processo remove os componentes celulares do homoenxerto, diminuindo sua imunogenicidade e, provavelmente, retardando sua degeneração.

Objetivo: O objetivo deste estudo, experimental e descritivo, é analisar o comportamento histológico e funcional de homoenxertos pulmonares ovinos descelularizados *H-descel* por uma nova solução composta principalmente de dodecil sulfato de sódio a 0,1% e desenvolvida na PUCPR. Para caracterizar este comportamento, serão avaliados o repovoamento celular, a ocorrência de calcificação e a função valvar ao ecocardiograma.

Métodos: A amostra foi constituída de oito ovinos, submetidos ao implante de *H-descel* em posição ortotópica, através de uma toracotomia esquerda, com auxílio de circulação extracorpórea. Foram acompanhados clinicamente e por ecocardiogramas periódicos até o explante, realizados em prazos predefinidos para cada dois animais: sete, 30, 90 e 180 dias. A análise histológica foi realizada por colorações Hematoxilina-eosina, Pentacrômio de Movat e Alizarina Red.

Resultados: Todos os animais sobreviveram ao procedimento e atingiram seus períodos de seguimento. Não houve insuficiência ou estenose destes enxertos ao ecocardiograma. Os animais submetidos aos explantes em 90 e 180 dias tiveram significativos ganhos ponderais e estes *H-descel* aumentaram de diâmetro, sem desenvolver insuficiência. À histologia, todos mantiveram a organização de sua matriz extracelular, foram progressivamente repovoados e não apresentaram calcificação.

Conclusão: Neste modelo experimental, os *H-descel* mostraram-se excelentes substitutos valvares a médio prazo.

Descritores: Transplante Homólogo, Reação Hospedeiro-Enxerto, Doença das Valvas Cardíacas.

ABSTRACT

Introduction: The cryopreserved homograft is a good valve substitute due attributes like excellent hemodynamics, low incidence of thromboembolic events, infection resistance and good mid-term durability. However, progressive homograft degeneration and fibrocalcification may occur, particularly in the childhood and young adults. Their antigenicity triggers an immunological reaction that plays an important role in their degeneration and failure. The decellularization process was proposed to decrease this antigenicity. By the action of detergents and enzymes, this process removes all cellular components from the homograft matrix, diminishing immunogenicity and probably delaying its degeneration.

Objective: The objective of this experimental and descriptive study is evaluate the biological and functional behavior of decellularized pulmonary homografts (*Decell-H*), treated by a sodium dodecil sulfate solution (0,1%), developed in our University (Pontificia Universidade Católica do Paraná). For the characterization of *Decell-H* performance, parameters like recellularization, calcification, and echocardiographic data will be analyzed.

Methods: Eight juvenile sheep were submitted to the implantation of the *Decell-H* sutured into orthotopic position, through a left thoracotomy and with cardiopulmonary bypass support. They were followed-up clinically and by periodical echocardiograms until the explantation, which were performed in different time for every two sheep: 7, 30, 90 and 180 postoperative days. For histological analysis we used Hematoxilin-eosin, Movat and Alizarin-Red staining.

Results: The sheep reached their follow-up period in a good clinical state. There was no valve regurgitation or stenosis by the echocardiogram. The animals submitted to the explantation in 90 and 180 days had a significant somatic growth and these *Decell-H(s)* had a diameter increase, without central valve insufficiency. Histologically, all homografts preserved their extra-cellular matrix organization and were progressively recellularized, without calcification.

Conclusion: In this experimental model, the *Decell-H* behaved as an excellent valve substitute.

Descriptors: Transplantation Homologous, Host vs Graft Reaction, Heart Valve Disease.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Ganho ponderal das ovelhas submetidas ao implante de homoenxerto pulmonar descelularizado. Peso inicial (em quilogramas, no momento do implante), peso final (no explante, conforme prazo), variação ponderal (em porcentagem)	38
TABELA 2 – Resumo dos achados macroscópicos no momento do explante dos homoenxertos pulmonares descelularizados.....	40
TABELA 3 – Homenxertos pulmonares descelularizados para a reconstrução da VSVD de ovinos. Diâmetros valvares em milímetros (mm) do anel nativo e do homoenxerto no momento do implante, diâmetro do homoenxerto no momento do explante, variação (porcentagem)	44
TABELA 4 – Resumo dos achados ecocardiográficos	62
TABELA 5 – Parâmetros médios ao estudo “ <i>doppler</i> ” nos ecocardiogramas dos grupos de explante com 90 dias (A) e 180 dias (B).....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografia de corte histológico de um segmento distal do conduto de homoenxerto pulmonar valvado ovino descelularizado com solução de SDS 0,1% (Hematoxilina-eosina, 100X). Observa-se a ausência de células na matriz após o término do processo.	28
Figura 2 – Ovelha posicionada em decúbito lateral direito sobre a mesa operatória, durante a indução anestésica. Tricotomia do hemitórax esquerdo sobre a topografia do local da incisão operatória.	30
Figura 3 – Aspecto do campo operatório após a pericardiotomia, visualizando-se a via de saída do ventrículo direito (VSVD), anel pulmonar (AP) e tronco pulmonar (TP).	31
Figura 4 – Introdução da cânula arterial na aorta torácica. TP: tronco pulmonar. AAE: apêndice atrial esquerdo.	32
Figura 5 – Introdução da cânula venosa no apêndice atrial direito (AAD). TP: tronco pulmonar. VSVD: via de saída do ventrículo direito.	32
Figura 6 – Aspecto final após o implante do homoenxerto descelularizado (<i>H-decel</i>). VSVD: via de saída do ventrículo direito. TP: tronco pulmonar.	33
Figura 7 – Ferida operatória após a síntese dos planos e dreno tubular torácico sob selo d'água.	33
Figura 8 – Ovelha já em posição ortostática uma hora após a cirurgia e após a retirada do dreno.	34
Figura 9 – Gráfico ilustrando o ganho ponderal das ovelhas submetidas ao implante de homoenxerto pulmonar descelularizado. Peso inicial (em quilogramas, no momento do implante), peso final (no explante, conforme prazo).	39
Figura 10 – Aspecto translúcido das cúspides dos homoenxertos pulmonares descelularizados explantados após 180 dias, observado tanto na ovelha 7 (fotografia A), como na ovelha 8 (fotografia B).	41
Figura 11 – Homoenxerto pulmonar descelularizado explantado após 180 dias, observa-se a elasticidade do conduto, as cúspides translúcidas, a reendotelização e a ausência de calcificações.	42
Figura 12 – Homoenxerto pulmonar descelularizado (<i>H-decel</i>) no momento do explante após sete dias. Notam-se aderências fibrinosas.	42
Figura 13 – Homoenxerto pulmonar descelularizado (<i>H-decel</i>) no momento do explante após 180 dias. Nota-se aderências moderadas. Não há diferença das aderências entre tecido nativo e homoenxerto descelularizado.	43

Figura 14 – Homoenxerto pulmonar descelularizado (<i>H-decel</i>) no momento do explante após 180 dias. Nota-se aderências discretas. Não há diferença das aderências entre tecido nativo e homoenxerto descelularizado.	43
Figura 15 – Gráfico ilustrando a variação do diâmetro dos homoenxertos pulmonares descelularizados entre o momento do implante e o momento dos explantes, realizados após 90 e 180 dias.	45
Figura 16 – Homoenxerto pulmonar descelularizado explantado após sete dias. Presença de células com características polimorfonucleares predominantemente na adventícia, ovelha 1 (HE, 100X).	46
Figura 17 – Homoenxerto pulmonar descelularizado explantado após sete dias. Predomínio de células com características de polimorfonucleares na adventícia do conduto, ovelha 1 (HE, 400X).	47
Figura 18 – Homoenxerto pulmonar descelularizado explantado após sete dias. Folheto totalmente acelular, ovelha 1 (HE, 400X).	47
Figura 19 – Homoenxerto descelularizado explantado após 30 dias. Recelularização atingindo a camada média, ovelha 3 (HE, 100X).	49
Figura 20 – Homoenxerto descelularizado explantado após 30 dias. Recelularização atingindo a camada média, ovelha 4 (HE, 100X).	49
Figura 21 – Homoenxerto descelularizado explantado após 30 dias. Endocardite do folheto, presença de numerosos polimorfonucleares e colônias bacterianas, ovelha 4 (HE, 400X).	50
Figura 22 – Homoenxerto descelularizado explantado após 90 dias. Conduto com recelularização homogênea e abundante, ovelha 5 (HE, 100X).	51
Figura 23 – Homoenxerto descelularizado explantado após 90 dias. Conduto com recelularização homogênea e abundante, ovelha 6 (HE, 100X).	51
Figura 24 – Homoenxerto descelularizado explantado após 90 dias. Conduto com fibroblastos e miofibroblastos, ovelha 5 (HE, 400X).	52
Figura 25 – Homoenxerto descelularizado explantado após 90 dias. Folheto com sua estrutura trilaminar preservada, pouco recelularizado, exceto na sua camada ventricularis, ovelha 5 (HE, 400X).	52
Figura 26 – Homoenxerto descelularizado explantado após 90 dias. Base da cúspide recelularizada e reendotelizada, ovelha 6 (HE, 400X).	53
Figura 27 – Homoenxerto descelularizado explantado após 90 dias. Extremidade da cúspide pouco celular, apresentando apenas reendotelização, ovelha 6 (HE, 400X).	53
Figura 28 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Recelularização bem organizada, podendo-se perceber a diferenciação da camada média no conduto, ovelha 7 (HE, 100X).	54

Figura 29 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Presença de células musculares delimitando a camada média, ovelha 7 (HE, 400X).	55
Figura 30 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Folheto já apresentando maior celularidade na sua extremidade, ovelha 8 (HE, 100X).....	55
Figura 31 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Presença glicosaminoglicanos (azul-esverdeadas) e de fibras colágenos íntegras no conduto, ovelha 8 (Silvermann-Movat, 100X).....	57
Figura 32 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Estrutura trilaminar do folheto preservada após 6 meses, ovelha 8 (Silvermann-Movat, 100X).....	57
Figura 33 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Fibras elásticas íntegras no conduto, ovelha 8 (Russell-Movat, 100X).....	58
Figura 34 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Fibras elásticas íntegras no conduto, ovelha 8 (Russell-Movat, 200X).....	58
Figura 35 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Estrutura trilaminar do folheto preservada, com fibras elásticas íntegras (setas), ovelha 8 (Russell-Movat, 100X).....	59
Figura 36 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias (ovelha 8). Observa-se que não houve calcificação do conduto (Fig. A), nem do folheto (Fig. B) (Alizarina Red pH 7.0 – 100X).....	60
Figura 37 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Conduto e folheto sem calcificação, ovelha 8 (Alizarina Red pH 4.2 – 100X).	60
Figura 38 – Homoenxerto descelularizado explantado após 30 dias. Aspecto de calcificação ao redor do fio na anastomose (indicado pelas setas →), ovelha 4 (Alizarina Red pH 4,2 – 200X).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

® – marca registrada

°C – graus Celsius

AAD – apêndice atrial direito

AAE – apêndice atrial esquerdo

ABO – antígenos eritrocitários humanos, sistema ABO

Anast D – anastomose distal

Anast P/D – anastomose proximal e distal

AP – anel pulmonar

Aspec Cúsp – aspecto da cúspide

Calcif – calcificação

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CO₂ – dióxido de carbono

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

Decell-H – *decellularized pulmonary homograft*

DNA – ácido desoxirribonucleico

DP – desvio padrão

Espess Cúsp – espessamento cúspide

Grad Max – gradiente máximo

Grad Méd – gradiente médio

H-descel – homoenxerto pulmonar descelularizado

HE – hematoxilina-eosina

HLA – antígenos leucocitários humanos, sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*)

Insuf Pulm – insuficiência pulmonar

Kg – quilogramas

m/s – metros por segundo

mEq – miliequivalentes

mg/dia – miligramas por dia

mg/kg – miligramas por quilogramas

mm – milímetros

mmHg – milímetros de mercúrio

Mobil – modilidade

P.O. – pós-operatório

PRA – painel de reatividade de anticorpos (*Pannel Reactive Antibodies*)

PTFE – politetrafluoretileno

PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SDS – dodecil sulfato de sódio

TP – tronco pulmonar

Transl – translúcida

U/Kg – unidades por quilograma

VD – ventrículo direito

Veget – vegetação

Vel Flx – velocidade de fluxo

VSVD – via de saída do ventrículo direito

µg/kg – microgramas por quilogramas

µg/ml – microgramas por mililitro

µm – micrômetros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO	19
2. LITERATURA	20
3. MÉTODO	26
3.1 MODELO ANIMAL	27
3.2 PREPARO DO ENXERTO	27
3.3 CUIDADOS PRÉ-OPERATÓRIOS	28
3.4 PREPARO OPERATÓRIO E ANESTESIA	29
3.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	30
3.6 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS	34
3.7 EUTANÁSIA	35
3.8 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO	35
3.8.1 Análise Ecocardiográfica	35
3.8.2 Análise Macroscópica	35
3.8.3 Análise Microscópica	36
4. RESULTADOS	37
4.1 EVOLUÇÃO CLÍNICA	38
4.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA	39
4.2.1 Diâmetro Valvar	44
4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA	45
4.3.1 Hematoxilina-eosina	45
4.3.2 Pentacrômio de Movat	56
4.3.3 Alizarina Red 4.2 e 7.0	59
4.4 ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA	61
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	72

7. REFERÊNCIAS..... 74

NORMAS ADOTADAS..... 81

8. ANEXOS 82

ANEXO I - Carta de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais 83

ANEXO II - Critérios para Análise Microscópica..... 85

ANEXO III - Ata de Aprovação 88

“...If you can talk with crowds and keep your virtue;
Or walk with Kings – nor lose the common touch;
If neither foes nor loving friends can hurt you;
If all men count with you, but none too much;
If you can fill the unforgiving minute;
With sixty seconds' worth of distance run;
Yours is the Earth and everything that's in it;
And – which is more – you'll be a Man, my son.”

Rudyard Kipling

1. INTRODUÇÃO

A abordagem terapêutica de pacientes portadores de valvopatias tem sido um dos grandes desafios da cirurgia cardíaca, especialmente em nosso meio, onde a doença reumática ainda tem elevada prevalência (2/1000 habitantes).¹

Associadas à etiologia reumática, somam-se a etiologia congênita e degenerativa, de forma que as valvopatias acometem todas as faixas etárias, levando à elevada morbi-mortalidade. A troca valvar cirúrgica, através da substituição por próteses sintéticas, biológicas ou mecânicas, foi um importante avanço no tratamento desses pacientes, apesar de não estar livre de complicações.^{2, 3}

As próteses biológicas (suínas ou bovinas) apresentam boa função hemodinâmica, não exigem anticoagulação permanente no pós-operatório, mas apresentam menor durabilidade, especialmente em pacientes jovens. As próteses mecânicas apresentam maior durabilidade mas, por serem trombogênicas, necessitam do uso de anticoagulantes no pós-operatório, e estão associadas com uma maior incidência de eventos hemorrágicos e trombo-embólicos.⁴

Uma alternativa a estas próteses são os homoenxertos valvares, que vêm sendo utilizados na correção de diversas cardiopatias congênitas e valvopatias adquiridas, com resultados bastante satisfatórios. Foram descritos inicialmente por Donald Ross, em 1962, que realizou o primeiro implante de um homoenxerto valvar aórtico a fresco, em posição ortotópica.⁵

O'Brien *et al.* foram os primeiros a utilizar a criopreservação para o preparo de homoenxertos. Esta técnica permitiu uma estocagem mais prolongada e, segundo os autores, estaria associada à maior durabilidade do que os homoenxertos a fresco.⁶

Os homoenxertos criopreservados apresentam excelente perfil hemodinâmico, baixa incidência de tromboembolismo, alta resistência a infecções e, segundo alguns autores, têm maior durabilidade que os substitutos valvares biológicos – 72% dos pacientes estão livres de falência valvar em 10 anos. Porém não são enxertos ideais, pois também estão sujeitos à progressiva degeneração, especialmente em crianças e adultos jovens. Homann *et al.*, na conclusão final de seu artigo no qual relata uma experiência de 25 anos na utilização de homoenxertos e xenoenxertos, enfatiza que a durabilidade a longo prazo de todos enxertos biológicos ainda não é satisfatória.^{7, 8, 9, 10}

A reação imunológica desencadeada pela exposição de antígenos de histocompatibilidade I e II, presentes nas células endoteliais e fibroblastos residuais

do doador, tem um papel central no processo de degeneração dos homoenxertos a longo prazo.^{11, 12}

Com o avanço da tecnologia de manipulação de tecidos biológicos, tem sido proposta a descelularização desses enxertos por um processo químico. Neste, a ação de agentes tensoativos e enzimas remove os componentes celulares, diminuindo o número de antígenos e tornando o enxerto inerte. Desta forma, minimiza-se a resposta imune e o processo inflamatório por parte do receptor, retardando a degeneração do homoenxerto.^{13, 14}

A matriz acelular deste homoenxerto é passível de repovoação por células do próprio receptor e, por conseguinte, pode ocorrer o processo de regeneração e remodelamento, havendo um potencial de crescimento, menor índice de calcificação e maior durabilidade.^{13, 15, 16}

Estes avanços buscam evitar a degeneração dos homoenxertos. Quando descelularizados, eles podem ter maior durabilidade comparativamente a aqueles criopreservados, o que reduziria o índice de falência e a necessidade de reoperações, melhorando a qualidade de vida daqueles pacientes que necessitam de substitutos valvares.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo, experimental e descritivo, é analisar o comportamento histológico e funcional de homoenxertos pulmonares ovinos descelularizados por uma nova solução composta principalmente de dodecil sulfato de sódio a 0,1% e desenvolvida na PUCPR. Para caracterizar este comportamento, serão avaliados o repovoamento celular, a ocorrência de calcificação e a função valvar ao ecocardiograma.

O primeiro a relatar o uso de homoenxertos na cirurgia cardiovascular foi Gross, em 1948, que utilizou enxertos arteriais de cadáveres como condutos para confeccionar “*shunts*” sistêmico-pulmonares em crianças portadoras de tetralogia de Fallot e para corrigir a coarctação de aorta.^{17, 18}

Em 1956, Gordon Murray também reportou o uso de homoenxertos aórticos frescos (cadavéricos), transplantados à aorta descendente, para o tratamento de pacientes com insuficiência aórtica.¹⁹ Apesar do sucesso hemodinâmico parcial dessa cirurgia, alguns desses homoenxertos apresentaram uma boa performance e durabilidade. Enquanto alguns pacientes não apresentaram calcificação nem gradientes trans-valvares por até 20 anos, outros rapidamente apresentaram progressiva fibrose e calcificação, levando à falência do enxerto. Alguns autores da época já sugeriram que estas evoluções totalmente diferentes poderiam ser decorrentes de uma reação imunológica.^{20, 21}

Os homoenxertos valvados foram utilizados em posição ortotópica primeiramente em 1962, por Ross, na Inglaterra⁵, e por Barrat-Boyes, na Nova Zelândia²², para o tratamento de cardiopatias adquiridas. Em 1966, o homoenxerto valvado foi utilizado pela primeira vez para a reconstrução da via de saída do ventrículo direito (VSVD) de uma criança com atresia pulmonar, abrindo novas possibilidades para o tratamento de diversas cardiopatias congênitas que necessitam deste tipo de reparo.¹⁸

Com o aprimoramento e a disponibilidade das próteses valvares, o uso dos homoenxertos valvados começou a declinar devido a questões importantes, como a dificuldade de aquisição, armazenamento, transporte, disponibilidade em diferentes tamanhos e risco de transmissão de doenças infecciosas.²³ Desta forma, foram desenvolvidas diversas próteses que puderam ser utilizadas como condutos valvados, que incluem:

- Tubos de “*dacron*” com uma valva suína tratada com glutaraldeído (xenoenxerto “*stentless*”);²⁴
- Tubos de “*dacron*” com uma valva de pericárdio, confeccionadas no per-operatório (“*stented*”);²⁵
- Tubos de pericárdio bovino com uma valva suína implantada;²⁶
- Tubos valvados confeccionados com pericárdio heterólogo pré-fabricados;
- Tubos valvados confeccionados com pericárdio heterólogo no per-operatório.²⁷

- Tubos valvados confeccionados com politetrafluoretileno (PTFE) no per-operatório;²⁷
- Tubos valvados confeccionados com veia jugular bovina (valvado, “*stentless*”, fixado com glutaraldeído);²⁸
- Tubos valvados com próteses mecânicas.

Estes enxertos apresentam diferentes vantagens e desvantagens, mas todos são de segunda escolha, com resultados aquém dos homoenxertos, que são a primeira escolha como substitutos da valva pulmonar, como concluem Homann *et al.*¹⁰

Com o desenvolvimento e a organização dos centros de transplante de órgãos e tecidos durante as décadas de oitenta e noventa, os homoenxertos valvados tiveram sua disponibilidade incrementada, permitindo um novo aumento na sua utilização.²³

Desde aquelas utilizações pioneiras citadas anteriormente, os homoenxertos têm sido indispensáveis para o manejo de diversas anomalias congênitas do coração e grandes vasos, onde são os condutos valvados de escolha para a restauração da continuidade entre ventrículo direito e as artérias pulmonares em doenças como tetralogia de Fallot com atresia pulmonar, *truncus arteriosus*, transposição das grandes artérias complexas e dupla via de saída do ventrículo direito. Com este novo crescimento na utilização desses enxertos, sua aplicabilidade estendeu-se para as cardiopatias valvares adquiridas, como, por exemplo, em pacientes submetidos à cirurgia de Ross.^{18, 29}

Os homoenxertos também são citados por Hopkins como a melhor opção para a reconstrução da via de saída ventricular comprometida por endocardite infecciosa e para as reconstruções complexas de diferentes cardiopatias congênitas.³⁰

A ampla utilização dos homoenxertos, porém, tem sido restringida pela sua disponibilidade e pela sua durabilidade limitada a longo prazo, principalmente em pacientes mais jovens.⁶ Na tentativa de resolver estes problemas, as técnicas de processamento e conservação de tecidos biológicos ganham extrema importância, ou buscando melhorar o desempenho desses homoenxertos ou buscando o desenvolvimento de enxertos a partir de matrizes heterólogas. A melhor compreensão da fisiopatologia da degeneração dos enxertos pode ajudar no

Esta preocupação é relevante, tanto que diversos autores descrevem a reação imunológica como determinante da incompetência valvar que desenvolve-se já nos primeiros seis meses após o implante desses homoenxertos convencionais.^{31, 32, 33}

A durabilidade e a função valvar do homoenxerto dependem de diferentes fatores imunológicos e não imunológicos. Como fatores não imunológicos que afetam sua durabilidade e função, podemos enumerar a compressão esternal, o sub ou super-dimensionamento, a distorção anatômica, o uso heterotópico e a injúria isquêmica antes da conservação. Os fatores imunológicos incluem basicamente a incompatibilidade ABO^{34, 35} e HLA (Human Leukocyte Antigen).^{14, 18, 36, 37, 38, 39, 40}

A durabilidade depende também da técnica de preservação. Esta pode levar à injúria isquêmica, comprometimento estrutural e afetar diretamente na imunogenicidade.⁴¹ Diversas técnicas de processamento dos homoenxertos foram propostas, incluindo o uso a fresco (enxertos homovitalis), a conservação em solução antibiótica e a criopreservação. Apesar de os homoenxertos criopreservados serem os mais utilizados, alguns autores não evidenciaram a superioridade destes em relação a homoenxertos a fresco ou conservados em solução antibiótica.^{10, 42}

Independentemente da técnica de conservação, está bem estabelecido que os homoenxertos desencadeiam uma resposta imunológica, e que esta tem um papel importante na sua degeneração. A criopreservação, por exemplo, mantém a viabilidade de mais de 50% de suas células.⁴³ A antigenicidade desses homoenxertos valvados é decorrente dos antígenos HLA classe I e II presentes nessas células, especialmente nas células endoteliais e miofibroblastos. Estes antígenos desencadeiam uma resposta imunológica doador-específica, tanto celular, com ativação de linfócitos T, como humoral, com a produção de anticorpos anti-HLA classe I e II.^{14, 31, 36, 39, 40, 44}

Considerando-se os resultados subótimos dos homoenxertos e que a resposta imunológica desencadeada desempenha um papel vital na sua degeneração, foram desenvolvidas técnicas para diminuir a antigenicidade dos aloenxertos, como a técnica de mascaramento de antígenos (*L-Hydro*) e a técnica de descelularização, que é eliminação dessas células, fundamental para obter-se uma matriz imunologicamente inerte.^{13, 45}

A descelularização de aloenxertos foi introduzida inicialmente por Schilling *et al.*, em 1998⁴⁶, e depois vem sido desenvolvida por diversos outros autores que utilizaram diferentes métodos de descelularização, utilizando enzimas como a

tripsina, a ribonuclease e desoxi-ribonuclease, soluções hipo ou hipertônicas, ou agentes tensoativos, como dodecilsulfato de sódio (SDS), octilphenotoxietanol, ácido deoxicólico, etanol e glicerol.^{46, 47, 48, 49, 50}

A ação dessas enzimas e/ou agentes tensoativos promove a lise celular e a retirada dos resíduos celulares e de DNA de aloenxertos, tornando-os imunologicamente inertes. Esse processo deve, ainda, preservar a integridade das fibras colágenas e elásticas da matriz extracelular, mantendo suas propriedades biomecânicas.^{16, 51, 52}

Uma matriz extracelular intacta, não antigênica e sem citotoxicidade residual é um pré-requisito para a biocompatibilidade e também para a longevidade dos aloenxertos. Essa matriz seria passível de semeadura de células cultivadas em laboratório (opcional) e de posterior repovoação por células do receptor “*in vivo*”, sem haver uma resposta inflamatória imunomediada destrutiva, que seria deletéria a esse enxerto.⁵³

A hipótese que o tecido descelularizado desencadearia uma menor resposta imunológica foi comprovada por autores que demonstraram uma reatividade do PRA (“*Pannel Reactive Antibodies*”) significativamente diminuída.^{14, 52}

Mesmo que os homoenxertos descelularizados não viessem a ter uma durabilidade significativamente maior, esta menor imunogenicidade por si só já seria uma vantagem. A progressão da cardiopatia subjacente poderia exigir um transplante cardíaco no futuro e, nesta situação, o “*cross-matching*” do HLA doador-receptor seria mais difícil devido a uma sensibilização imunológica prévia do receptor decorrente do uso de um homoenxerto convencional.¹⁴

Havendo a repovoação com leucócitos monomorfonucleares, isto é, monócitos, estes podem se diferenciar em histiócitos, fibroblastos, miofibroblastos e células musculares lisas. Este processo permitiria a esse enxerto um comportamento próximo ao fisiológico, onde haveria produção e reabsorção de matriz extracelular, incluindo seus componentes como glicosaminoglicanos, fibras elásticas, fibras colágenas e fibras musculares, caracterizando o processo de reparação e reorganização e tornando o enxerto viável, característica presente apenas no autoenxerto pulmonar.^{13, 45, 53, 54, 55}

Paralelamente a estes avanços, foram desenvolvidas matrizes (“*scaffolds*”) sintéticas biodegradáveis e imunologicamente inertes, constituídas, por exemplo, de ácido poliglicólico, poli-hidroxioctanoato e poli-4-hidroxibutirato.^{56, 57, 58}

Estes condutos valvados apresentaram resultados insatisfatórios, pois tiveram problemas com citotoxicidade e adesividade celular a estas matrizes sintéticas, uma vez que estes polímeros não apresentam proteínas extracelulares denominadas ligandinas, as quais aderem às integrinas celulares, que são fundamentais para a repovoação dessas matrizes.⁵³

Ainda, diferentemente dos enxertos coronarianos e arteriais periféricos, o desenvolvimento de substitutos valvares é mais complexo, pois funcionalmente não são apenas condutos, e apresentam uma complexidade anatômica e tridimensional única, que lhes confere a função de válvula.⁵³

A técnica de descelularização poderia permitir o uso de heteroenxertos, resolvendo o problema da disponibilidade dos homoenxertos. Diferentes autores publicaram estudos experimentais, principalmente em modelos ovinos, demonstrando bons resultados com heteroenxertos suínos descelularizados.^{52, 54, 59, 60} Um heteroenxerto suíno descelularizado chegou a ser disponibilizado para uso clínico no mercado americano e europeu (*SynerGraft*®). Porém, estes enxertos foram retirados do mercado após o relato de resultados desfavoráveis em humanos. Por desencadearem vigorosas reações inflamatórias de corpo estranho, apresentaram falha estrutural e rotura.⁶¹ Assim, podemos questionar a antigenicidade da matriz heteróloga, que também foi sugerida por Allaire *et al.* Os enxertos heterólogos porcinos têm, ainda, o risco de transmitir retrovírus para os seres humanos.^{62, 63}

Ao contrário dos resultados desfavoráveis dos heteroenxertos descelularizados, os homoenxertos descelularizados mostraram resultados favoráveis em estudos experimentais e clínicos,^{52, 64, 65} encorajando a utilização de uma matriz homóloga para desenvolver o processo de descelularização em nossa universidade, realizado em conjunto com a Universidade de Humbolt da Alemanha.

3.1 MODELO ANIMAL

A amostra foi constituída por oito carneiros (*Ovis aries*) jovens da raça Suffolk, com idade média de quatro $\pm$ 0,5 meses (mínimo= 3; máximo= 5) e peso médio de 22,6 $\pm$ 1,9 Kg (mínimo= 20; máximo= 25). Esses animais foram operados no Hospital Veterinário da PUCPR e submetidos ao implante de homoenxertos pulmonares descelularizados em posição pulmonar. Esses carneiros foram acompanhados clinicamente e por ecocardiograma seriados. Subsequentemente, dois animais foram selecionados para explante dos enxertos em prazos predeterminados de sete dias, 30 dias, 90 dias e 180 dias de pós-operatório.

Todos os procedimentos obedeceram ao protocolo de cuidados com animais do "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (National Academy of Sciences, Washington, D.C.,1996) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Este trabalho foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCPR (Parecer nº 004.07/CEUA-PUCPR) – Anexo I.

3.2 PREPARO DO ENXERTO

Os homoenxertos pulmonares foram colhidos de ovelhas jovens da mesma raça, obtidas de animais para consumo, em abatedouros da região metropolitana de Curitiba. Após o abate do animal, foram retirados os corações em condições assépticas e transportados em solução salina isotônica (0,9%, a 4°C) até o Laboratório de Engenharia de Tecidos e Transplante Celular da PUCPR. Neste local, em uma câmara sob fluxo laminar contínuo, foram dissecados os condutos pulmonares valvados e depois imersos em uma solução nutriente com antibióticos (Solução de RMPI 1640[®], Sigma – Roswell Park Memorial Institute – contendo: cefoxitina 240 µg/ml, lincomicina 120 µg/ml, polimixina B 100 µg/ml e vancomicina 50 µg/ml) por um período de 24 horas, também a 4°C. Após esta etapa, foram descelularizados com a solução denominada PUC I (patente brasileira requerida sob o número **PI0800603-2**), composta predominantemente de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1%, com o auxílio de um agitador mecânico – “*shaker*” (Mesa Agitadora 109M[®], Nova Ética Ltda.). Terminado este processo, os enxertos foram conservados

em meio nutriente com antibióticos (RPMI 1640[®]) a 4°C e foram utilizados num prazo máximo de trinta dias. Foram realizadas análises histológicas com hematoxilina-eosina de um segmento distal de cada conduto para comprovar a efetividade do processo de descelularização (Figura 1).

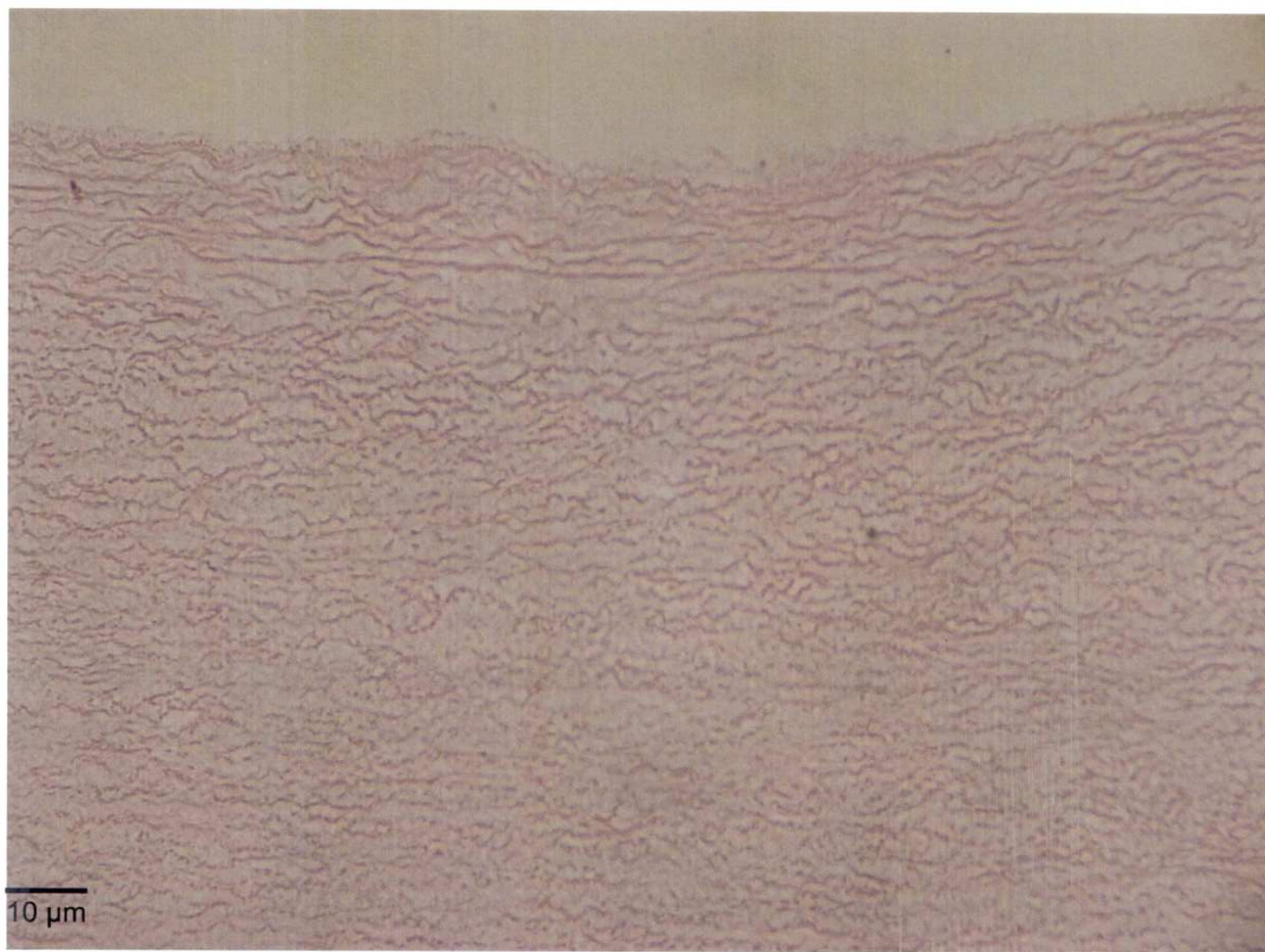


Figura 1 – Fotomicrografia de corte histológico de um segmento distal do conduto de homoenxerto pulmonar valvado ovino descelularizado com solução de SDS 0,1% (Hematoxilina-eosina, 100X). Observa-se a ausência de células na matriz após o término do processo.

3.3 CUIDADOS PRÉ-OPERATÓRIOS

Foram selecionadas ovelhas jovens com idade de três a cinco meses e peso entre 20 e 25 kg. Os animais foram avaliados clinicamente por uma equipe de veterinários. Foram vacinados contra *Clostridium* C e D e tétano. Receberam tratamento preventivo de infecções parasitárias indicado para a espécie, incluindo: Ripercol[®] (levamisol, 7.5 mg/kg – intramuscular) e Ivomec[®] (ivermectina, 200 µg/kg

– intramuscular). Após a obtenção de um hematócrito mínimo de 30%, os animais foram liberados para a operação.

Os ovinos receberam 100 mg/dia de ácido acetil-salicílico e 75 mg/dia de dipiridamol, nos dois dias antecedentes ao implante.

Todos os animais ficaram em jejum por 36 horas para alimentos sólidos e por 12 horas para alimentos líquidos antes de cada procedimento, de implante ou explante.

3.4 PREPARO OPERATÓRIO E ANESTESIA

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em hospital veterinário especializado (Hospital Veterinário para Pequenos Animais no Campus II – PUCPR), que apresenta estrutura para procedimento cirúrgico de grande porte.

Na antessala de cirurgia foi realizada a tricotomia torácica à esquerda e em ambos os membros anteriores para, depois, serem puncionadas duas veias periféricas nos membros anteriores. As medicações pré-anestésicas administradas foram diazepam (Valium®), na dose de 0,5 mg/kg, e butorfanol (Turbogesic®), na dose de 0,4 mg/kg de peso.

Na sala de cirurgia, os animais foram posicionados em decúbito lateral direito (vide Figura 2) e monitorados com eletrocardiograma contínuo e oximetria de pulso, obtida na língua do animal. A monitoração hemodinâmica era completada com a cateterização da artéria dorsal da orelha para aferição contínua da pressão arterial.

A profilaxia de infecções operatórias foi realizada uma hora antes da operação e continuada por 48 horas. Foram utilizados os antibióticos: ceftiofur (Exenel®, Pfizer), na dose de 1 mg/kg de peso, e gentamicina (Gentamicina®, Neo-química) na dose de 4 mg/kg.

A anestesia foi induzida com propofol na dose de 4 mg/kg (Diprivan®, Astra Zeneca) e cloridrato de fentanila na dose de 3 µg/kg (Fentanest®, Cristália), para posterior realização da intubação oro-traqueal. O animal foi ventilado em respirador a volume Oxigel® 1722 (Oxigel Materiais Hospitalares Ind. e Com. Ltda.), na frequência de 12 incursões por minuto, com aferição da pressão parcial do CO₂ exalado por capnografia. A anestesia também foi mantida com propofol na dose de 0,6 mg/kg/minuto.

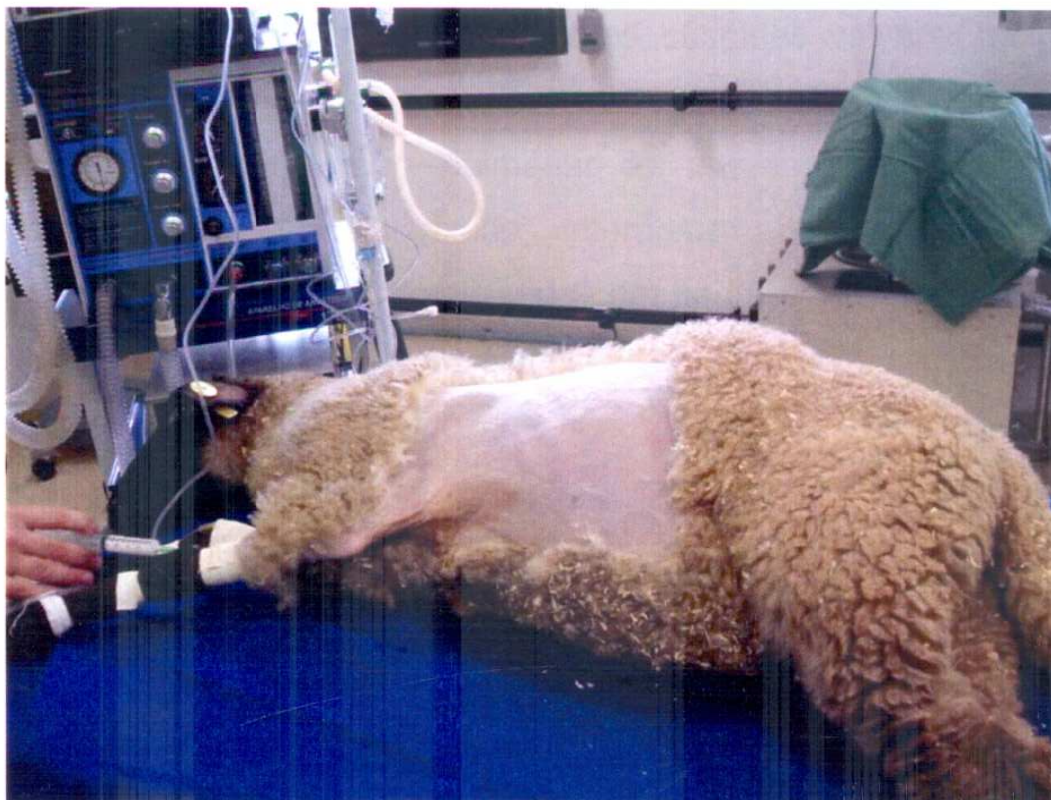


Figura 2 – Ovelha posicionada em decúbito lateral direito sobre a mesa operatória, durante a indução anestésica. Tricotomia do hemitórax esquerdo sobre a topografia do local da incisão operatória.

3.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após a antissepsia torácica com povidine degermante e álcool iodado, e a colocação de campos estéreis, a diérese foi realizada por toracotomia lateral esquerda, no 4^o espaço intercostal. Rebatendo-se o pulmão inferiormente, visualizou-se a aorta torácica para a confecção de duas suturas em bolsa com fio de polipropileno 4.0 (Prolene[®]). O saco pericárdico foi aberto permitindo a visualização do coração e grandes vasos, em particular o átrio direito e a artéria pulmonar (Figura 3). Após o reparo do pericárdio, com seis fios de seda 0, e confecção da uma sutura em bolsa no apêndice atrial direito, com fio polipropileno 4.0, era realizada a anticoagulação sistêmica com injeção intravenosa de heparina na dose de 250 U/kg (Liquemine[®], Roche).

Após a introdução de uma cânula arterial de 18 “French” na aorta torácica (Figura 4) e a introdução de uma cânula venosa de 32 “French” no átrio direito (Figura 5), era instituída a circulação extracorpórea em normotermia e com diluição total, com fluxo de 2,4 litros/m². Não foi necessária a oclusão da aorta e as operações foram realizadas com o coração batendo. Com a oclusão proximal e distal do tronco pulmonar, foram ressecados dois centímetros deste tronco. Abrindo-se a pinça oclusora proximal, foram também ressecadas as três cúspides

pulmonares nativas. Após a ressecção destas cúspides valvares pulmonares, a pinça oclusora proximal era reposicionada.

A reconstrução do tronco pulmonar foi realizada com o implante do homoenxerto pulmonar descelularizado, interposto entre os cotos do tronco pulmonar. As anastomoses foram realizadas com fio de polipropileno 5.0 em sutura contínua. Não havendo sangramento significativo, a circulação extra-corpórea era descontinuada e seguida da retirada das cânulas arterial e venosa (Figura 6). A anticoagulação não era revertida.

Após a cuidadosa revisão da hemostasia e a colocação de dreno tubular em selo d'água em hemitórax esquerdo, foi realizada a síntese anatômica torácica, respeitando-se os planos anatômicos. Utilizamos o fio de polipropileno número um para aproximarmos a 4ª e 5ª costelas, o Vicryl® (poliglactina 910) número 1 para o plano muscular e o fio de mononylon 2.0 para a pele (Figura 7). Uma hora após a cirurgia o dreno torácico era retirado (Figura 8).

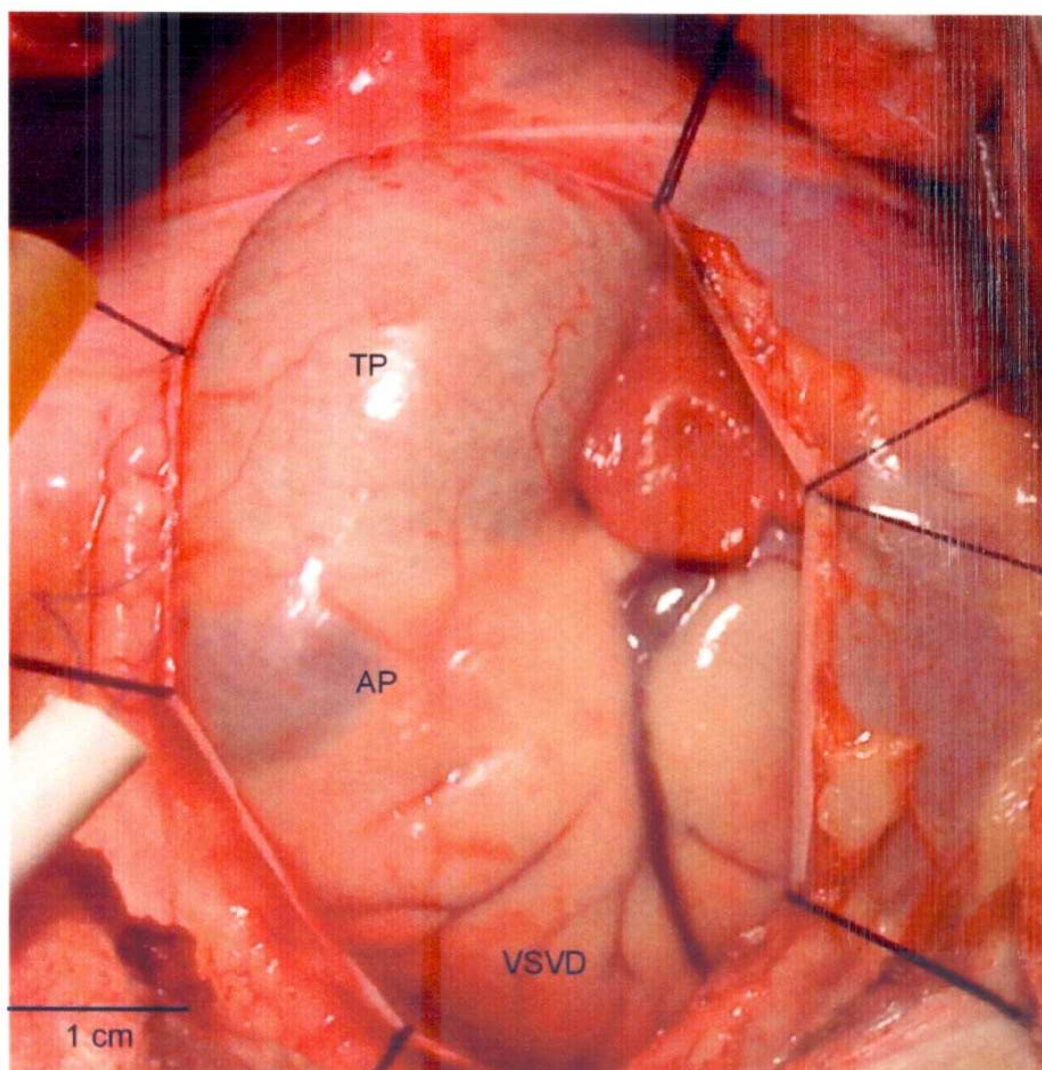


Figura 3 – Aspecto do campo operatório após a pericardiotomia, visualizando-se a via de saída do ventrículo direito (VSVD), anel pulmonar (AP) e tronco pulmonar (TP).

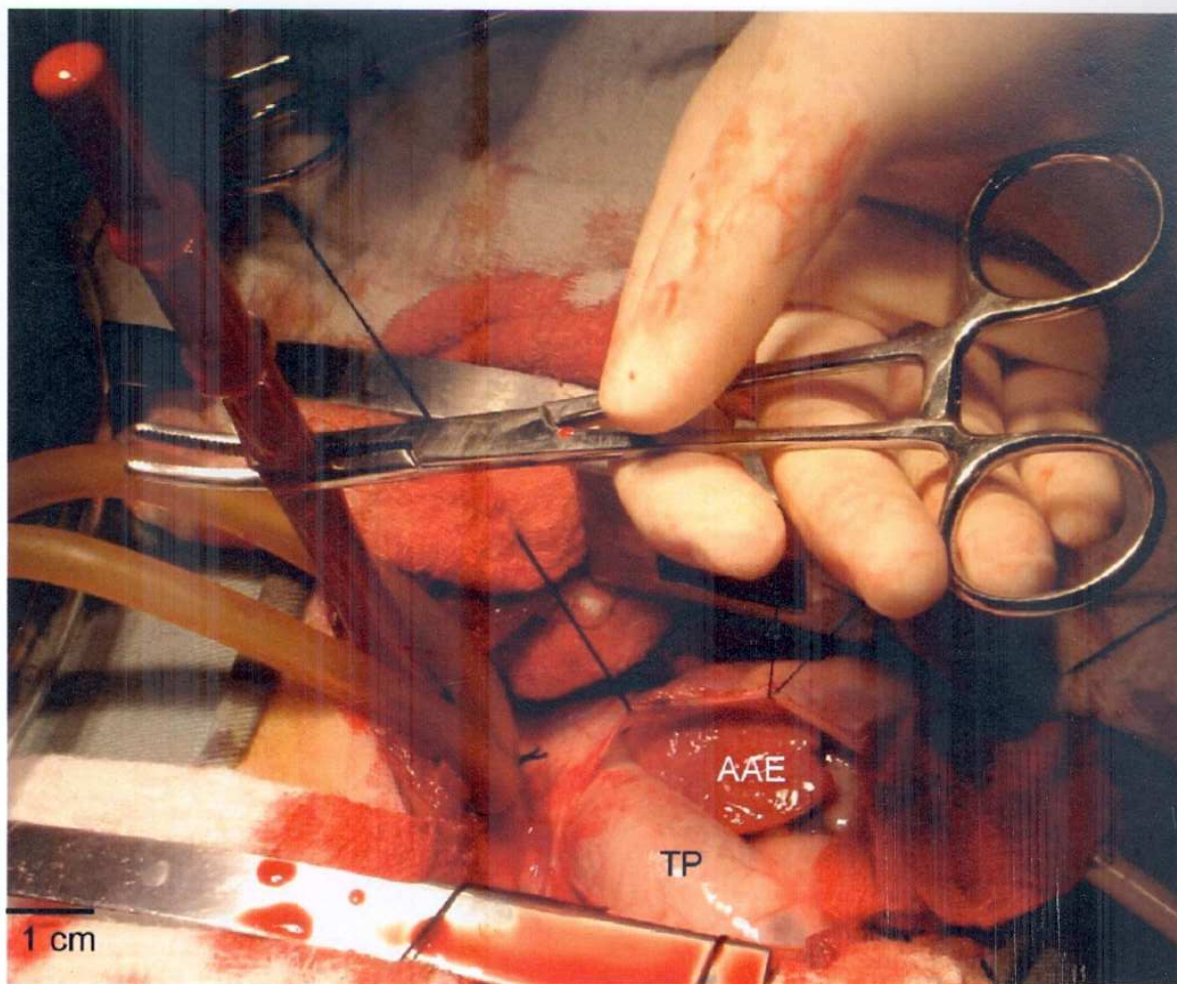


Figura 4 – Introdução da cânula arterial na aorta torácica. TP: tronco pulmonar. AAE: apêndice atrial esquerdo.

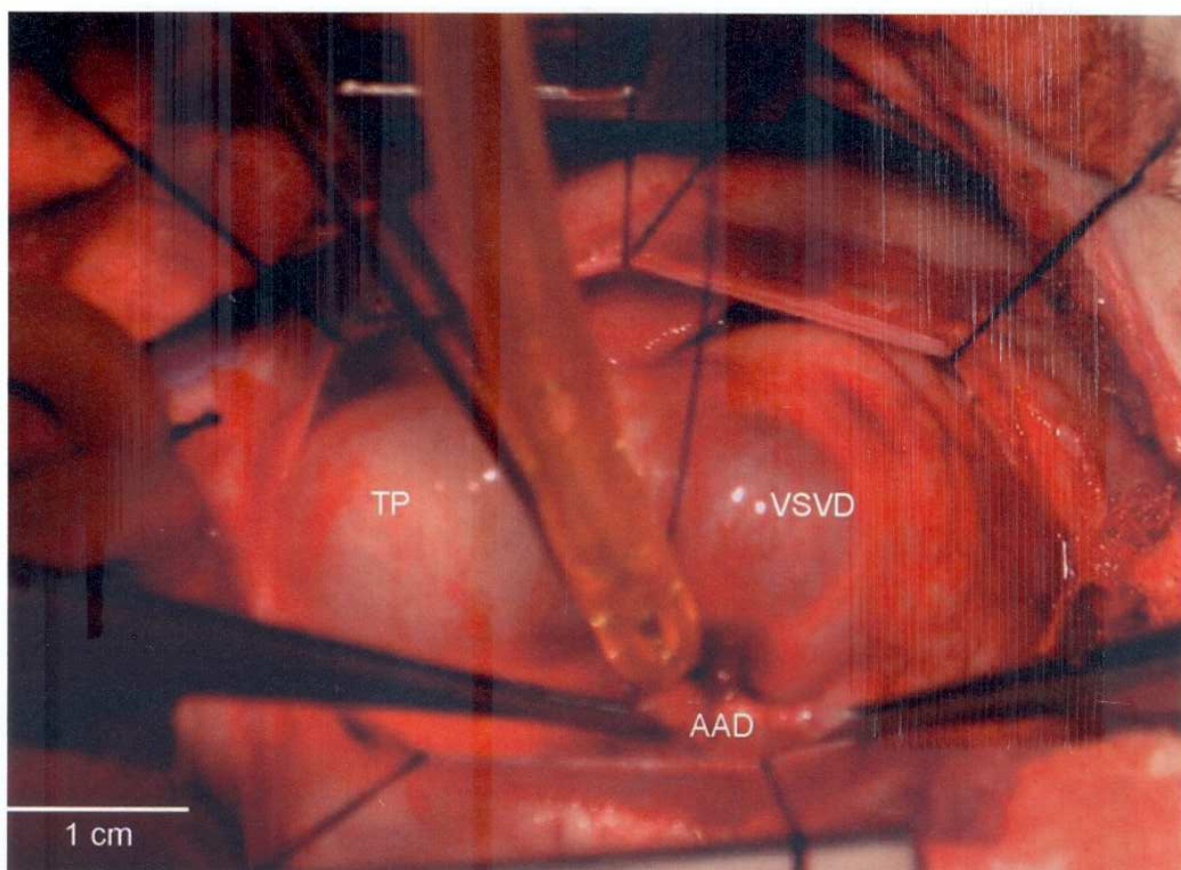


Figura 5 – Introdução da cânula venosa no apêndice atrial direito (AAD). TP: tronco pulmonar. VSVD: via de saída do ventrículo direito.

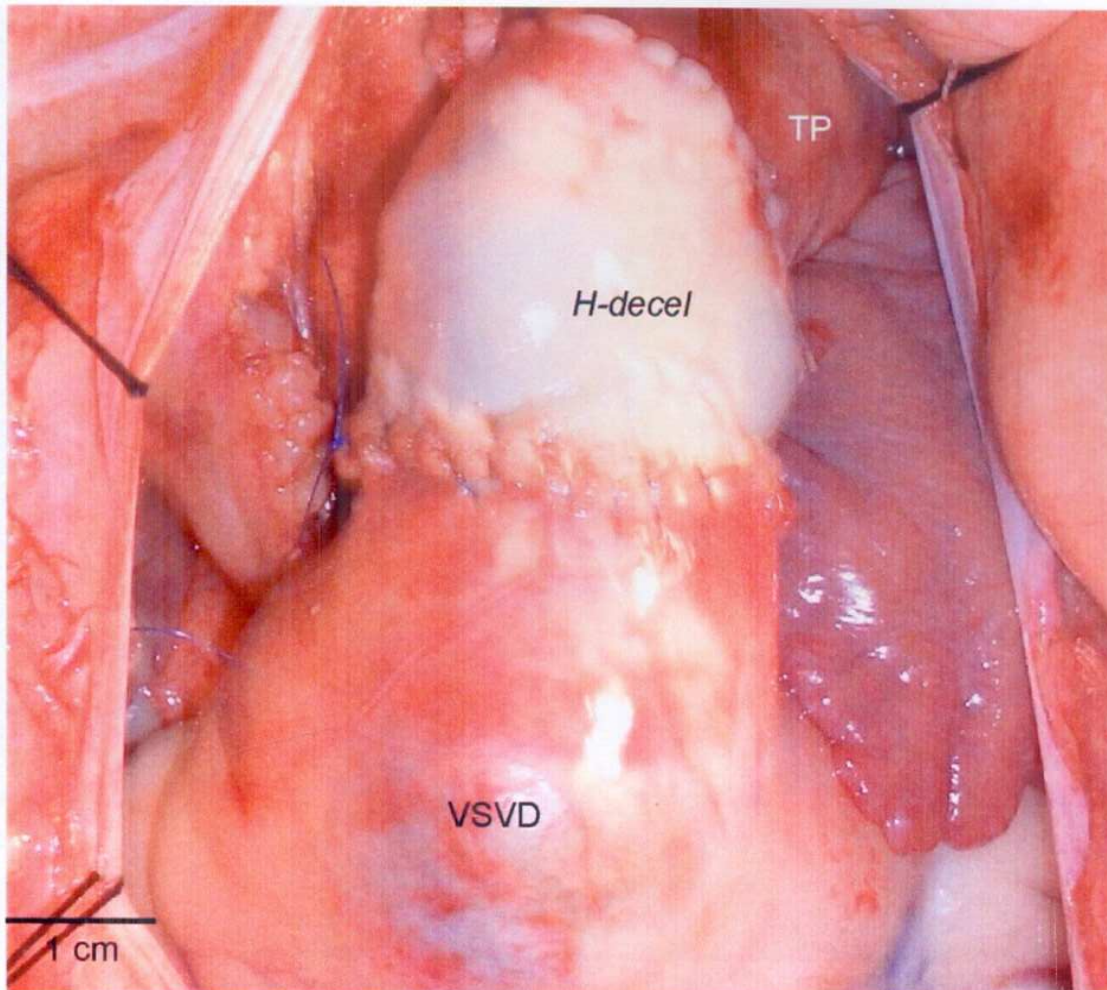


Figura 6 – Aspecto final após o implante do homoenxerto descelularizado (*H-decel*). VSVD: via de saída do ventrículo direito. TP: tronco pulmonar.

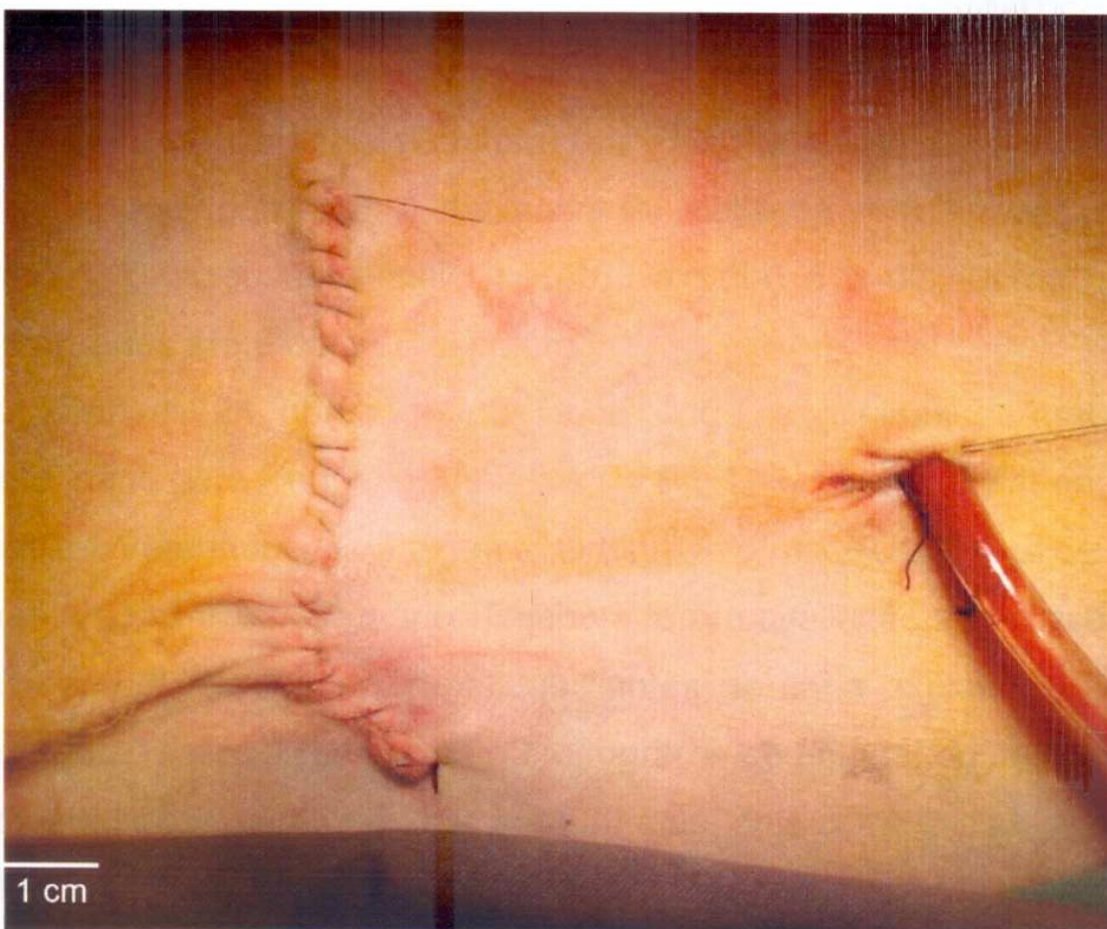


Figura 7 – Ferida operatória após a síntese dos planos e dreno tubular torácico sob selo d'água.



Figura 8 – Ovelha já em posição ortostática uma hora após a cirurgia e após a retirada do dreno.

3.6 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Os animais receberam antibiótico-profilaxia com ceftiofur (Exenel[®], Pfizer) na dose de 1 mg/kg e gentamicina (Gentamicina[®], Neo-química) na dose de 4 mg/kg), por 48 horas no pós-operatório. A analgesia foi realizada com flumexil (Banamine[®], Shering Plogh). O ácido acetil-salicílico (100 mg/dia) e o dipiridamol (75 mg/dia) foram administrados até a data do explante.

Nas primeiras 24 horas de pós-operatório, as ovelhas permaneceram no Hospital Veterinário para Pequenos Animais da PUCPR, depois foram encaminhados para o Hospital Veterinário da Fazenda Gralha Azul da PUCPR, onde receberam acompanhamento clínico-veterinário. Também foram avaliadas por ecocardiogramas com estudo “Doppler” seriados, repetidos antes de cada explante. Cada enxerto teve seu explante realizado conforme o cronograma do estudo, ou seja, dois animais com sete dias de pós-operatório, dois com 30 dias, dois com 90 dias e, por fim, dois com 180 dias.

3.7 EUTANÁSIA

A eutanásia destes animais foi realizada no centro cirúrgico do Hospital Veterinário da PUCPR, com técnica asséptica, após indução anestésica com ketamina (2 mg/kg) e manutenção com halotano. Foram realizadas novas toracotomias laterais esquerdas para dissecação dos enxertos. Neste momento, já foram avaliados alguns aspectos macroscópicos do mesmo e realizada a documentação fotográfica. Após a anticoagulação sistêmica com heparina (Liquemine[®], Roche) na dose de 250 U/kg, sob anestesia e analgesia, as ovelhas receberam a infusão endovenosa de 40 mEq de cloreto de potássio. Logo que os corações pararam, foram retirados os homoenxertos. Após a eutanásia, os animais foram enviados para o departamento de anatomia patológica do mesmo hospital para descarte.

3.8 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO

3.8.1 Análise Ecocardiográfica

Os ecocardiogramas foram realizados por um único observador num aparelho Philips – SONOS 5500[®] em prazos de 15 dias, 45 dias, 100 dias e 170 dias de pós-operatório.

Com auxílio do “*Doppler*” contínuo e pulsado, foram avaliados os seguintes parâmetros ecocardiográficos: competência valvar, mobilidade e espessamento das cúspides, presença eventual de calcificações, vegetações e trombos, velocidade de fluxo (m/s) e gradiente valvar (mmHg), este último dado pela equação de Bernoulli simplificada:

$$\text{Gradiente valvar (mmHg)} = 4 \cdot \text{velocidade de fluxo (m/s)}^2$$

3.8.2 Análise Macroscópica

Foram avaliados parâmetros como aderências, consistência do enxerto, presença e distribuição de calcificações, vegetações, trombos, aspecto e mobilidade

das cúspides e diâmetro do anel valvar. Após esta avaliação, foi realizada a documentação fotográfica por uma câmera digital DSC W5[®] – Sony (5.0 megapixels).

A presença de aderências foi classificada em ausente ou presente. Se presente, foi graduada em: discreta (quando era facilmente desfeita, sem a necessidade da secção de tecidos), moderada (quando era necessário seccionar algumas áreas de fibrose para individualização dos planos) ou importante (quando além da necessidade de seccionar áreas de fibrose, era difícil a individualização dos planos).

A mobilidade e o aspecto das cúspides foram classificados em conjunto e de forma interdependente. Quando as cúspides apresentavam-se finas, translúcidas e com ampla mobilidade, foram classificadas como normais. Havendo um espessamento e diminuição da mobilidade da cúspide, esta foi classificada em discretamente, moderadamente ou importantemente comprometida.

Os diâmetros valvares foram aferidos com o auxílio de velas de Hegar.

3.8.3 Análise Microscópica

Um segmento longitudinal do enxerto, contendo as anastomoses proximal e distal, o conduto e o folheto, após a fixação com formaldeído a 10%, foram emblocados em parafina e cortados longitudinalmente (cortes de 4 µm). Para a análise histopatológica de cada enxerto explantado foram utilizadas as colorações: hematoxilina-eosina (para estudo da estrutura, reação inflamatória e infiltração celular), Alizarina Red pH 4,2 (presença de fosfato de cálcio) e pH 7,0 (presença de oxalato de cálcio) e Pentacrômio de Movat, nas variantes técnicas de Silvermann-Movat e Russel-Movat (para avaliação das fibras colágenas, fibras elásticas e glicosaminoglicanos).

Os parâmetros utilizados para a caracterização do infiltrado inflamatório, recelularização, reendotelização, neovascularização, calcificação e integridade da matriz extracelular estão discriminados no Anexo II.

4. RESULTADOS

4.1 EVOLUÇÃO CLÍNICA

Não houve óbito e todos os animais atingiram seus períodos de seguimento predeterminados em boas condições clínicas, à exceção de um animal (Ovelha 4), que no momento de sua eutanásia, 30 dias após o implante, apresentava comprometimento do estado geral e perda ponderal de 16%.

Como podemos observar pela tabela e gráfico abaixo (Tabela 1 e Figura 9), os demais animais que tiveram seus explantes realizados em sete e 30 dias apresentaram pequena variação ponderal. Já aqueles animais submetidos aos explantes em prazos maiores tiveram ganhos ponderais significativos, sendo de 61 e 71% para os dois animais submetidos aos explantes em 90 dias, e de 73 e 76% para os dois animais de 180 dias.

TABELA 1 – Ganho ponderal das ovelhas submetidas ao implante de homoenxerto pulmonar descelularizado. Peso inicial (em quilogramas, no momento do implante), peso final (no explante, conforme prazo), variação ponderal (em porcentagem)

Ovelha	Tempo evolução (dias)	Peso Inicial (kg)	Peso Final (kg)	Variação (%)
1	7	21	21,3	1,4%
2	7	22	22	0
3	30	25	27,4	9,6%
4	30	25	21	-16,0%
5	90	20	34,2	71%
6	90	21	34	61%
7	180	24	41,6	73,3%
8	180	23	40,5	76%

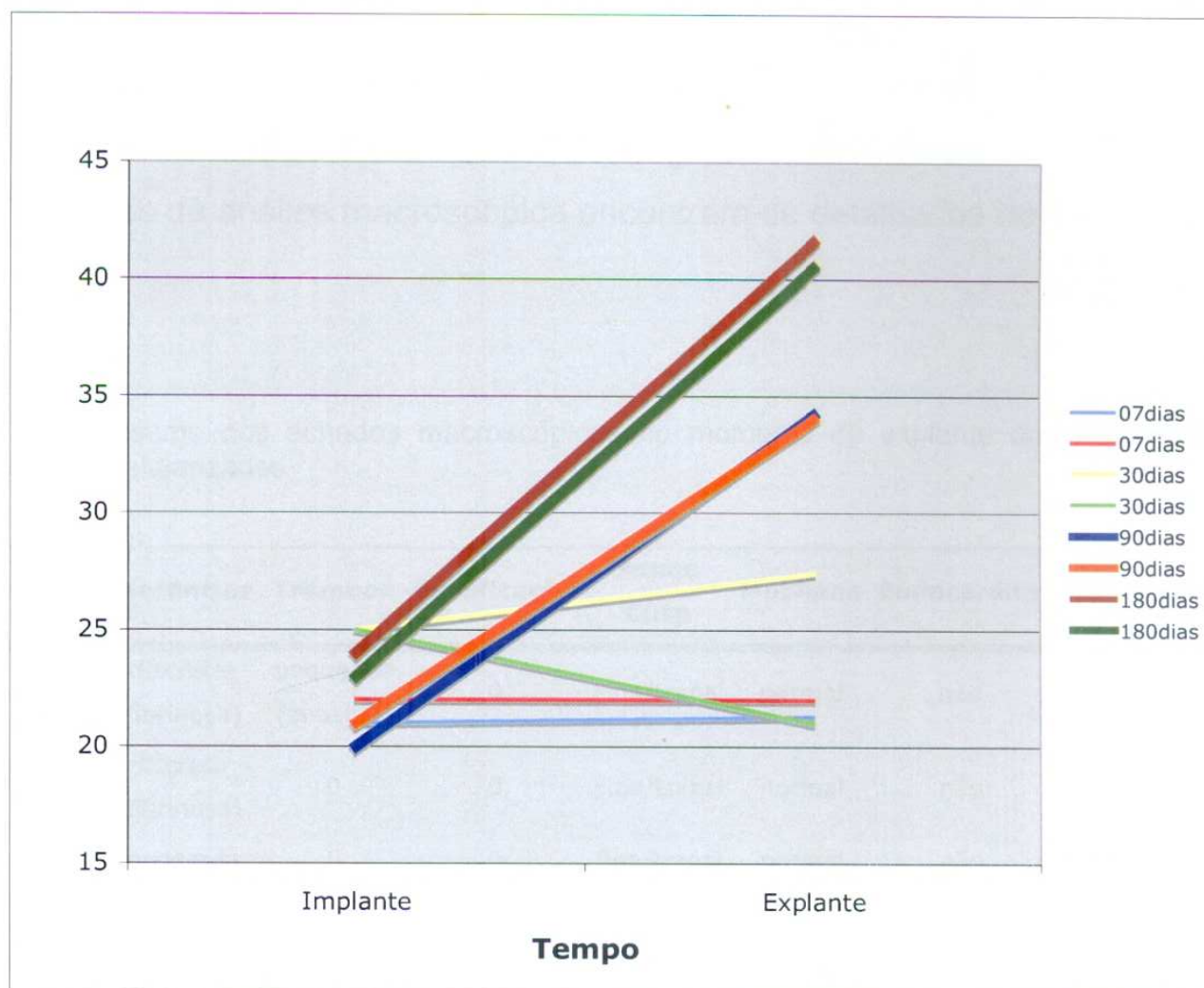


Figura 9 – Gráfico ilustrando o ganho ponderal das ovelhas submetidas ao implante de homoenxerto pulmonar descelularizado. Peso inicial (em quilogramas, no momento do implante), peso final (no explante, conforme prazo).

4.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA

A avaliação macroscópica evidenciou que todos os enxertos mantiveram suas características iniciais, preservando a elasticidade e a integridade do conduto, sem sinais de estenose ou dilatação. Independentemente do prazo de explante, todas as valvas mantiveram o aspecto fino e translúcido e a mobilidade normal das cúspides, sem sinais macroscópicos de degeneração ou calcificação (Figuras 10 e 11). A exceção é a Ovelha 4, que apresentava endocardite infecciosa do enxerto, com a presença de vegetações e trombos recentes nas cúspides, com espessamento discreto das mesmas. Este enxerto comprometido pela endocardite também apresentava calcificações discretas nas anastomoses proximais e distais. Este achado de endocardite infecciosa explica a clínica e a perda ponderal deste animal.

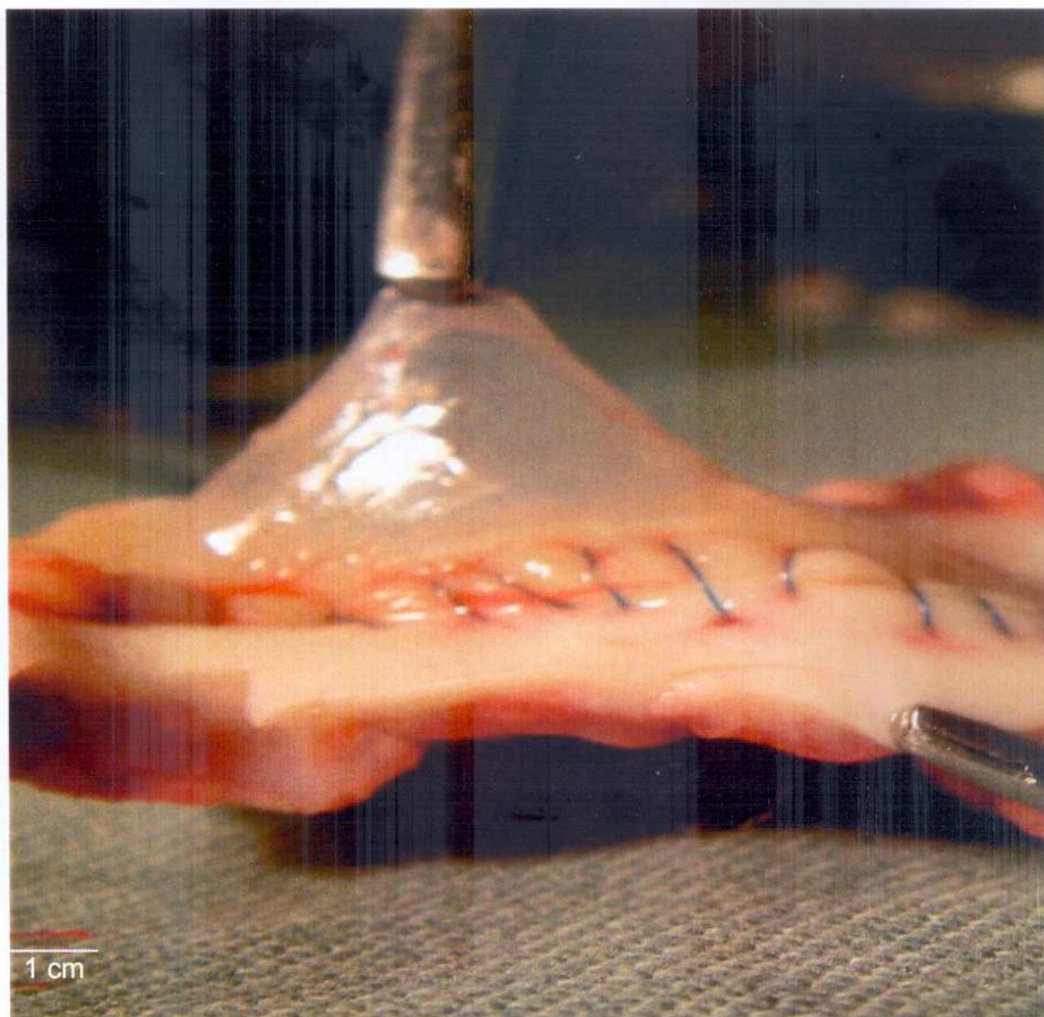
Não encontramos um padrão definido para a apresentação das aderências, porém não houve diferença na intensidade desta aderência comparando a interface tecido autólogo-tecido autólogo ou tecido autólogo-enxerto (Figuras 12, 13 e 14).

Os dados da análise macroscópica encontram-se detalhados na Tabela 2.

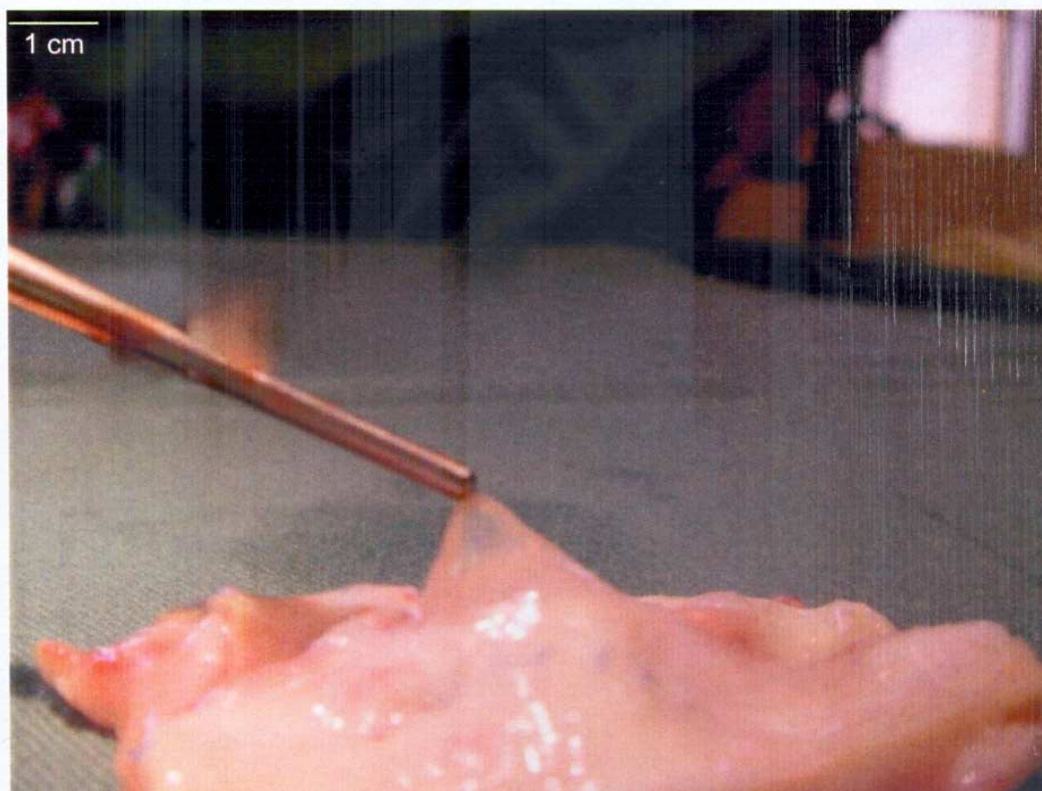
TABELA 2 – Resumo dos achados macroscópicos no momento do explante dos homoenxertos pulmonares descelularizados

Ovelha	Prazo	Aderências	Trombos	Calcificação	Aspec Cúsp	Mobilidade	Endocardite	Observações
1	7	discreta (fibrinosa)	pequenos (anast D)	0	Fina/transl	normal	não	-
2	7	discreta (fibrinosa)	0	0	Fina/transl	normal	não	edema da cúspide
3	30	moderada	0	0	fina/transl	normal	não	-
4	30	moderada	presentes (cúspides)	discretas (anast P/D)	espessam discreto	diminuída	sim	veget 1mm (cúspides)
5	90	discreta	0	0	fina/transl	normal	não	-
6	90	discreta	0	0	fina/transl	normal	não	-
7	180	moderada	0	0	fina/transl	normal	não	-
8	180	discreta	0	0	fina/transl	normal	não	-

Prazo – Prazo de explante (em dias)
 Aspec Cúsp – Aspecto da cúspide
 Transl – Translúcida
 Anast D – Anastomose distal
 Anast P/D – Anastomoses proximal e distal
 Veget – Vegetação



A



B

Figura 10 – Aspecto translúcido das cúspides dos homoenxertos pulmonares descelularizados explantados após 180 dias, observado tanto na ovelha 7 (fotografia A), como na ovelha 8 (fotografia B).



Figura 11 – Homoenxerto pulmonar descelularizado explantado após 180 dias, observa-se a elasticidade do conduto, as cúspides translúcidas, a reendotelização e a ausência de calcificações.

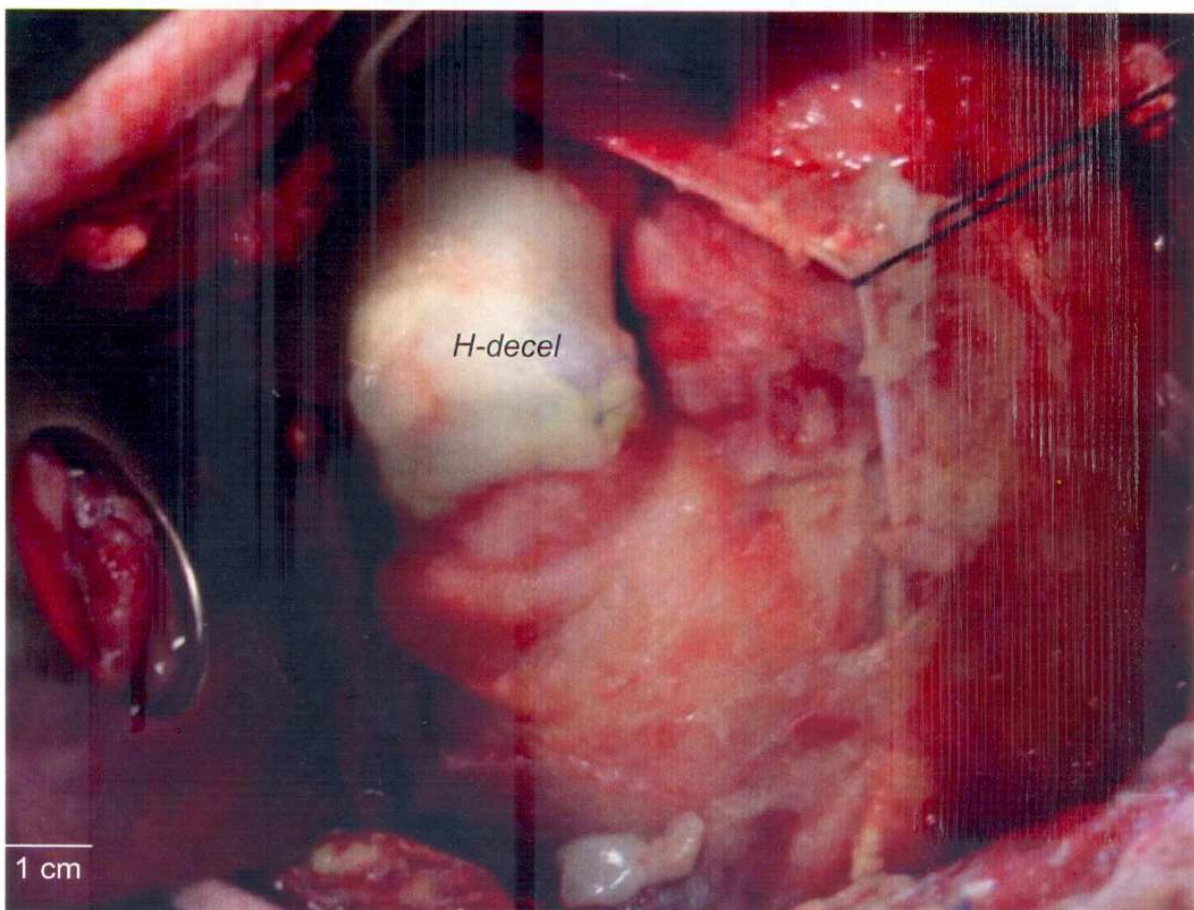


Figura 12 – Homoenxerto pulmonar descelularizado (*H-decel*) no momento do explante após sete dias. Notam-se aderências fibrinosas.

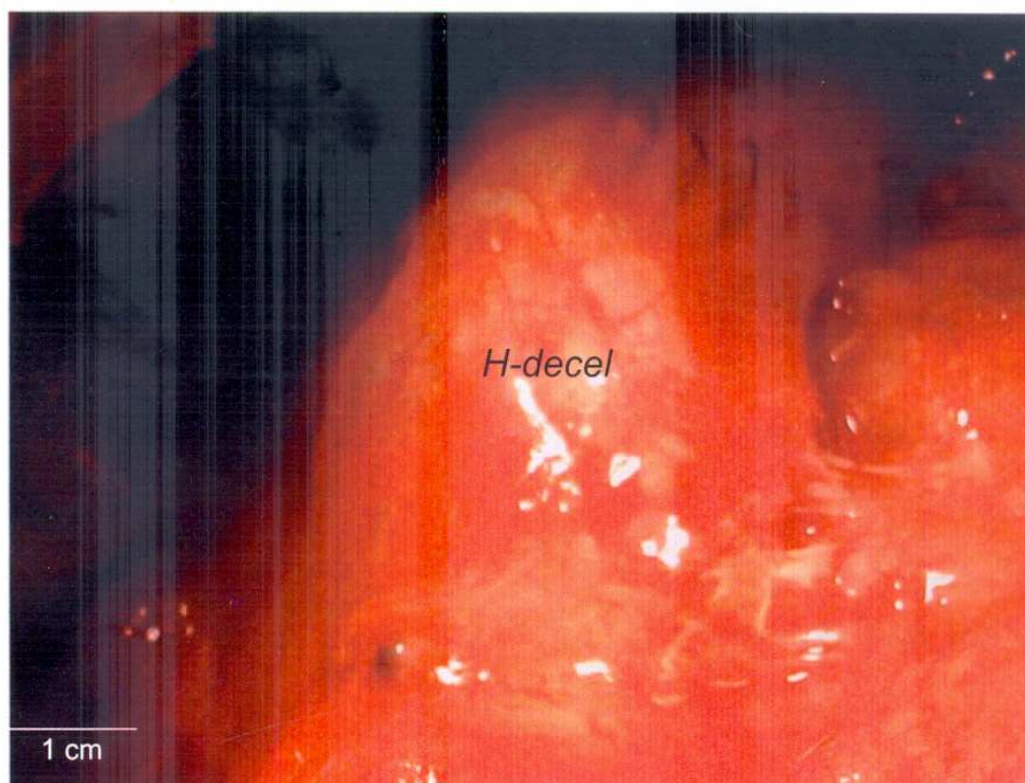


Figura 13 – Homoenxerto pulmonar descelularizado (*H-decel*) no momento do explante após 180 dias. Nota-se aderências moderadas. Não há diferença das aderências entre tecido nativo e homoenxerto descelularizado.

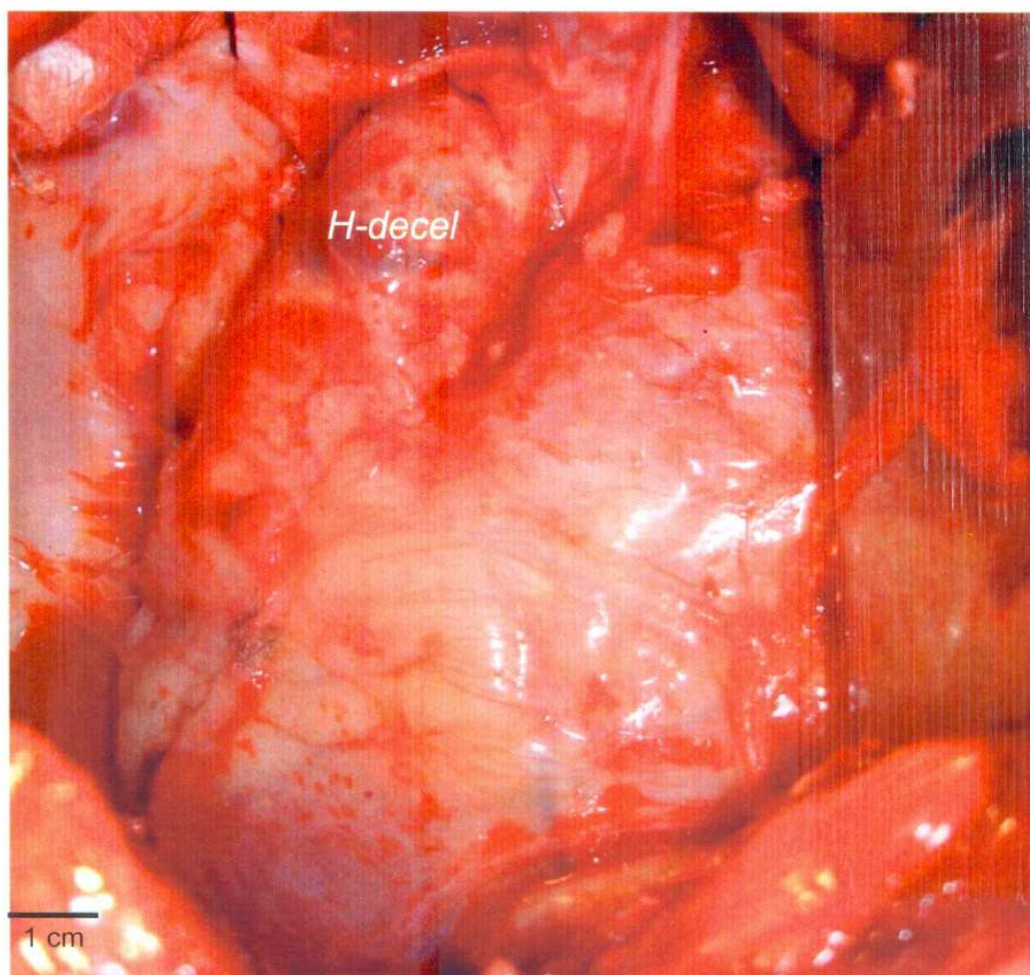


Figura 14 – Homoenxerto pulmonar descelularizado (*H-decel*) no momento do explante após 180 dias. Nota-se aderências discretas. Não há diferença das aderências entre tecido nativo e homoenxerto descelularizado.

4.2.1 Diâmetro Valvar

O diâmetro médio do anel pulmonar nativo no momento do implante foi de 18,7 mm ($DP \pm 1,90$), enquanto que o diâmetro médio dos enxertos implantados foi de 20,0 mm ($DP \pm 2,07$), mostrando a equivalência da proporção enxerto-receptor.

Não houve variação no diâmetro dos enxertos explantados após sete e 30 dias. Porém, houve um aumento de 15,70% no diâmetro dos enxertos explantados após 90 dias. Da mesma forma, houve um aumento de 35,8% (33,3% e 38,3%) no diâmetro dos enxertos explantados após 180 dias. *Vide* Tabela 3. O gráfico da figura 15 também ilustra o aumento no diâmetro dos enxertos após 90 e 180 dias.

TABELA 3 – Homenxertos pulmonares descelularizados para a reconstrução da VSVD de ovinos. Diâmetros valvares em milímetros (mm) do anel nativo e do homoenxerto no momento do implante, diâmetro do homoenxerto no momento do explante, variação (porcentagem)

Ovelha	Prazo (dias)	Implante		Explante	Variação
		Anel Nativo (mm)	Enxerto (mm)	Enxerto (mm)	(%)
1	7	19	21	21	0
2	7	22	23	23	0
3	30	20	22	22	0
4	30	20	21	21	0
5	90	17	19	23	15,7
6	90	16	19	23	15,7
7	180	18	18	24	33,3
8	180	18	17	24	38,3

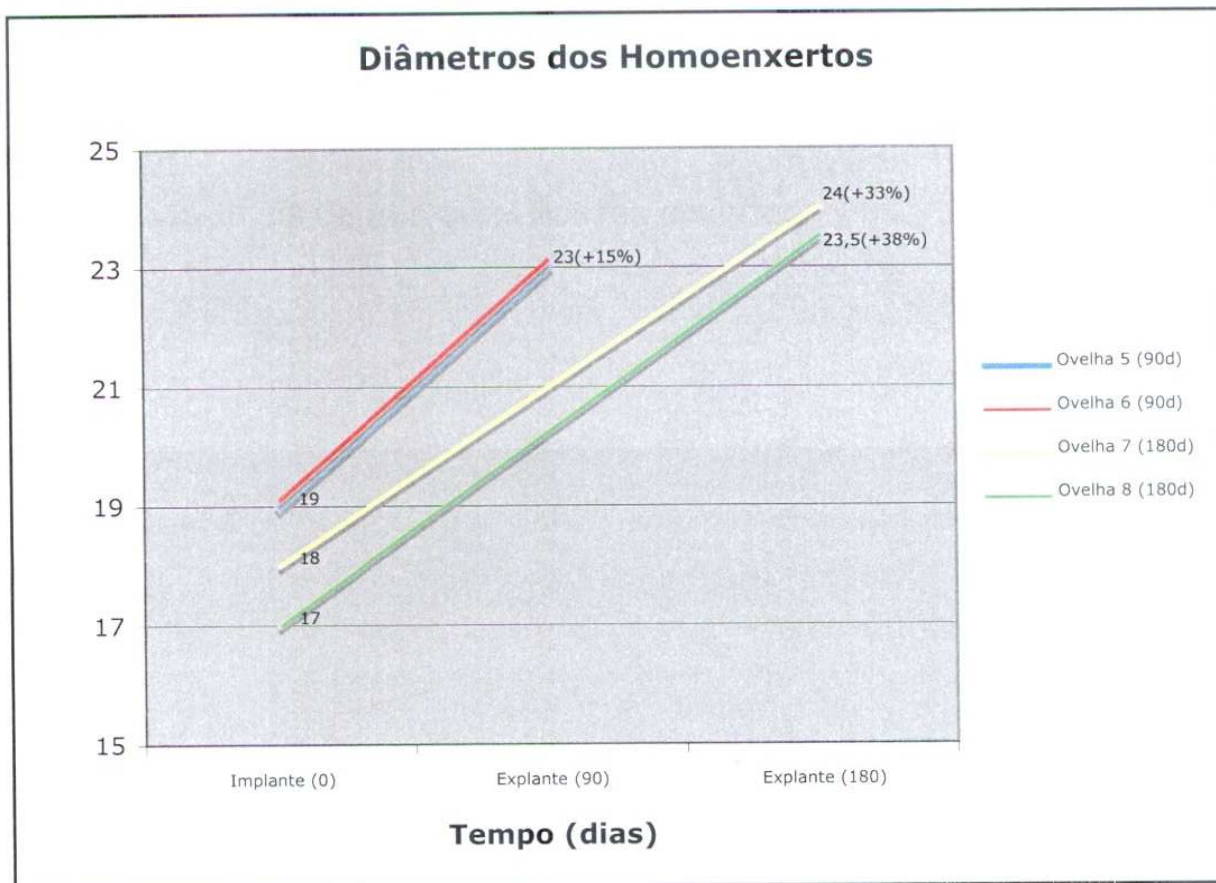


Figura 15 – Gráfico ilustrando a variação do diâmetro dos homoenxertos pulmonares descelularizados entre o momento do implante e o momento dos explantes, realizados após 90 e 180 dias.

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.3.1 Hematoxilina-eosina

Explantes de sete dias (Ovelhas 1 e 2)

Apresentaram pouca atividade inflamatória aguda no conduto, constituída principalmente por células com características de polimorfonucleares (neutrófilos) provenientes em maior número da adventícia do enxerto, e também pela migração através das anastomoses e pela luz do enxerto (Figuras 16 e 17). Acompanhando esta atividade inflamatória, encontrou-se raros monócitos e histiócitos. Pode-se observar, também, poucas células endoteliais (uma a duas células/campo 400X). Este endotélio, ainda imaturo e esparso, é facilmente removível pelo processo de preparação da lâmina.

Neste período, também não se pode observar sinais de neovascularização.

Os folhetos destes enxertos encontravam-se totalmente descelularizados, sem sinais de inflamação, recelularização, reendotelização e neovascularização (Figura 18).

Não havia sinais de trombose desses enxertos.

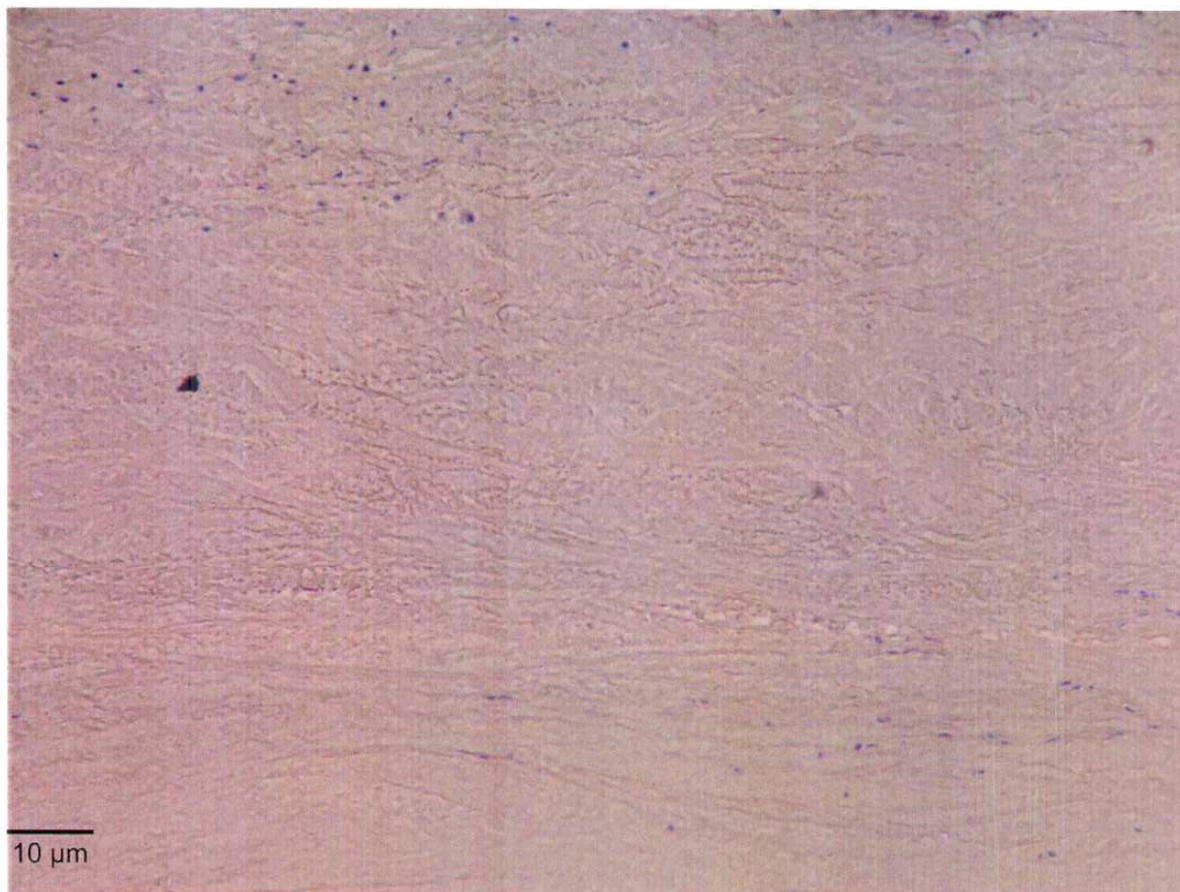


Figura 16 – Homoenxerto pulmonar descelularizado explantado após sete dias. Presença de células com características polimorfonucleares predominantemente na adventícia, ovelha 1 (HE, 100X).

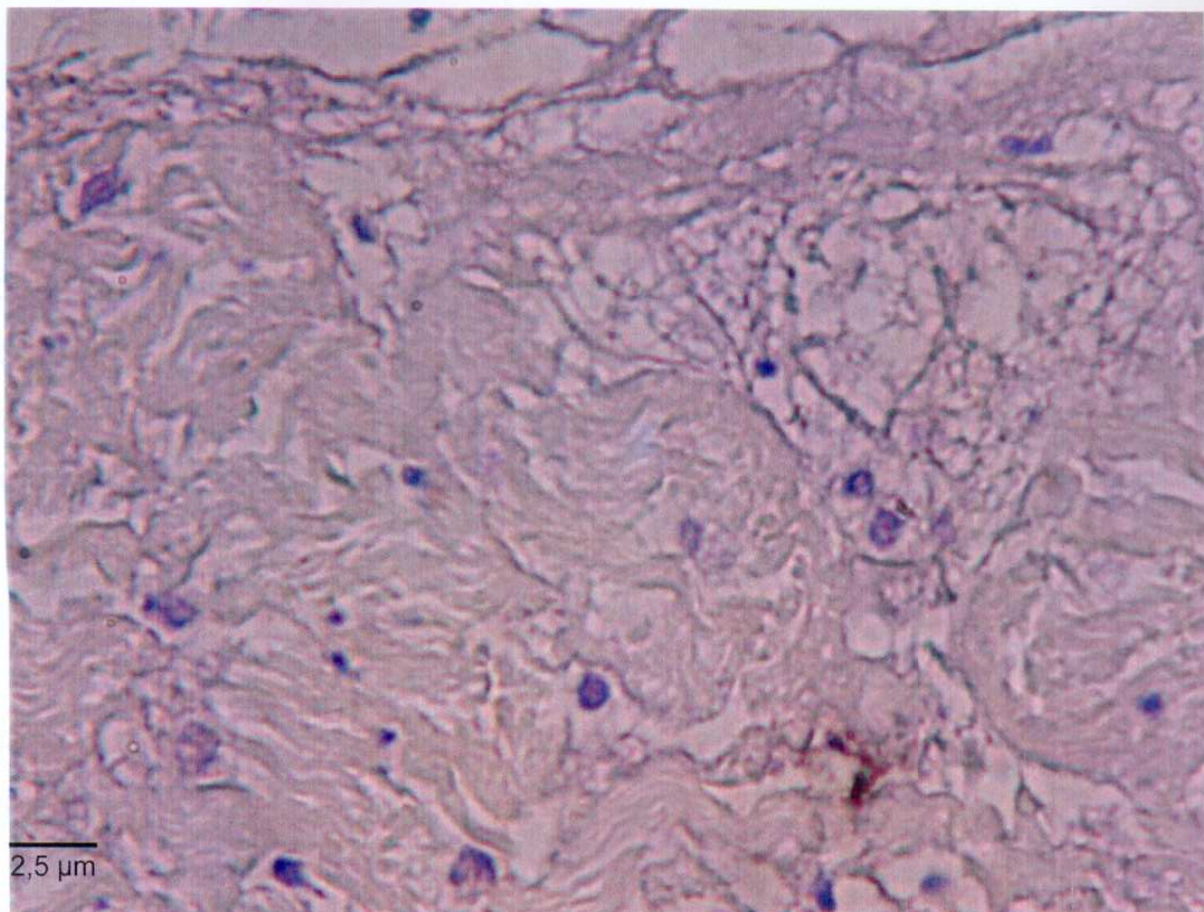


Figura 17 – Homoenxerto pulmonar descelularizado explantado após sete dias. Predomínio de células com características de polimorfonucleares na adventícia do conduto, ovelha 1 (HE, 400X).

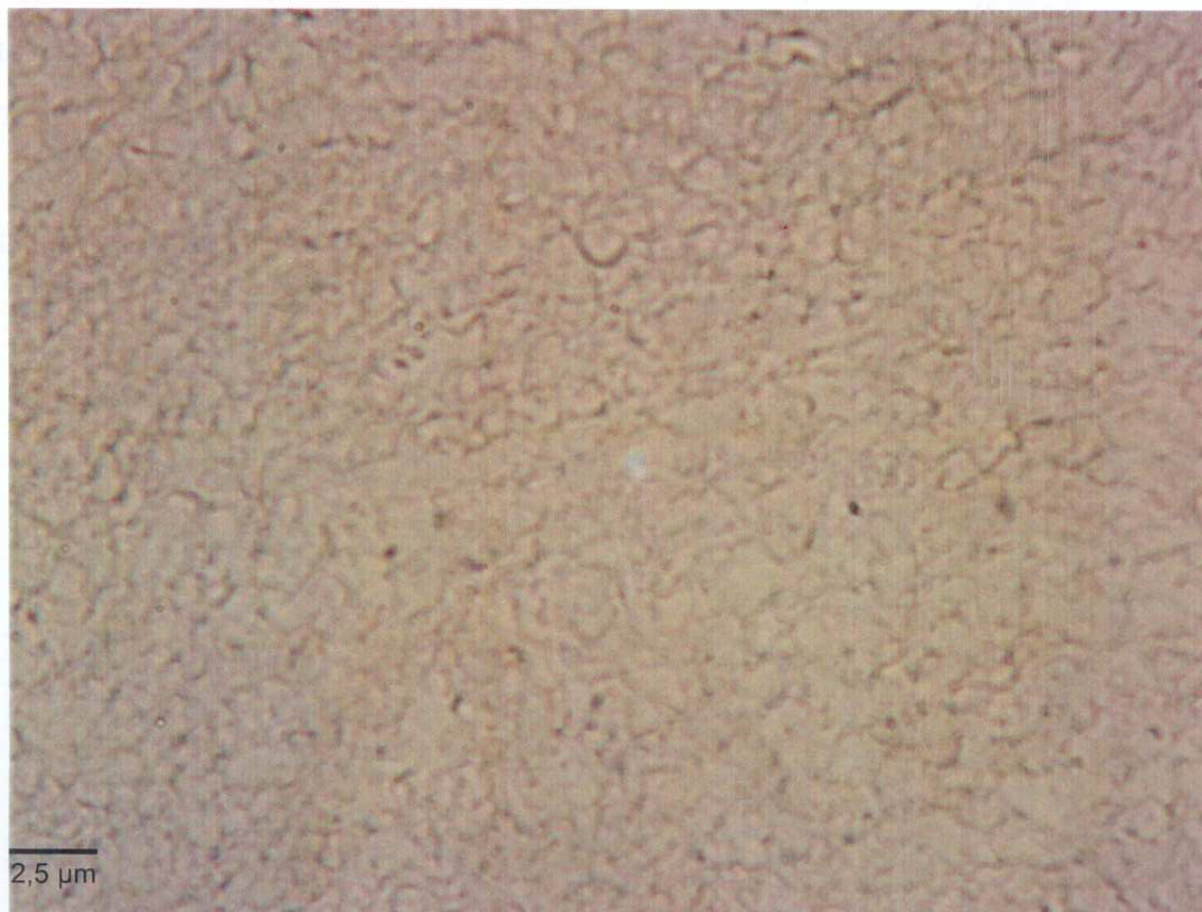


Figura 18 – Homoenxerto pulmonar descelularizado explantado após sete dias. Folheto totalmente acelular, ovelha 1 (HE, 400X).

Explantos de 30 dias (Ovelhas 3 e 4)

A composição celular destes enxertos apresentava-se diferente dos anteriores, havendo poucos polimorfonucleares no conduto, que deram lugar a monomorfonucleares, mais especificamente, células com morfologia de histiócitos, fibroblastos e miofibroblastos. Enquanto os condutos de sete dias eram praticamente acelulares, estes apresentavam moderada quantidade de células, com recelularização das camadas adventícia e média (Figuras 19 e 20).

A reendotelização foi moderada, também mais evidente e firme, permitindo-se observar cinco a seis células por campo de 400X.

O homoenxerto retirado da ovelha número 3 apresentava poucos neovasos, enquanto que o da ovelha número 4 apresentava muitos neovasos na sua adventícia.

O folheto da ovelha número 3 apresentava raros neutrófilos na camada *ventricularis*, não apresentando sinais de infiltrado inflamatório, nem de recelularização, nem de reendotelização.

O folheto da ovelha número 4 – animal que teve a endocardite bacteriana – apresentava um intenso infiltrado inflamatório de polimorfonucleares e bactérias formando cachos, provavelmente estafilococos (Figura 21). Este infiltrado inflamatório avançava até o conduto, junto da inserção do folheto.

Não havia sinais de trombose destes condutos. Pode-se observar alguns trombos nos folhetos da ovelha número 4.

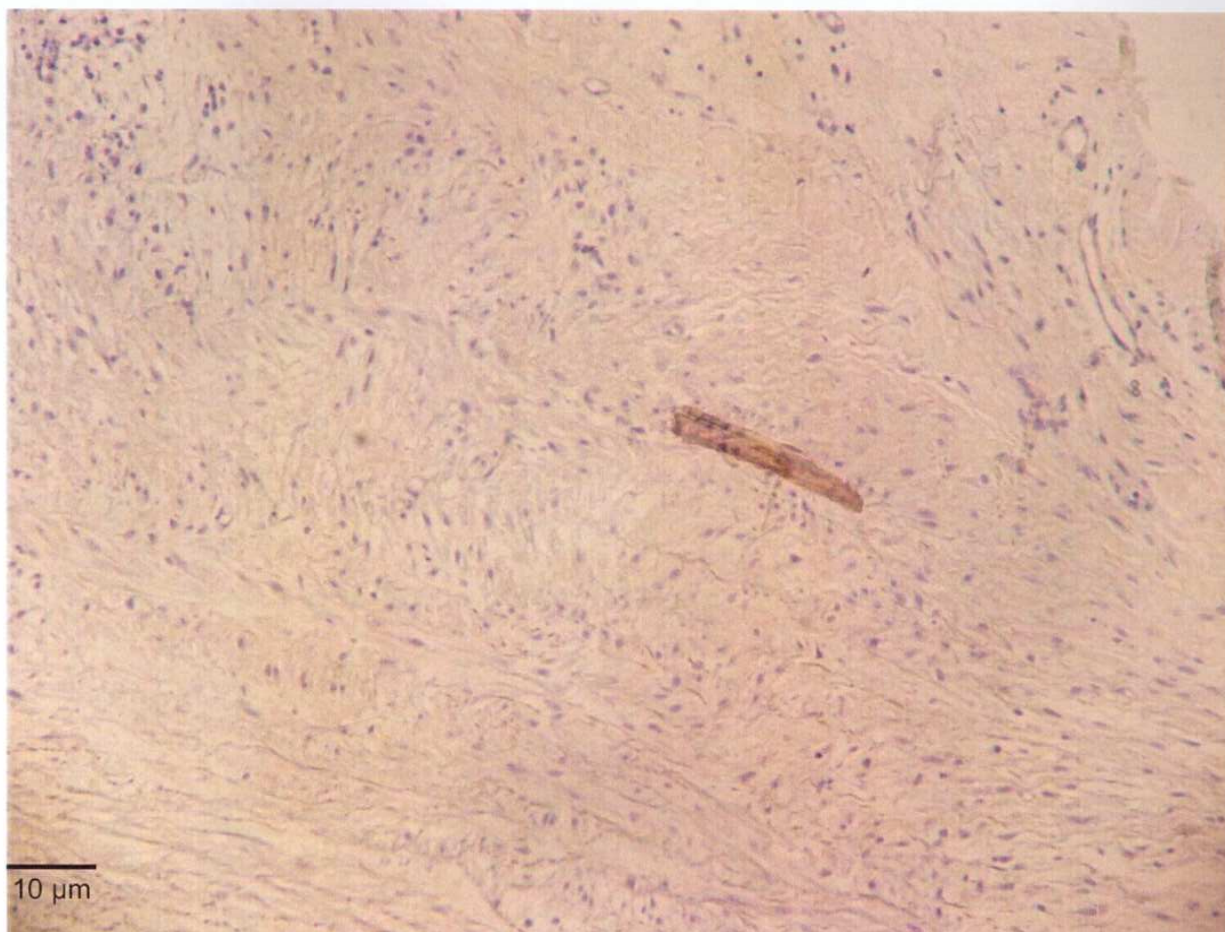


Figura 19 – Homoenxerto descelularizado explantado após 30 dias. Recelularização atingindo a camada média, ovelha 3 (HE, 100X).

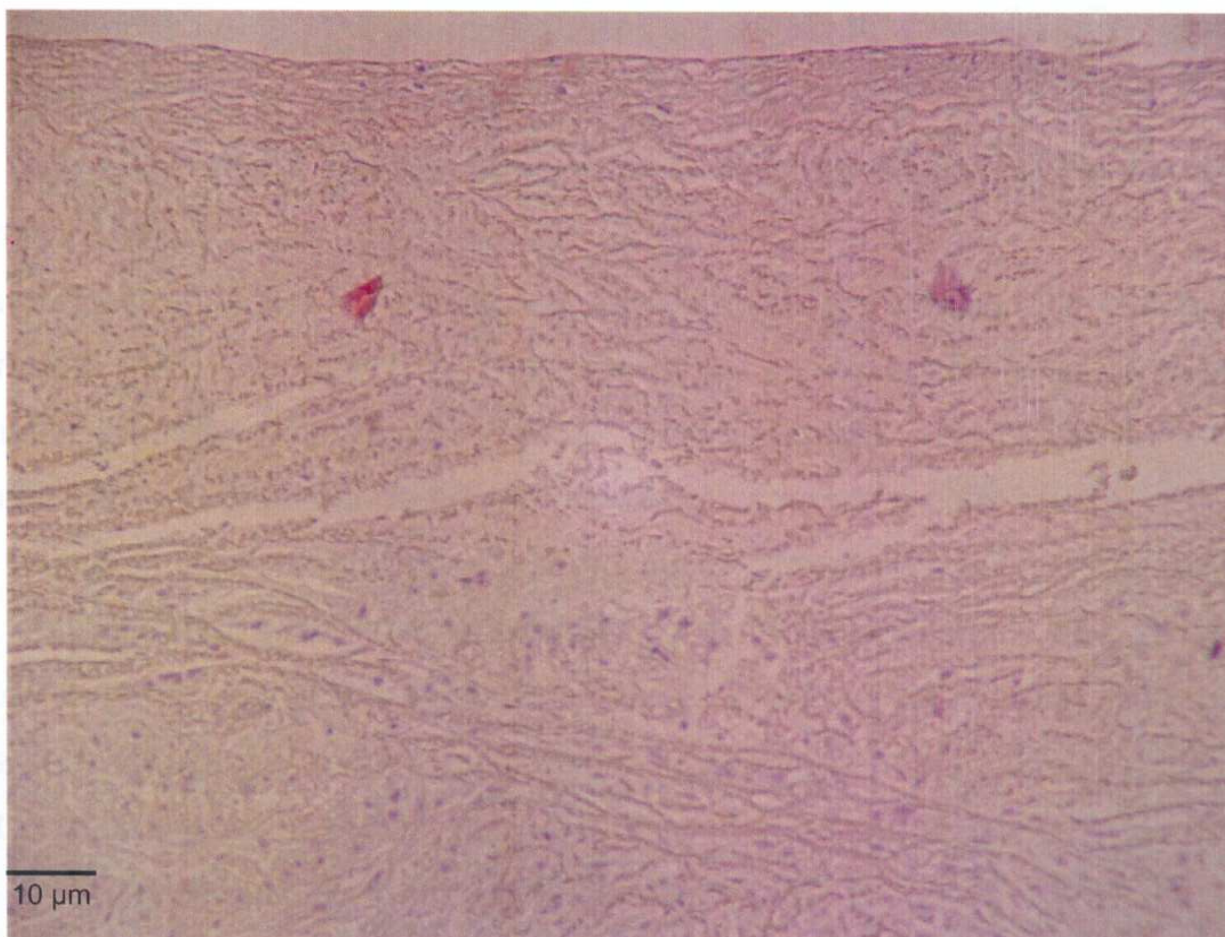


Figura 20 – Homoenxerto descelularizado explantado após 30 dias. Recelularização atingindo a camada média, ovelha 4 (HE, 100X).

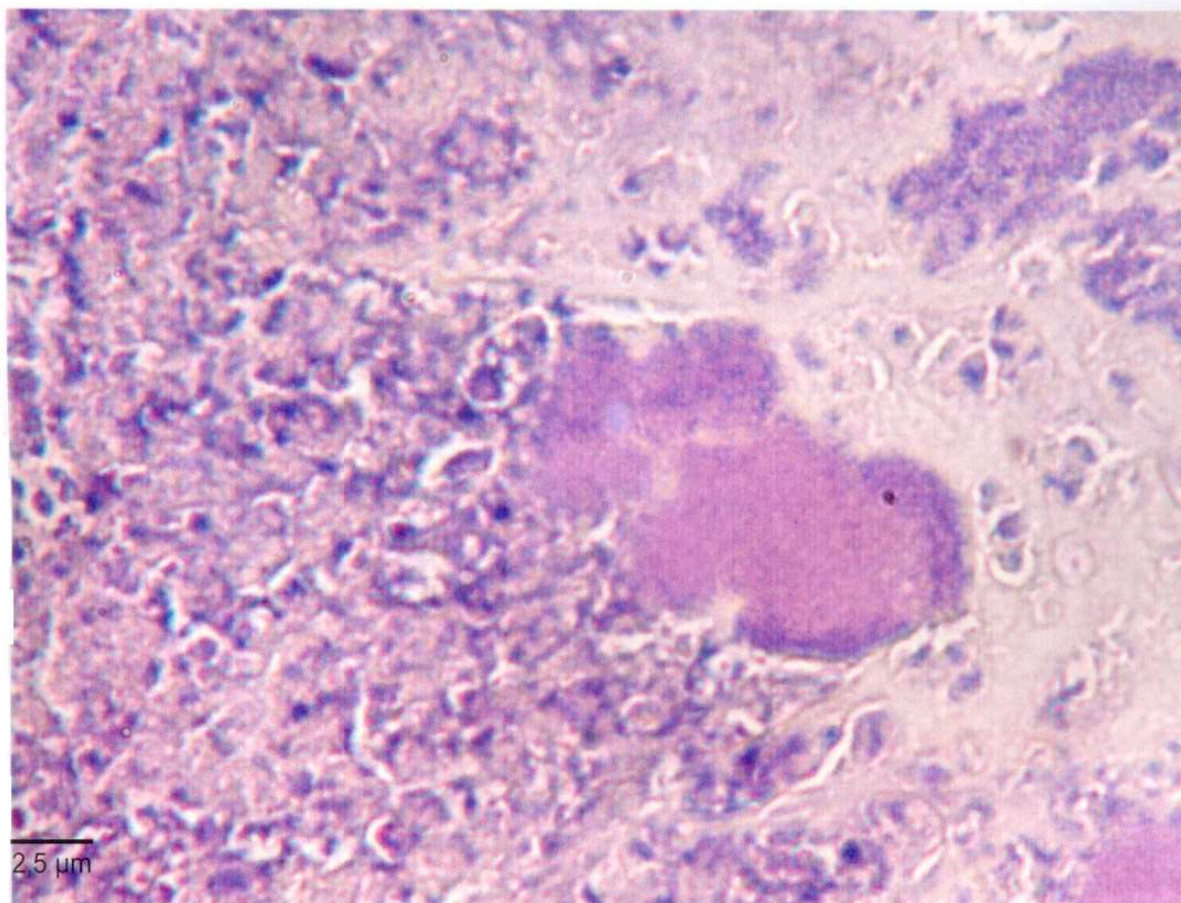


Figura 21 – Homoenxerto descelularizado explantado após 30 dias. Endocardite do folheto, presença de numerosos polimorfonucleares e colônias bacterianas, ovelha 4 (HE, 400X).

Explantos de 90 dias (Ovelhas 5 e 6)

Na composição celular desses enxertos não havia sinais de infiltrado inflamatório agudo, nos quais não se encontrou polimorfonucleares (neutrófilos). Havia poucos monócitos e histiócitos. A recelularização era abundante e homogênea (Figuras 22 e 23), predominantemente por células com características de fibroblastos e miofibroblastos (Figura 24). Esta recelularização organizada permitia a diferenciação de uma camada adventícia de uma camada médio-íntima.

Havia muitos neovasos nas adventícias de ambos os condutos desse grupo.

A reendotelização desses enxertos foi completa, inclusive dos folhetos. Os folhetos também não apresentavam sinais de atividade inflamatória, porém houve pouca recelularização, melhor evidenciada na camada ventricularis dos folhetos e orientando-se da sua base para a extremidade (Figuras 25, 26 e 27).

Não havia sinais de trombose destes enxertos.

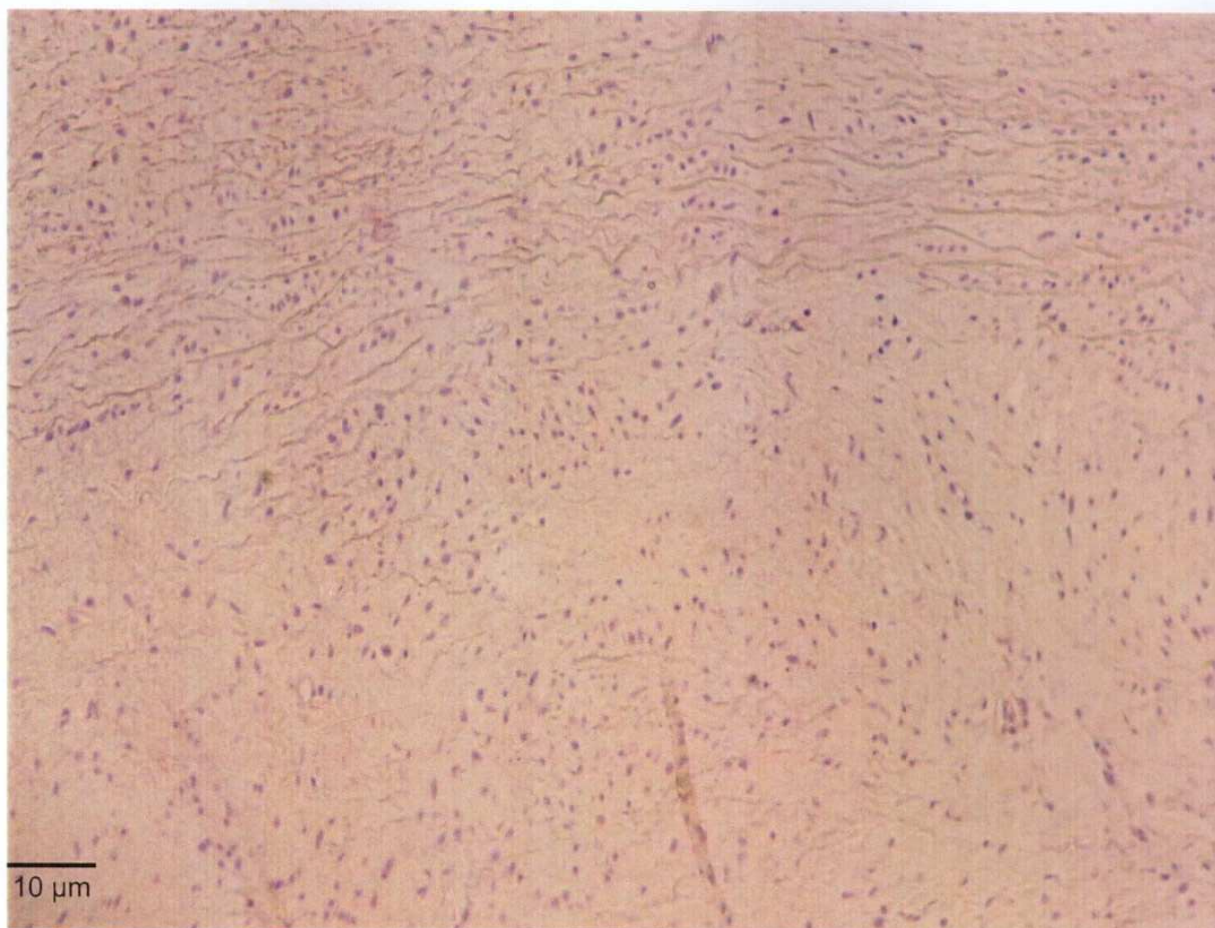


Figura 22 – Homoenxerto descelularizado explantado após 90 dias. Conduto com recelularização homogênea e abundante, ovelha 5 (HE, 100X).

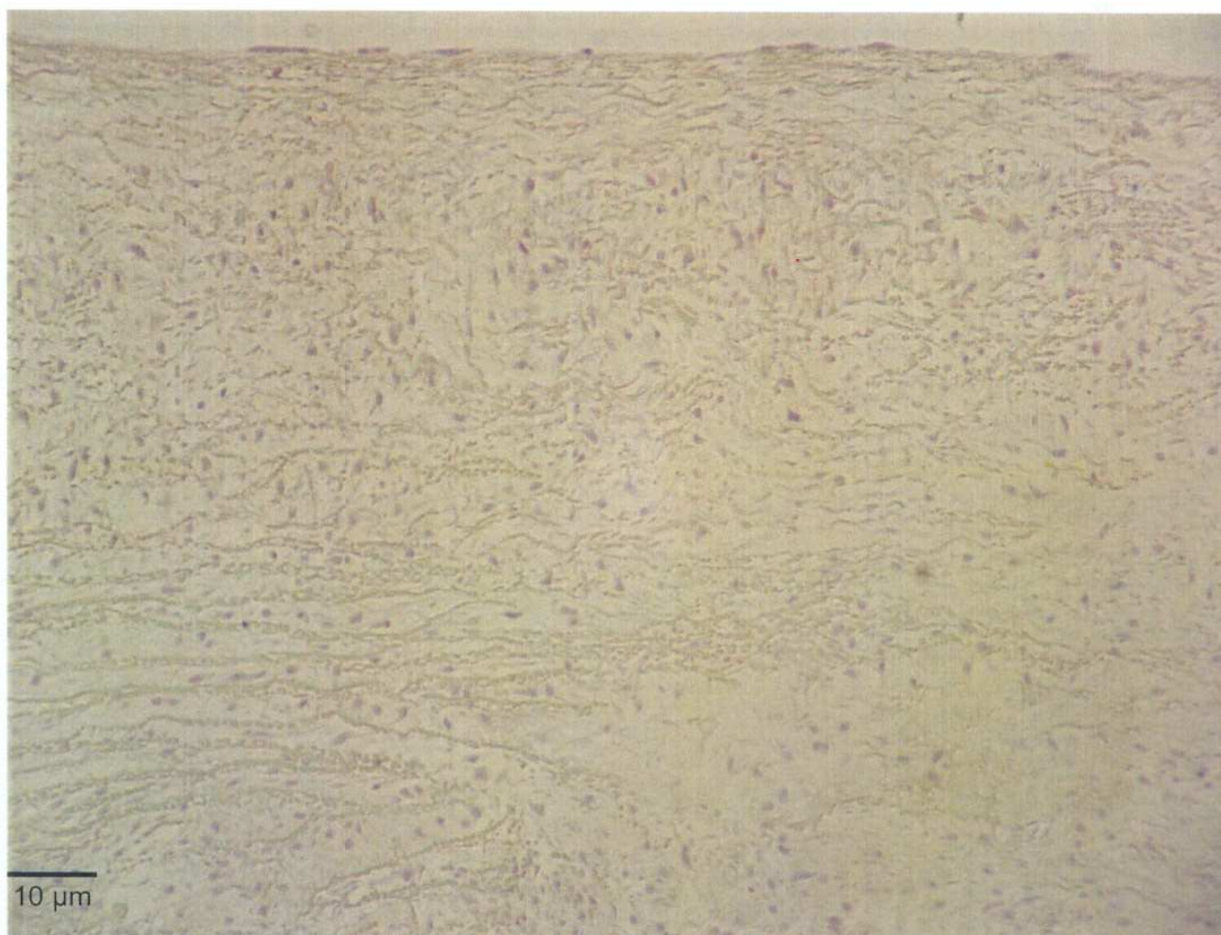


Figura 23 – Homoenxerto descelularizado explantado após 90 dias. Conduto com recelularização homogênea e abundante, ovelha 6 (HE, 100X).

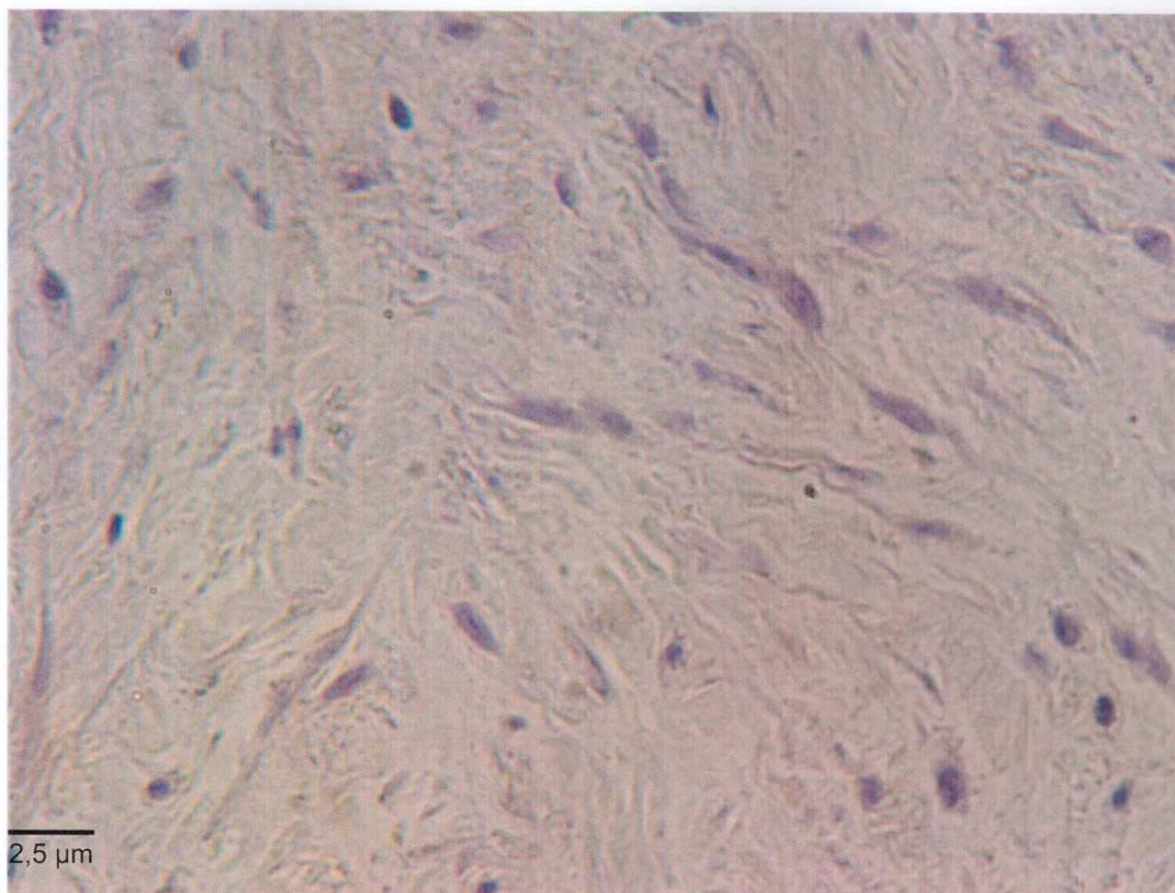


Figura 24 – Homoenxerto descelularizado explantado após 90 dias. Conduto com fibroblastos e miofibroblastos, ovelha 5 (HE, 400X).

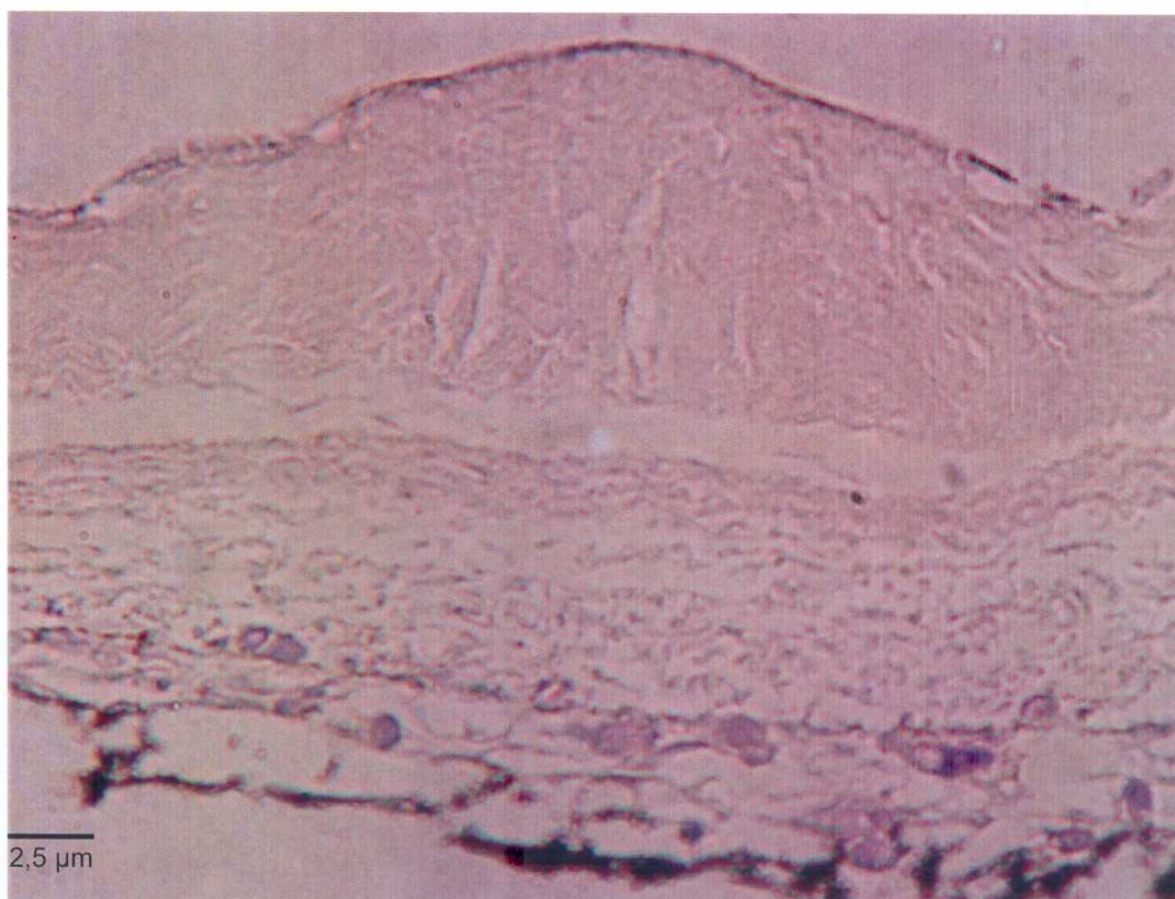


Figura 25 – Homoenxerto descelularizado explantado após 90 dias. Folheto com sua estrutura trilaminar preservada, pouco recelularizado, exceto na sua camada ventricularis, ovelha 5 (HE, 400X).

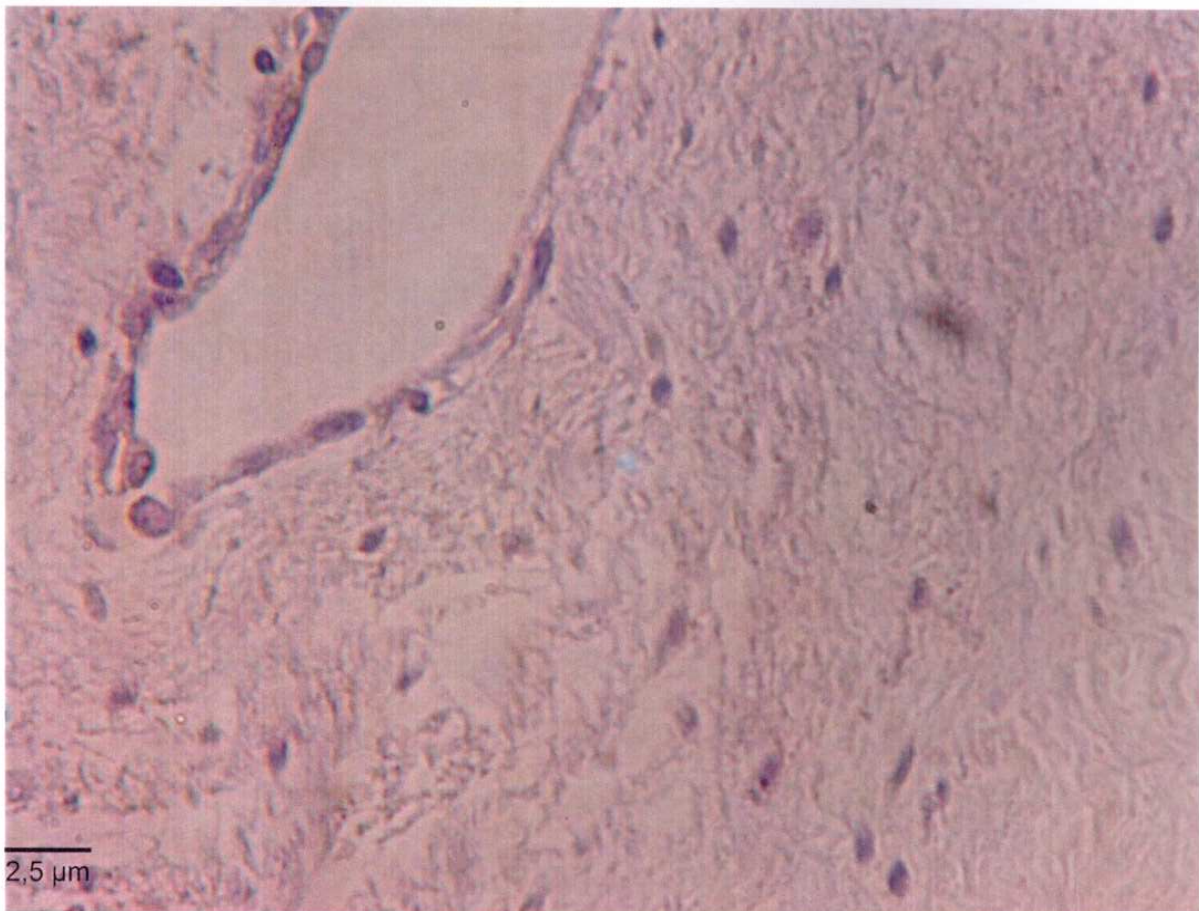


Figura 26 – Homoenxerto descelularizado explantado após 90 dias. Base da cúspide recelularizada e reendotelizada, ovelha 6 (HE, 400X).

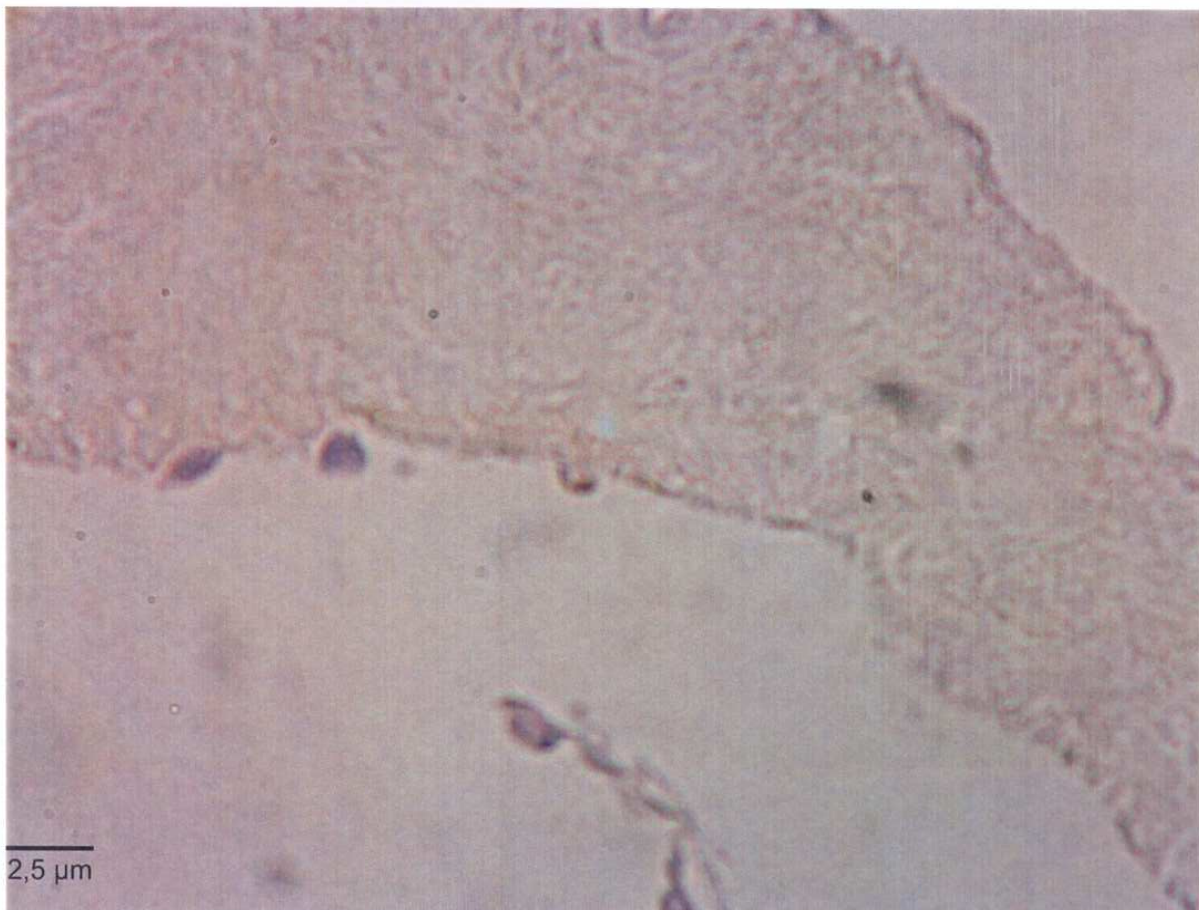


Figura 27 – Homoenxerto descelularizado explantado após 90 dias. Extremidade da cúspide pouco celular, apresentando apenas reendotelização, ovelha 6 (HE, 400X).

Explantos de 180 dias (Ovelhas 7 e 8)

Estes condutos apresentavam uma recelularização chegando até a camada íntima, bem semelhante a uma artéria nativa (Figura 28). Não encontramos nenhum neutrófilo, apenas raros mononucleares, afastando a presença de reação inflamatória. Havia grande quantidade de células muito semelhantes a fibroblastos, miofibroblastos e células musculares lisas, melhor organizadas, permitindo a diferenciação das camadas do conduto em adventícia, média e íntima (Figura 29). Havia muitos neovasos nas adventícias de ambos os condutos desse grupo.

Os folhetos também não apresentavam sinais de reação inflamatória e apresentavam uma recelularização significativa. Esta recelularização, orientada da base para a extremidade do folheto, atingia menos da metade da extensão do folheto na ovelha nº 7 e atingia mais da metade da extensão da cúspide, até quase sua extremidade, na ovelha nº 8 (Figura 30).

A reendotelização desses condutos e folhetos também foi completa.

Não havia sinais de trombose desses enxertos.

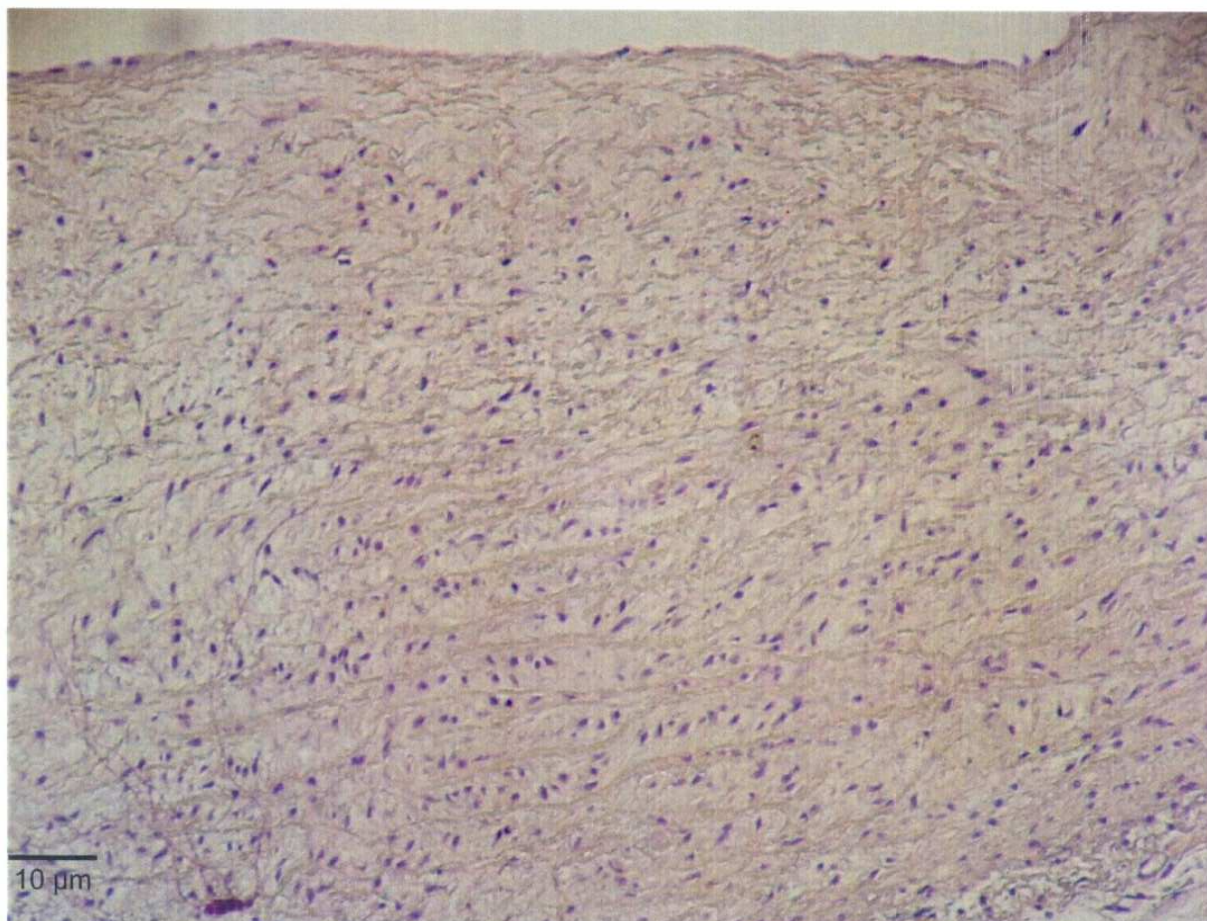


Figura 28 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Recelularização bem organizada, podendo-se perceber a diferenciação da camada média no conduto, ovelha 7 (HE, 100X).

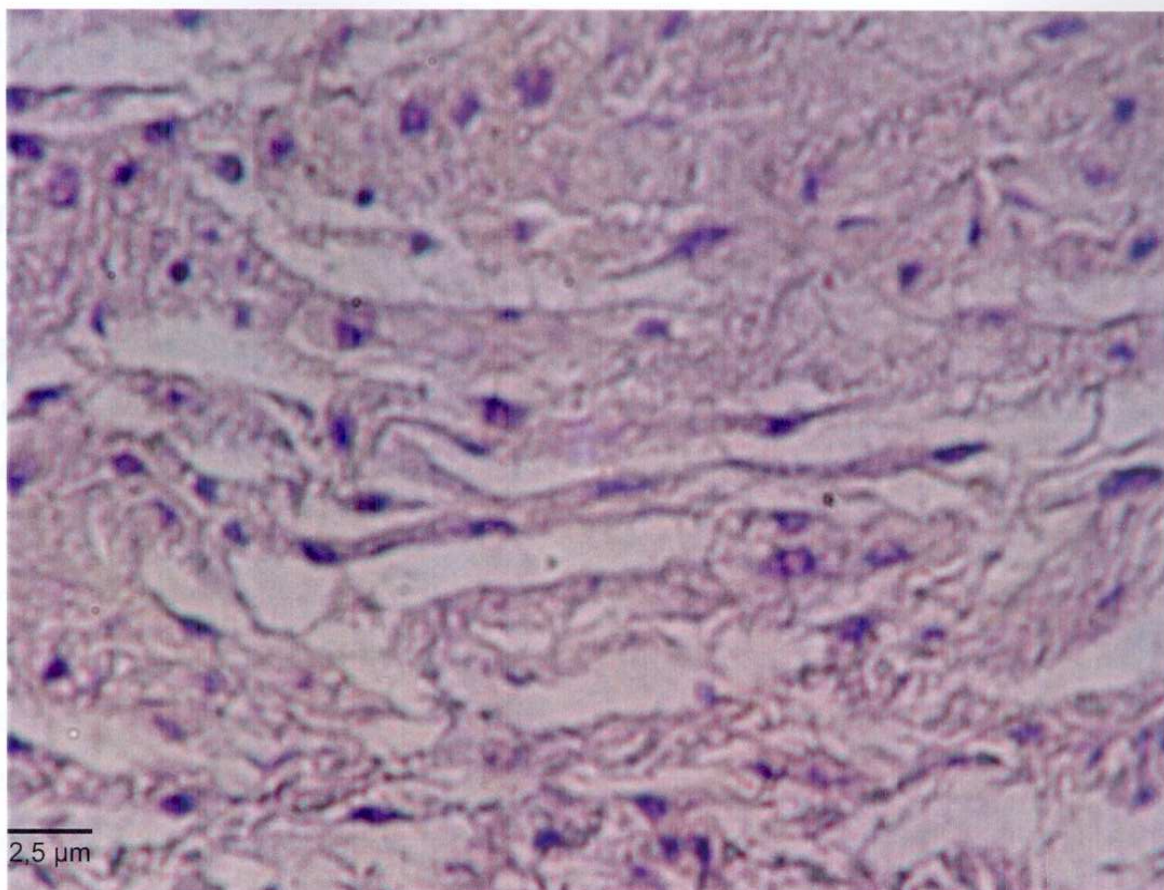


Figura 29 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Presença de células musculares delimitando a camada média, ovelha 7 (HE, 400X).



Figura 30 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Folheto já apresentando maior celularidade na sua extremidade, ovelha 8 (HE, 100X).

4.3.2 Pentacrômio de Movat

Em todos os condutos pode-se observar a organização normal e a integridade das fibras colágenas e fibras elásticas, independentemente do prazo de explante. Pela variante técnica de Silvermann-Movat, demonstrou-se a integridade das fibras colágenas e a distribuição normal dos glicosaminoglicanos (Figura 31). Pela técnica de Russell-Movat, a distribuição das fibras elásticas também era habitual, em maior concentração na camada média, estas sempre íntegras (Figuras 33 e 34).

A preservação da matriz extracelular também foi observada nos folhetos, também independentemente do prazo de explante. Pela coloração de Silvermann-Movat, identificou-se claramente a diferenciação das três camadas dos folhetos em todos os enxertos: camada fibrosa – com o predomínio das fibras colágenas (coradas em amarelo), camada espongiosa – com o predomínio de glicosaminoglicanos (coradas em verde/azulado) e camada ventricularis – mais celular (coradas em vermelho) (Figura 32). Pela variante técnica de Russell-Movat, também foi evidenciada a integridade das fibras elásticas nos folhetos, mesmo 180 dias após o implante (Figura 35).

A única exceção foi o folheto da ovelha número 4, que, em função da endocardite, apresentava total desorganização de sua estrutura trilaminar.



Figura 31 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Presença glicosaminoglicanos (azul-esverdeadas) e de fibras colágenos íntegras no conduto, ovelha 8 (Silvermann-Movat, 100X).

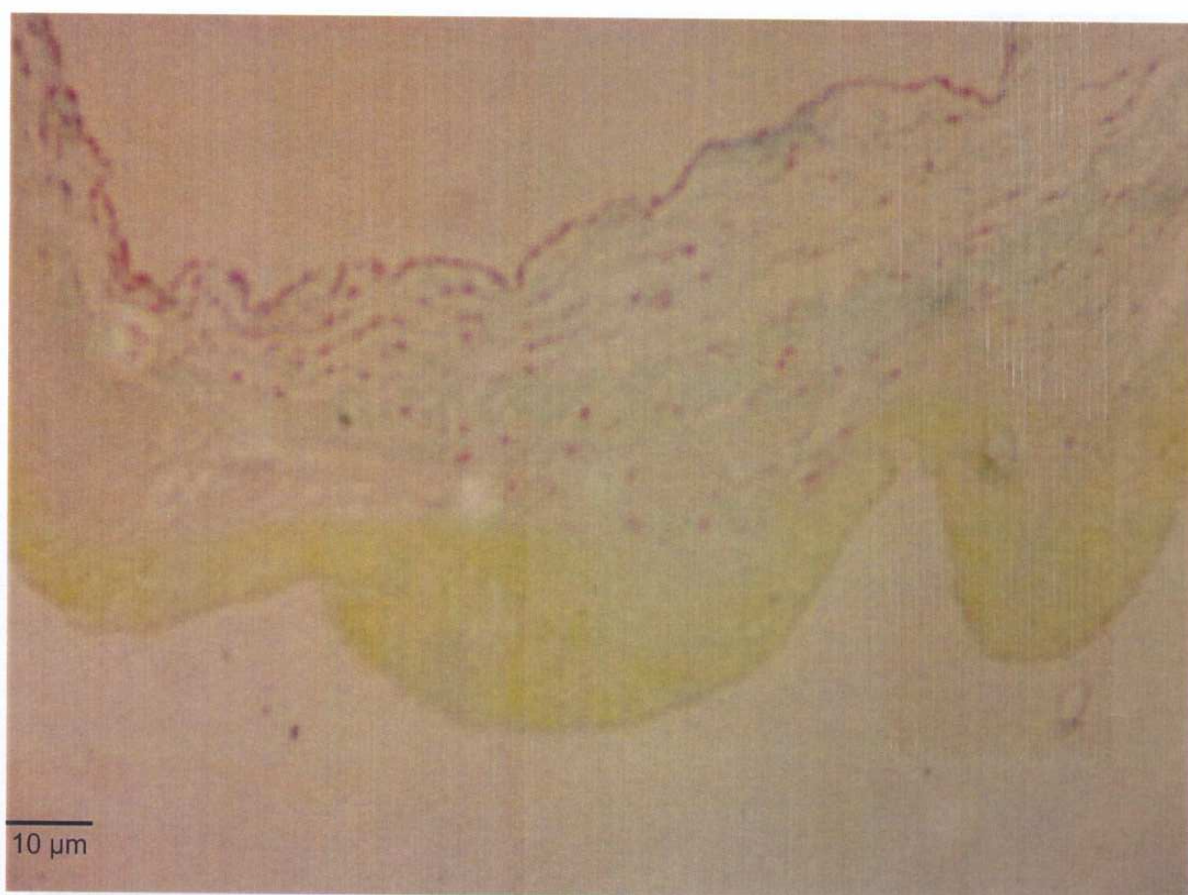


Figura 32 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Estrutura trilaminar do folheto preservada após 6 meses, ovelha 8 (Silvermann-Movat, 100X).

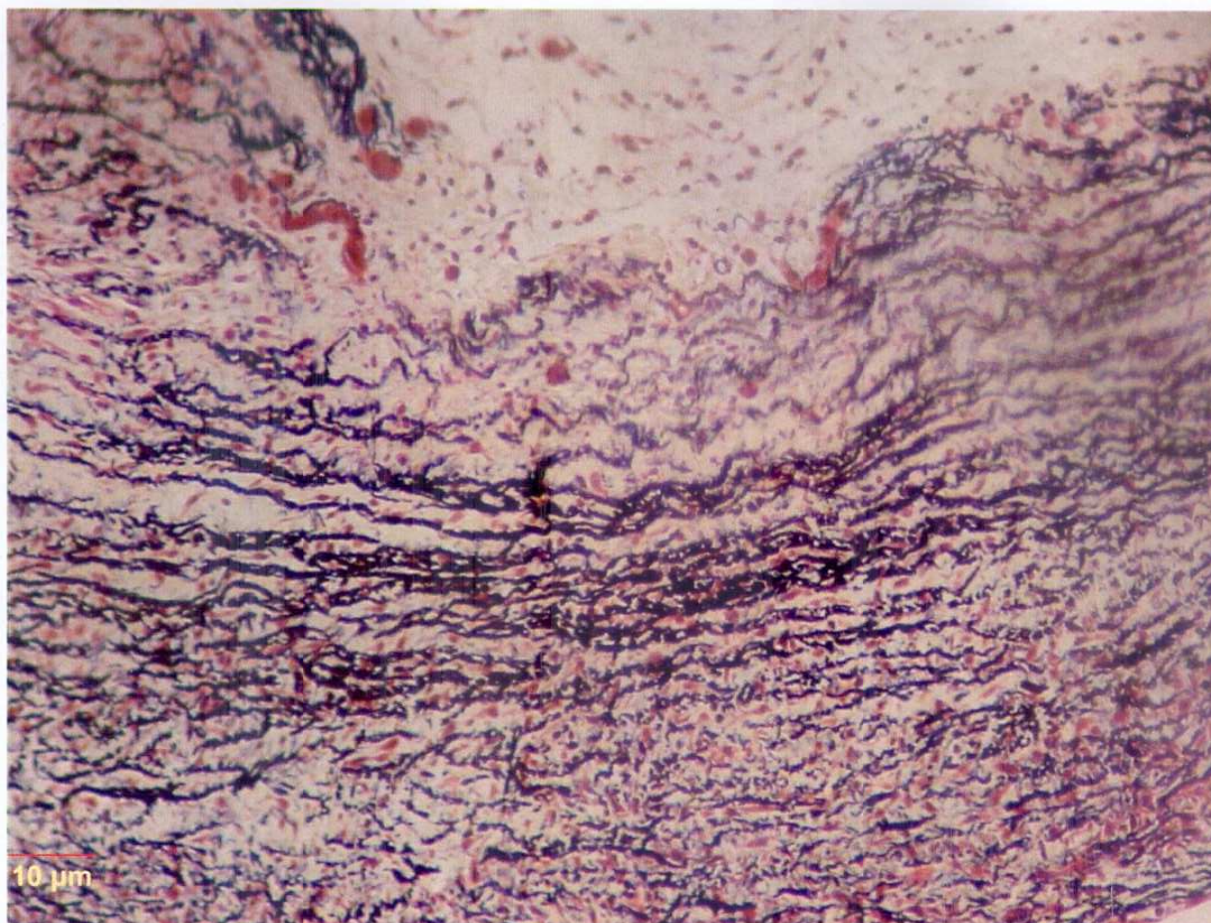


Figura 33 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Fibras elásticas íntegras no conduto, ovelha 8 (Russell-Movat, 100X).

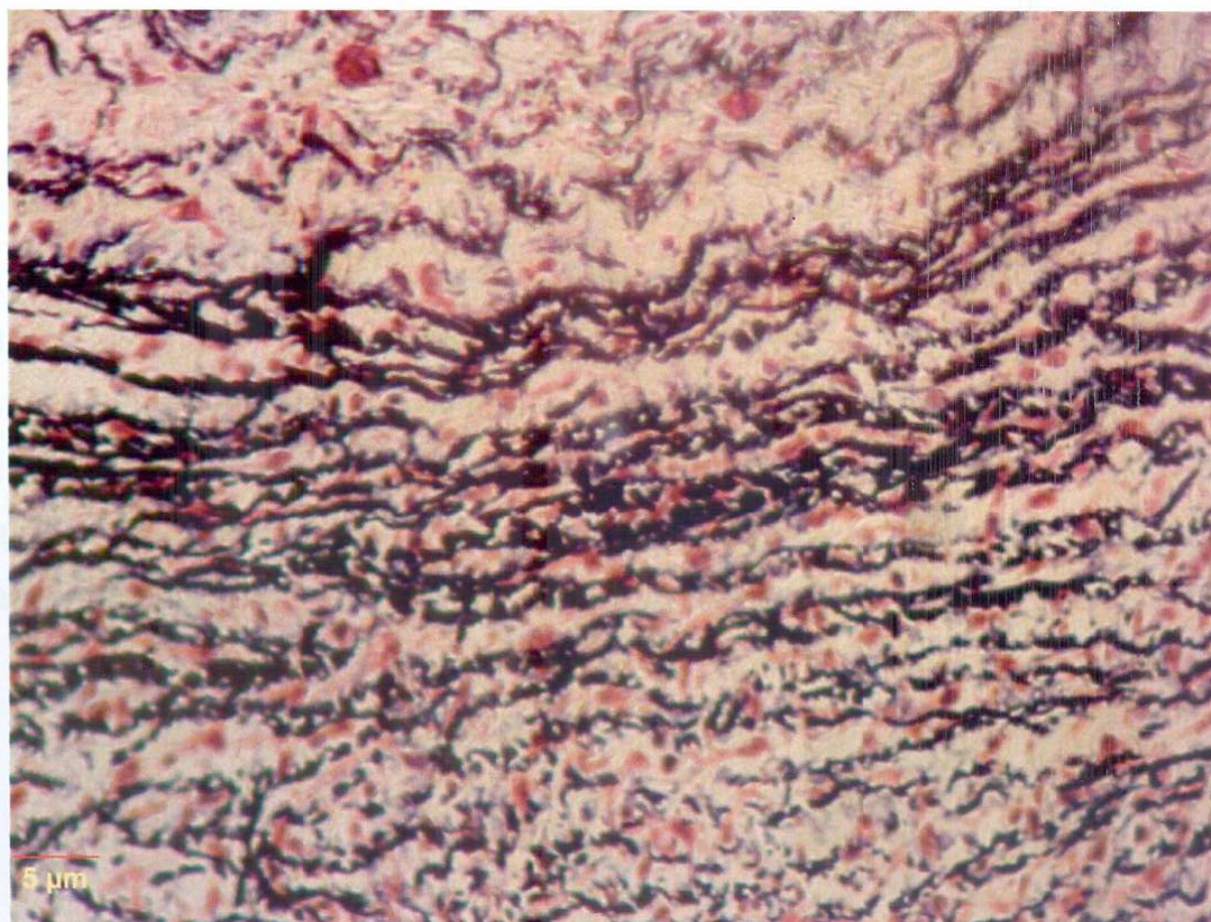


Figura 34 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Fibras elásticas íntegras no conduto, ovelha 8 (Russell-Movat, 200X).

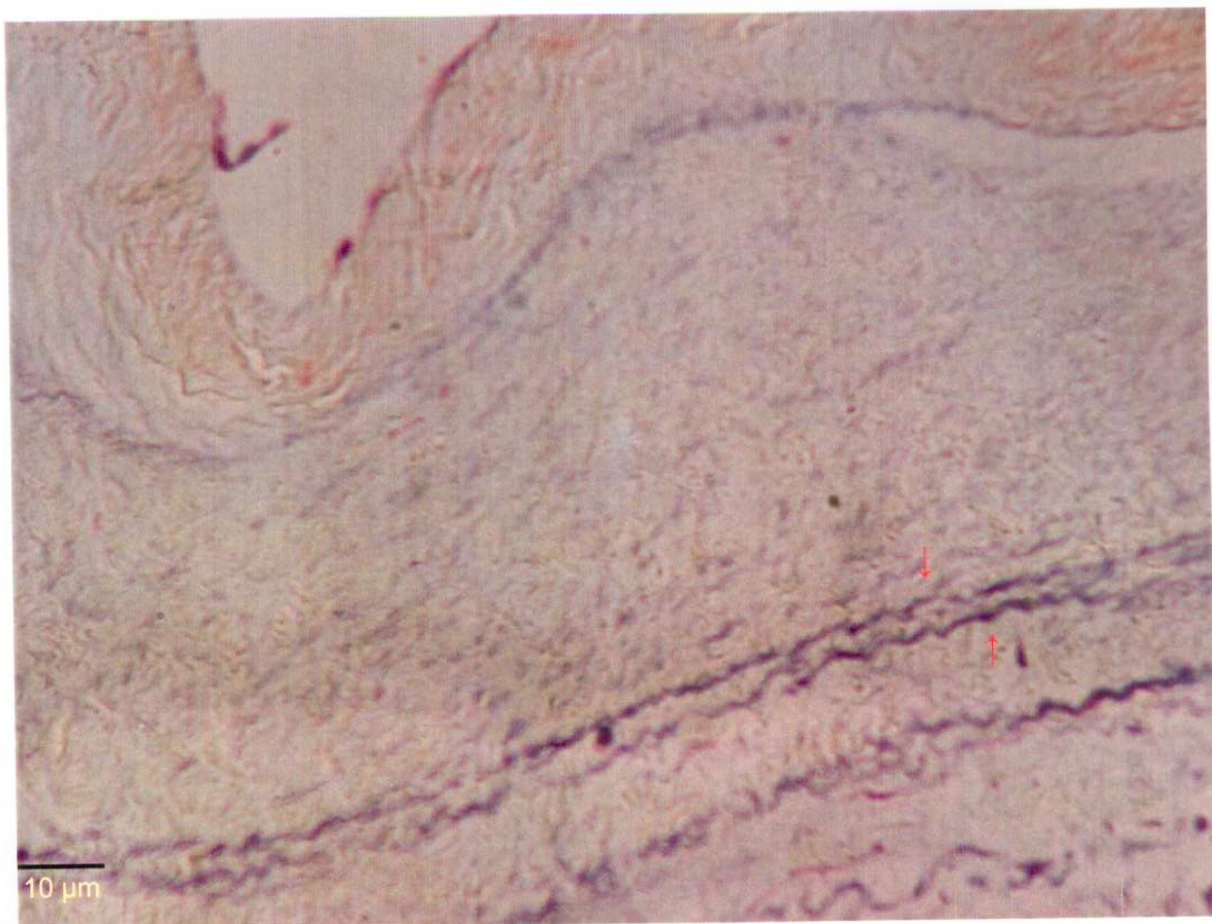


Figura 35 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Estrutura trilaminar do folheto preservada, com fibras elásticas íntegras (setas), ovelha 8 (Russell-Movat, 100X).

4.3.3 Alizarina Red 4.2 e 7.0

Estas colorações mostraram a presença de fosfato de cálcio (Alizarina Red pH 4.2) e oxalato de cálcio (Alizarina Red pH 7.0) em pequena quantidade na anastomose distal do homoenxerto da ovelha número 3 e nas anastomoses proximal e distal do homoenxerto da ovelha número 4, ambas explantadas com 30 dias, caracterizando discreta calcificação nestas anastomoses (Figura 38). Todos os demais condutos e todos os folhetos não apresentavam sinais de calcificação por ambas as colorações, mesmo após 180 dias. (Figuras 36 e 37).

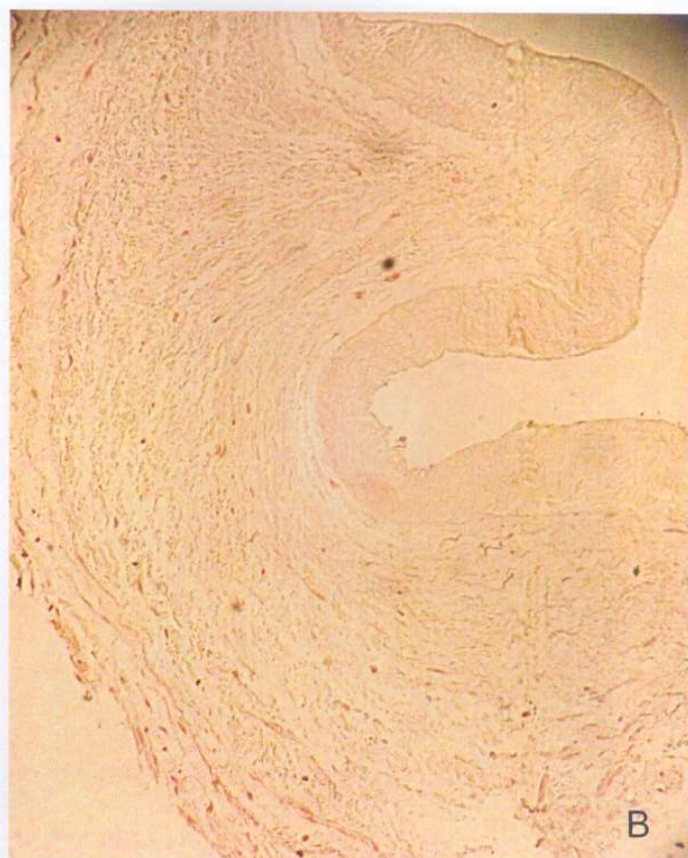
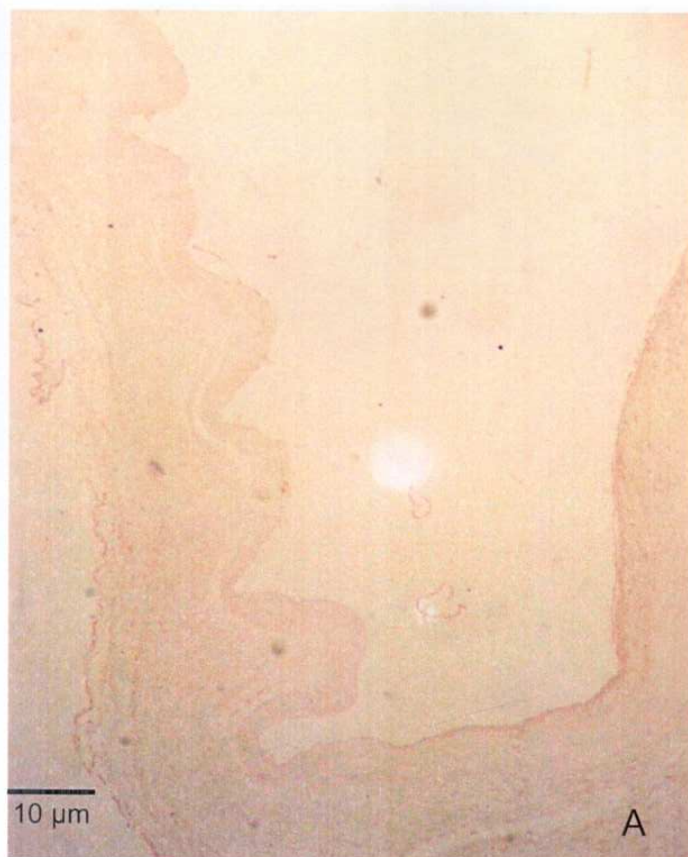


Figura 36 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias (ovelha 8). Observa-se que não houve calcificação do **conduto** (Fig. **A**), nem do **folheto** (Fig. **B**) (Alizarina Red pH 7.0 – 100X).

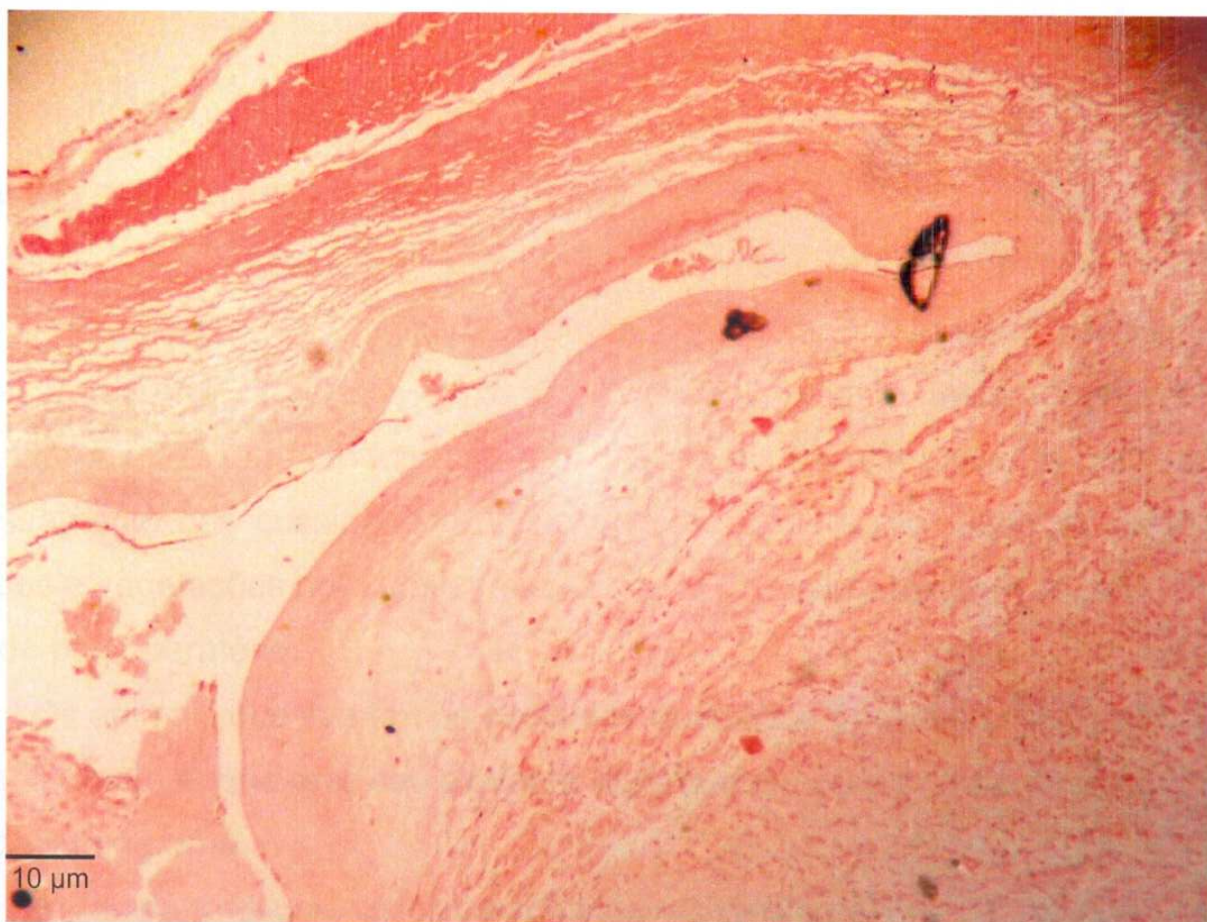


Figura 37 – Homoenxerto descelularizado explantado após 180 dias. Conduto e folheto sem calcificação, ovelha 8 (Alizarina Red pH 4.2 – 100X).

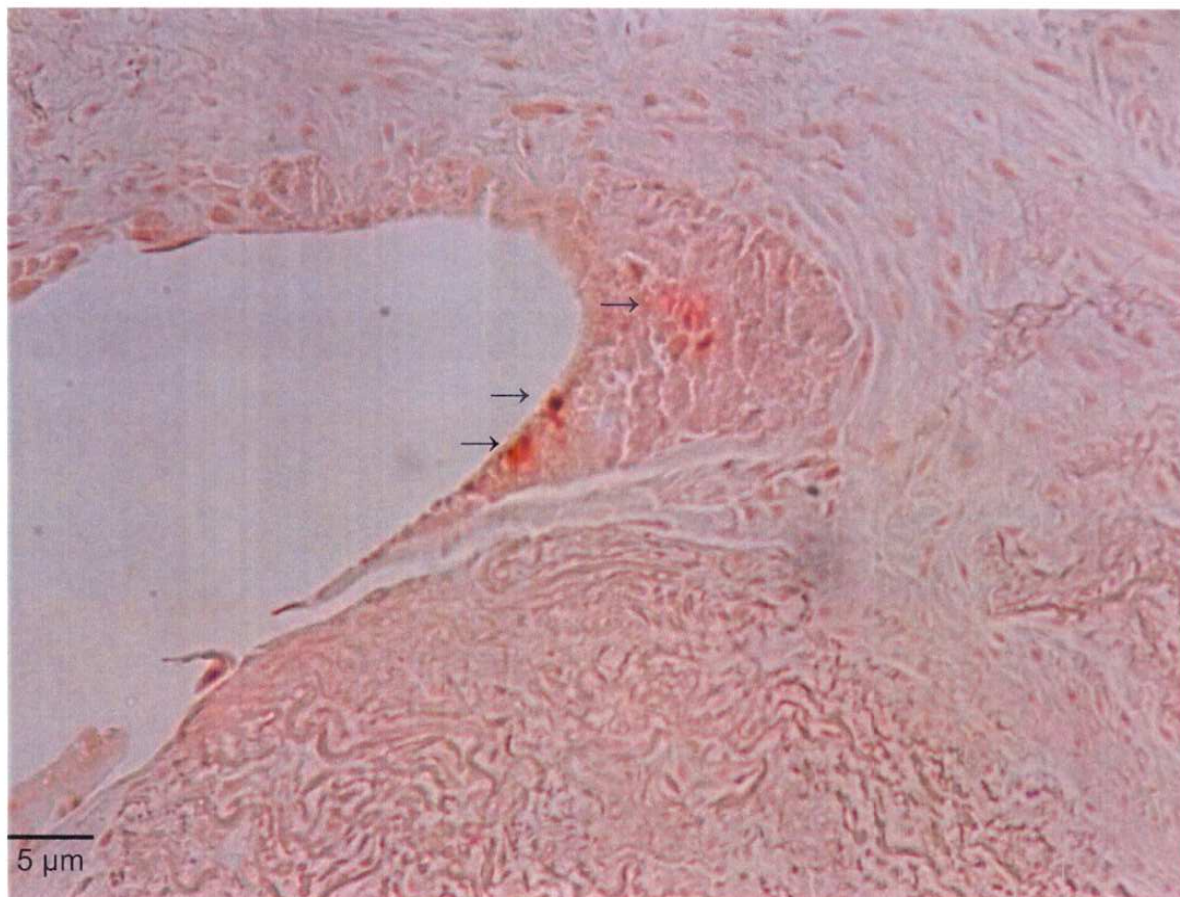


Figura 38 – Homoenxerto descelularizado explantado após 30 dias. Aspecto de calcificação ao redor do fio na anastomose (indicado pelas setas →), ovelha 4 (Alizarina Red pH 4,2 - 200X).

4.4 ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA

Foram realizados ecocardiogramas com estudo "*Doppler*" periódicos para avaliação da velocidade de fluxo transvalvar, gradiente instantâneo máximo e gradiente médio. Também foram analisadas a competência valvar, a mobilidade e o espessamento das cúspides, a função do ventrículo direito, além da presença de trombos e vegetações no homoenxerto. Eles foram realizados com 15, 45, 100 e 170 dias de pós-operatório.

Os animais que tiveram os explantes realizados após sete dias, assim como a ovelha número 4, que teve seu explante realizado em 30 dias, não foram submetidas ao ecocardiograma.

A Tabela 4 resume todos os achados ecocardiográficos.

TABELA 4 – Resumo dos achados ecocardiográficos

Ovelha	Dias de P.O.	Grad Max (mmHg)	Grad Med (mmHg)	Vel Flx (m/s)	Mobil. Valvar	Espess. Cúsp.	Insuf Pulm	Função VD	Calcific.	Veget.	Trombos
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	14	2,9	2,0	0,86	Normal	0	0	Normal	0	0	0
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	16	3,2	2,2	0,90	Normal	discreto	0	Normal	0	0	0
	43	5,7	2,9	1,20	Normal	0	0	Normal	0	0	0
6	16	9,6	5,2	1,55	Normal	discreto	0	Normal	0	0	0
	43	8,1	4,2	1,43	Normal	0	0	Normal	0	0	0
7	7	10,1	6,3	1,59	Normal	0	0	Normal	0	0	0
	99	8,4	5,4	1,45	Normal	0	mínima	Normal	0	0	0
	167	7,0	4,3	1,33	Normal	0	mínima	Normal	0	0	0
8	14	3,0	2,0	0,60	Normal	0	0	Normal	0	0	0
	106	6,2	4,3	1,25	Normal	0	mínima	Normal	0	0	0
	174	4,6	2,8	1,08	Normal	0	mínima	Normal	0	0	0

P.O. – pós-operatório / **Grad Max (mmHg)** – Gradiente máximo em milímetros de mercúrio / **Grad Méd (mmHg)** – Gradiente médio em milímetros de mercúrio / **Vel Flx (m/s)** – Velocidade de fluxo em metros por segundo / **Mobil.** – Mobilidade / **Espess. Cúsp** – Espessamento das cúspides / **Insuf Pulm** – Insuficiência pulmonar / **VD** – Ventrículo direito / **Calcif** – Calcificação / **Veget.** – Vegetações.

Os gradientes máximos e médios e as velocidades de fluxo ficaram em valores baixos, próximos ao normal, e não progrediram com o tempo.

A mobilidade das cúspides permaneceu normal em todos os exames ao longo do seguimento, sem haver um espessamento maior que discreto.

A função valvar era normal em todos os exames. As ovelhas 7 e 8 apresentaram insuficiência valvar mínima nos ecocardiogramas de 100 e 170 dias.

Em todos os exames a função de ventrículo direito foi normal. Não foram observados sinais ecocardiográficos de trombos, vegetações e calcificação.

Entre as ovelhas que tiveram seus explantes realizados com 90 dias, não houve diferença, ao estudo “*Doppler*”, dos gradientes máximos e médios e da velocidade de fluxo entre os exames realizados nos intervalos de 15 e 45 dias (vide Tabela 5-A).

O mesmo pôde ser observado entre as ovelhas do grupo de 180 dias, não havendo progressão dos gradientes e das velocidades de fluxo nos exames realizados com 15 dias, 100 dias e 170 dias de pós-operatório (vide Tabela 5-B).

Com relação aos diâmetros valvares, estes não foram mensurados em todos ecocardiogramas, não permitindo a tabulação e comparação dos dados.

TABELA 5 – Parâmetros médios ao estudo “*doppler*” nos ecocardiogramas dos grupos de explante com 90 dias (A) e 180 dias (B)

A – Explantes 90 dias

Prazo (dias)	Grad Max (mmHg)	Grad Med (mmHg)	Vel flx (m/s)
15	6,42	3,69	1,22
45	6,97	3,52	1,31

B – Explantes 180 dias

Prazo (dias)	Grad Max (mmHg)	Grad Med (mmHg)	Vel flx (m/s)
15	6,6	4,22	1,09
100	7,33	4,84	1,35
170	5,87	3,53	1,20

Grad Max: Gradiente Máximo; **Grad Med:** Gradiente Médio;
Vel Flx: velocidade de fluxo; **mmHg:** milímetros de mercúrio;
m/s: metros/segundo

5. DISCUSSÃO

Segundo Dohmen *et al.*, o substituto valvar ideal deve permitir a viabilidade celular, mantendo o potencial de regeneração celular e da matriz extracelular, evitando o processo de degeneração estrutural e tendo um potencial de crescimento.⁵⁴ Atualmente, apenas o autoenxerto pulmonar tem estas características.⁶⁶

O homoenxerto criopreservado, o mais frequentemente utilizado, apresenta fibroblastos e células endoteliais do doador viáveis. Justamente pelo fato de estas células serem viáveis é que desencadeiam uma resposta imunológica no receptor, ao expressarem antígenos de superfície HLA classe I e II. Esta resposta imunológica comprovadamente tem um papel importante na degeneração deste homoenxerto, afetando sua durabilidade. Desta forma, o homoenxerto criopreservado não possui a qualidade de regeneração nem de crescimento.^{14, 31, 36, 38, 40, 44}

Na busca de se melhorar o desempenho dos homoenxertos, Schilling *et al.* propuseram o método de descelularização para minimizar a resposta imunológica após o implante dos mesmos.⁴⁶ Ainda em desenvolvimento, não há consenso entre os diferentes métodos de descelularização, nem quanto ao uso de matrizes homólogas ou heterólogas, nem quanto ao benefício da semeadura destes enxertos com células cultivadas em laboratório.

No presente estudo, preferimos a utilização de uma matriz homóloga devido a resultados desfavoráveis de matrizes heterólogas, publicadas por Simon *et al.*⁶¹, e também porque a matriz heteróloga pode ser antigênica⁶² e transmitir retrovírus para seres humanos.⁶³

Antes da utilização clínica de qualquer substituto valvar, são necessárias extensas avaliações "*in vitro*" e "*in vivo*". Estudos prévios realizados por Elkins *et al.* compararam, em laboratório, o desempenho biomecânico e hidrodinâmico de homoenxertos pulmonares descelularizados ovinos e humanos com homoenxertos pulmonares criopreservados convencionais ovinos e humanos. Esses autores não evidenciaram diferenças no desempenho biomecânico e hidrodinâmico dos diferentes enxertos, tanto em níveis pressóricos pulmonares como em níveis pressóricos suprassistêmicos (180 mmHg).⁵²

O modelo experimental em ovinos jovens é comumente utilizado para teste de substitutos valvares, visto que a fisiopatologia da degeneração e calcificação é semelhante à dos seres humanos, porém em escala mais acelerada.⁶⁷ Este modelo

outros modelos animais, sendo facilmente reprodutível.⁶⁸ É importante ressaltarmos que a avaliação de novos substitutos valvares em modelos experimentais em ovinos é um estudo pré-clínico obrigatório, segundo o “*US Food and Drug Administration Replacement Heart Valve Guidance*”.⁶⁹

Os achados histológicos do presente estudo evidenciaram que os enxertos explantados após sete dias já apresentavam um infiltrado inflamatório pequeno, constituído basicamente por polimorfonucleares, localizado principalmente na adventícia e próximo às anastomoses. Este padrão celular e de migração celular é condizente com o descrito por Elkins *et al.*, em 2001. Neste estudo experimental em ovinos, o qual testa homoenxertos descelularizados pelo processo *Synergraft*[®], descreve-se que este infiltrado inflamatório inicial e transitório não resulta em degeneração do enxerto e é importante para a quimiotaxia de demais células, preparando o enxerto para o repovoamento celular.¹³

Comprovando o caráter transitório deste infiltrado inflamatório agudo, os enxertos explantados após 30 dias apresentavam um menor número de neutrófilos; estes deram lugar a células mais maduras, mais especificamente células com morfologia muito sugestiva de histiócitos, fibroblastos e miofibroblastos. Já com 30 dias, o repovoamento celular atingiu a camada média do conduto e pode-se evidenciar muitos neovasos na adventícia dos enxertos. Este comportamento é o oposto ao observado em homoenxertos criopreservados ou a fresco, que neste período de 30 dias apresentam diminuição da celularidade mesenquimal e manutenção do infiltrado inflamatório.⁷⁰

Os enxertos explantados após 90 dias exibiam uma recelularização abundante e homogênea, chegando até a camada íntima do conduto. A ausência de neutrófilos e a presença de poucos monócitos indicam que não havia atividade inflamatória persistente, corroborando o conceito de que o enxerto é imunologicamente inerte. Após este intervalo, as células predominantes apresentavam características morfológicas de fibroblastos e miofibroblastos, progressivamente organizados, permitindo-nos identificar uma camada médio-íntima e uma camada adventícia, esta última com muitos neovasos.

Enquanto os folhetos valvares dos enxertos explantados com sete e 30 dias eram praticamente acelulares, após 90 dias pudemos evidenciar o início da recelularização da camada ventricularis dos folhetos, progredindo da base para a extremidade da cúspide. Estes achados são muito similares ao de outro trabalho

publicado por Elkins *et al.*, que demonstraram substancial recelularização do conduto e uma recelularização inicial da camada ventricularis dos folhetos valvares.⁵²

Após 180 dias, os enxertos apresentavam uma recelularização completa e organizada, semelhantemente a um conduto valvado nativo. Não havia atividade inflamatória, pois não encontramos neutrófilos, apenas raros monócitos. Havia um claro predomínio de células maduras, permitindo a diferenciação das três camadas do conduto: adventícia, média e íntima. Na adventícia, observamos muitos neovasos, e na camada média, células com características de células musculares lisas. Enquanto a recelularização do folheto de uma das ovelhas (nº 7) atingia menos da metade da sua extensão, na outra ovelha (nº 8) atingia mais da metade da extensão da cúspide, até quase sua extremidade. Estes achados também são semelhantes aos descritos por Elkins *et al.* (2001).⁵² Dohmen *et al.*, num estudo experimental em ovinos que receberam heteroenxertos descelularizados com ácido deoxicólico, também descrevem que, mesmo após seis meses, a recelularização do folheto não havia atingido sua extremidade.⁵⁴ Hopkins *et al.*, em 2009, também em um modelo experimental em ovinos, evidenciaram a recelularização apenas da base do folheto mesmo após um ano de seguimento. Estes autores caracterizaram esta recelularização por imuno-histoquímica, identificando o fenótipo destas células como miofibroblastos, inclusive com a expressão de alfa-actina para músculo liso e proteína HS 47. No presente estudo, esta recelularização incompleta do folheto não comprometeu a competência valvar, porém poderia limitar sua função e sua durabilidade em prazos maiores, que presumidamente dependem da atividade celular intersticial para sintetizar as proteínas estruturais para o remodelamento construtivo e adaptativo da matriz extracelular.⁶⁹

Referente à reendotelização, os enxertos explantados após sete e 30 dias apresentavam, respectivamente, raras e poucas células endoteliais no conduto, e nenhuma célula endotelial nos folhetos de ambos os grupos. Além de pouco numerosas, esparsas e frouxamente aderidas à membrana basal, estas células endoteliais são facilmente descamadas na preparação da lâmina e manipulação do enxerto, dificultando sua visualização. Após 30 dias, encontramos poucas células endoteliais no conduto, diferentemente de Numata *et al.*, que encontraram uma reendotelização mais avançada no mesmo período, inclusive das cúspides valvares. Deve-se ressaltar que esses autores empregaram um modelo experimental no qual suínos receberam homoenxertos descelularizados.⁷¹ Porém, mesmo estudos que

utilizaram a semeadura "*in vitro*" com células endoteliais de homoenxertos descelularizados, não puderam comprovar a reendotelização da extremidade do folheto.⁵³

Após 90 e 180 dias, pudemos observar uma reendotelização completa do condutos e em mais de dois terços dos folhetos. Estes resultados foram semelhantes ao grupo controle (não-semeado com células endoteliais e miofibroblastos) de três meses do estudo experimental de Steinhoff *et al.* Porém, esse mesmo autor obteve uma reendotelização mais precoce – após 30 dias – no grupo de estudo (semeado com células endoteliais e miofibroblastos). A presença de uma camada confluyente de células endoteliais é fundamental na preservação da matriz subendotelial e na prevenção de trombose, decorrente da exposição do colágeno da membrana basal após a descelularização.⁵³ Este pode ser mais um argumento a favor da semeadura de células endoteliais cultivadas em laboratório previamente ao implante. Por outro lado, em nosso estudo, não tivemos evidências de trombose em nenhum dos enxertos, nem de hiperplasia intimal, podendo sugerir a presença de um endotélio que pode ter se desprendido com a preparação das lâminas para a histologia. Ainda com resultados controversos, a prévia semeadura e a restituição celular "*in vitro*" ainda exigem técnicas mais eficazes a serem comprovadas por futuros estudos.

À exceção da ovelha 4, que apresentou um quadro de endocardite infecciosa, todos os demais animais apresentaram boa evolução clínica. Aqueles que foram submetidos ao explante em prazos maiores, 90 e 180 dias, tiveram significativos ganhos ponderais. Acompanhando estes ganhos ponderais, os homoenxertos valvares descelularizados apresentaram aumento no seu diâmetro de 15,7% em 90 dias e de até 38,2% em 180 dias. Porém, não podemos afirmar se este crescimento foi proporcional ao esperado de um animal normal, pela falta de um grupo controle. Em um estudo experimental em ovinos, da mesma linha de pesquisa e com metodologia semelhante ao do presente estudo, Lopes *et al.* compararam o comportamento biológico de heteroenxertos descelularizados por ácido deoxicólico (a 1%) com homoenxertos criopreservados. Assim como em nosso estudo, os autores citados evidenciaram que os heteroenxertos descelularizados apresentaram um significativo aumento nos seus diâmetros valvares após 280 dias de seguimento, ao contrário dos homoenxertos criopreservados convencionais, que não apresentaram aumento no seu diâmetro.⁷² Cebotari *et al.* reconstruíram a VSVD de

crianças com homoenxertos descelularizados com tripsina e EDTA e semeados “*in vitro*” com células endoteliais autólogas, e também demonstraram o aumento no diâmetro desses enxertos após três anos de seguimento, com a manutenção da competência valvar e gradientes baixos, sugerindo a remodelação e o crescimento.⁷³

Devemos salientar que a ocorrência deste caso de endocardite citado anteriormente é esperada em 10 a 15% dos casos de cirurgias cardiovasculares experimentais em ovinos, visto que estes animais estão sob constante estímulo imunológico, pois normalmente apresentam uma grande quantidade de bactérias no aparelho digestivo e no sangue.⁶⁹

Uma questão importante é se esse aumento no diâmetro foi por crescimento ou dilatação patológica, decorrente de falha estrutural. Alguns argumentos suportam a hipótese de crescimento, incluindo:

1. A análise macroscópica dos enxertos não evidenciou sinais de adelgaçamento da parede do conduto, havendo coaptação normal das cúspides.
2. Ainda, os diâmetros valvares acompanharam os ganhos ponderais dos animais de uma forma aparentemente linear.
3. O ecocardiograma não revelou insuficiência valvar significativa.
4. A análise microscópica demonstrou uma recelularização ordenada. Observamos, também, a integridade das fibras colágenas e elásticas e a sua organização normal. Estes achados não estariam presentes caso houvesse falha estrutural e dilatação patológica.

Permanece a questão se esses resultados se manteriam a longo prazo, mas, para tal, são necessários novos estudos com períodos de seguimento maiores.

Pelas colorações de Silvermann-Movat e Russell-Movat, pudemos comprovar a integridade das fibras colágenas e elásticas, respectivamente, em todos os enxertos. Isto nos sugere que o método de descelularização empregado não comprometeu a estrutura da matriz extracelular, o que foi mantido em todo o período observacional, mesmo naqueles enxertos que aumentaram de diâmetro, dando suporte à hipótese de regeneração da matriz extracelular e crescimento. Outro estudo experimental em ovinos, realizado pelo presente grupo de pesquisa, comparando homoenxertos criopreservados com heteroenxertos descelularizados explantados após 150 dias, demonstrou que os homoenxertos criopreservados apresentavam-se acelulares e com processo de hialinização e degeneração da matriz extracelular.⁶⁰

O presente estudo não inclui uma análise completa de todos os tipos de moléculas da matriz extracelular e glicosaminoglicanos normalmente presentes, mas traz fortes indícios da preservação desta matriz. Não apenas a síntese da matriz extracelular é importante, mas também a reabsorção desta é fundamental para a reorganização do tecido. Esta reabsorção poderia ser provada pela comprovação da liberação de metaloproteinases, abrindo um campo para novas questões a serem respondidas.⁵⁵ A reorganização ativa dos tecidos é importante para a durabilidade a longo prazo e também para o crescimento desses condutos valvados, sendo este um dos principais objetivos da engenharia de tecidos, extendendo sua aplicabilidade na cirurgia pediátrica.⁵³

Assim como Steinhoff *et al.*, não observamos calcificação significativa nem no conduto, nem nas cúspides valvares. Estes autores, porém, descrevem calcificações nos tecidos musculares subvalvares, junto à anastomose proximal de todos os enxertos, já com três meses de pós-operatório. É comum observarmos calcificações nas anastomoses vasculares, mas estes achados podem ser decorrentes de uma descelularização incompleta ou por algum grau de comprometimento estrutural decorrente do processo, uma vez que os autores supracitados utilizaram uma enzima (tripsina) como agente descelularizante, já citada por Dohmen *et al.* como sendo um método inferior por alterar a matriz colágena.^{53, 54} Como não observamos calcificação dos enxertos em 180 dias (26 semanas), provavelmente ela não mais ocorrerá. Corroborando esta hipótese, Hopkins *et al.*, em 2009, sugeriram que o modelo experimental de 52 semanas não é superior ao de 20 semanas para avaliação do quesito calcificação. Segundo o manuscrito desses autores, os homoenxertos descelularizados mantêm as qualidades tradicionais dos homoenxertos convencionais – “*como perfil hemodinâmico e excelentes propriedades tissulares*” – e com a vantagem adicional de retardar ou eliminar o marcador essencial da deterioração: a calcificação.⁶⁹

Apesar de ser um método subjetivo e observador-dependente, o ecocardiograma é citado por outros autores como um método não invasivo sensível e confiável para avaliarmos a função de homoenxertos valvares em humanos.^{74, 75} Este exame complementar vem sendo utilizado pelo presente grupo de pesquisa para avaliação de enxertos cardiovasculares, valvados ou não. O ecocardiograma também tem sido utilizados por outros autores, extrapolando-se sua eficácia para estudos experimentais em ovinos.^{52, 54}

Os ecocardiogramas com estudo “*Doppler*” seriados evidenciaram velocidades de fluxo e gradientes transvalvares baixos e que não aumentaram nos exames seriados. A preservação da mobilidade das cúspides e da função valvar a médio prazo corroboram a hipótese de viabilidade dos homoenxertos descelularizados.

Podemos inferir que a integridade da matriz extracelular desses homoenxertos descelularizados foi fundamental para o seu bom desempenho, e sua imunogenicidade nula ou mínima, evitou a manutenção de uma resposta inflamatória imunomediada deletéria, e permitiu a recelularização e a reendotelização adequadas, evitando a calcificação.

Esta estabilidade biomecânica obtida nestes homoenxertos após o processo de descelularização é um ponto crítico para sua segurança cirúrgica e função primária. A perda de estabilidade tecidual que pode acompanhar o processo de descelularização não foi significativa no presente estudo, que usou tecidos de parede delgada, sob a pressão pulmonar e em posição ortotópica. O uso em posição aórtica ou heterotópica pode ser mais crítico, exigindo novos estudos nestas condições.

A função valvar a longo prazo, a reorganização tissular e as funções celulares devem ser analisadas a longo prazo, com tempo de observação maior que um ano e com um maior número de animais, para que realmente possamos comprovar a viabilidade e o crescimento desses homoenxertos descelularizados.

6. CONCLUSÕES

1. Os homoenxertos ovinos descelularizados foram progressivamente repovoados por células do receptor. Este repovoamento foi organizado e funcional.
2. Os homoenxertos descelularizados não apresentaram calcificação.
3. Os ecocardiogramas seriados evidenciaram a manutenção da função valvar após 180 dias, com gradientes baixos e insuficiência valvar mínima.
4. Houve um aumento no diâmetro destes enxertos, acompanhando proporcionalmente o crescimento do animal.

7. REFERÊNCIAS

-
- 1 Gus I, Zaslavsky C, Seger JM, Machado RS. Epidemiologia da febre reumática, Estudo Local. *Arq Bras Cardiol*. 1995; 65(4): 321-5.
 - 2 Rahimtoola SH. Lessons learned about the determinants of the results of valve surgery. *Circulation* 1988; 78(6): 1503-7.
 - 3 Costa JNL, Pomerantzeff PMA, Braile DM, Ramirez VA, Goissis G, Stolf NAG. Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2005; 20(1): 14-22.
 - 4 Peterseim DS, Cen Y, Cheruvu S, Landolfo K, Bashore TM, Lowe JE, Wolfe WG, Glower DD. Long-term outcome after biologic versus mechanical valve replacement in 841 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 117(5): 890-7.
 - 5 Ross DN. Homograft replacement of the aortic valve. *The Lancet* 1962; 8(2): 487.
 - 6 O'Brien MF, Stafford G, Gardner M, Pohlner P, McGiffin D, Johnston N, Brosnan A, Duffy P. The viable cryopreserved allograft aortic valve. *J Cardiovasc Surg* 1987(a); 2(suppl I): 153-167.
 - 7 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-182-6.
 - 8 Da Costa FDA, Dohmen PM, Lopes SV, Pohl F, Vilani R, Vieira E, Da Costa MBA, Yoschi S, Konertz WF. Estudo experimental com heteroenxertos valvares descelularizados – a prótese do futuro. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2004; 19(1): 74-82.
 - 9 Mitchel RN, Jonas RA, Schoen FJ. Structure-function correlations in cryopreserved allograft cardiac valves. *Ann Thorac Surg* 1995; 60 (suppl 2): S108-S113.
 - 10 Homann M, Haehnel JC, Mendler N, Paek SU, Holper K, Meisner H, Lange R. Reconstruction of the RVOT with biological conduits: 25 years experience with allografts and xenografts. *Eur J Cardio-thorac Surg* 2000; 17 (6): 624-30.
 - 11 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 (6): 1014-21.
 - 12 Oei FB, Stegmann AP, Van der Ham F, Zondervan PE, Vessen 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.

- 13 Elkins RC, Goldstein S, Hewitt 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. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 13 (4 suppl 1): 87-92.
- 14 Hawkins JA, Hillman ND, Lambert LM, Jones J, Di Russo GB, Profaizer T, Fuller TC, Minich LL, Williams RV, Shaddy RE. Immunogenicity of decellularized cryopreserved allografts in pediatric cardiac surgery: comparison with standard cryopreserved allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126(1): 247-52.
- 15 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 (5): 1457-63.
- 16 Dohmen PM, Ozake S, Ypermen J, Flameng W, Konertz WF. Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 13(4 Suppl 1): 93-98.
- 17 Gross RE, Bill AH, Peirce EC. Methods for preservation and transplantation of arterial grafts in dogs: report of transplantation of preserved arterial grafts in nine human cases. *Surg Gynecol Obstet.* 1949; 88: 689-701.
- 18 McElhinney DB, Reddy VM, Hanley FL. Homografts in congenital heart disease: current applications and future directions. *Isr J Méd Sci* 1996; 32 (10): 880-885. Apud
- 19 Murray G. Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology.* 1956; 7 (5): 466-71.
- 20 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 (Torino).* 1968; 9 (6): 511-517.
- 21 Kerwin AG, Lenkei SC, Wilson DR. Aortic valve homograft in the treatment for aortic and mitral insufficiency. Report of nine cases, with one followed by six years. *N Engl J Med.* 1962; 266: 852-857.
- 22 Barrat-Boyes BG. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax.* 1964; 19: 131-150.
- 23 Hopkins RA. Tissue engineering of heart valves: Decellularized valve scaffolds. *Circulation.* 2005; 111 (21): 2712-2714. (Editorial)
- 24 Carpentier A, Lamaigre G, Robert L, Carpentier S, Dubost C. Biological factors affecting long term results of valvular heterografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 58 (4): 467-83.
- 25 Etz CD, Homann TM, Rane N, Bodian CA, Di Luozzo G, Plestis KA, Spielvogel D, Griep RB. Aortic root reconstruction with a bioprosthesis valved conduit: a consecutive series of 275 procedures. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007 Jun; 133(6): 1455-63.

-
- 26 Carrel TP, Schoenhoff FS, Schmidli J, Stalder M, Eckstein FS, Englberger L. Deleterious outcome of No-React-treated stentless valved conduits after aortic root replacement: why were warnings ignored? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Jul; 136(1): 52-7.
- 27 Koh M, Yagihara T, Uemura H, Kagisaki K, Hagino I, Ishizaka T, Kitamura S. Long-term outcome of right ventricular outflow tract reconstruction using a handmade tri-leaflet conduit. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005 May; 27(5): 807-14.
- 28 Brown JW, Ruzmetov M, Rodefeld MD, Vijay P, Darragh RK. Valved bovine jugular vein conduits for right ventricular outflow tract reconstruction in children: an attractive alternative to pulmonary homograft. *Ann Thorac Surg.* 2006 sep; 82(3): 909-16.
- 29 Forbess JM, Shah AS, St. Louis JD, Jagers JJ, Ungerleider RM. Cryopreserved homografts in the pulmonary position: determinants of durability. *Ann Thorac Surg.* 2001; 71 (1): 54-9.
- 30 Hopkins RA. Cardiac reconstruction with allograft tissues. New York, NY: Springer-Verlag; 2005.
- 31 Rajani B, Mee RB, Ratliff NB. Evidence for rejection of homograft cardiac valves in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998; 115 (1): 111-7.
- 32 Niwaya K, Knott-Craig CJ, Lane MM, Chandrasekaren K, Overholt ED, Elkins RC. Cryopreserved homografts valves in the pulmonary position: risk analysis for intermediate-term failure. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999; 117(1): 141-6.
- 33 Ward KE, Elkins RC, Overholt ED, Razook JD, Lane MM, Gilliland SS. Evaluation of cryopreserved homografts in the right ventricle outlet tract after the Ross procedure: intermediate-term follow-up. *J Heart Valve Dis.* 1997; 6 (2): 130-3.
- 34 Baskett RJ, Ross DB, Nanton MA, Murphy DA. Factors in the early failure of cryopreserved homograft pulmonary valves in children: preserved immunogenicity? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996; 112 (5): 1170-8.
- 35 Christenson, JT, Vala D, Sierra J, Beghetti M, Kalangos A. Blood group incompatibility and accelerated homograft fibrocalcifications. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 127 (1): 242-50.
- 36 Smith JD, Ogino H, Hunt D, Laylor RM, Rose ML, Yacoub MH. Humoral immune response to human aortic valve homografts. *Ann Thorac Surg.* 1995; 60 (2Suppl): S127-30.
- 37 Shaddy RE, Hunter DD, Osborne KA, Lambert LM, Minich LL, Hawkins JA. Prospective analysis of HLA immunogenicity of cryopreserved valved allografts used in pediatric heart surgery. *Circulation.* 1996; 94 (5): 1063-7.
- 38 Hawkins JA, Breinholt JP, Fuller TC, Lambert LM, McGough EC, Shaddy RE. Class I and class II anti-HLA antibodies after implantation of cryopreserved

-
- allograft material in pediatric patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000; 119: 324-30.
- 39 Breinholt JP, Hawkins JA, Lambert LM, Fuller TC, Profaizer T, Shaddy RE. A prospective analysis of the immunogenicity of cryopreserved nonvalved allografts used in pediatric heart surgery. *Circulation.* 2000; 102(Suppl 3): III 179-82.
- 40 Pompilio G, Polvani GL, Piccolo G, Porqueddu M, Dainese L, Veglia F, Biglioli P. Six-year monitoring of the donor-specific immune response to cryopreserved aortic allograft valves: implications with valve dysfunction. *Ann Thorac Surg* 2004; 78 (2): 557-63.
- 41 Shaddy RE, Hawkins JA. Immunology and failure of valves allografts in Ccildren. *Ann Thorac Surg.* 2002; 74 (4): 1271-5.
- 42 Bodnar E, Matsuki O, Parker R, Ross DN. Viable and nonviable aortic homografts in the subcoronary position: a comparative study. *Ann Thorac Surg* 1989; 47 (6): 799-805.
- 43 Gall K, Smith S, Willmette C. Allograft heart valve viability: a quantitative assesment of the effects of valve processing on fibroblast viability and valve processing variations. *Ann Thorac Surg* 1998; 65: 1032-8.
- 44 Shaddy RE, Hunter DD, Osborne KA, Lambert LM, Minich LL, Hawkins JA. Prospective analysis of HLA immunogenicity of cryopreserved valved allografts used in pediatric heart surgery. *Circulation.* 1996; 94: 1063-7.
- 45 Elkins RC, Lane MM, Capps SB, McCure C, Dawson PE. Humoral immuno response to allograft valve tissue pretreated with a antigen reduction process. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 13 (suppl I): 82-86.
- 46 Schilling T, Bader A, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, Haverich A. Tissue engineering of heart valves: human endothelial cell seeding on detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1998; 14: 279-83.
- 47 O'Brien MF, Goldstein S, Walsh S, Elkins EC, Clarke D. The SynerGraft valve: a new Acellular (non-glutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellulariztion First experimental studies before clinical implantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1999; 11: 194-200.
- 48 Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Deng JF, Inham E. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: Development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis.* 2002; 11(4): 457-62.
- 49 Kim WG Park JK, Lee WY. Tissue-engineered heart valve leaflets: an effective method of obtaining acellularied valve xenograft. *Int J Artif Organs.* 2002; 25: 791-7.

-
- 50 Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner G, Wiegel G, Simon P. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs*. 2003; 26: 421-7.
- 51 Dohmen PM, Ozaki S, Verbeken E *et al*. Tissue engineering of pulmonary xenograft heart valve. *Asian Cardiovasc Thorac Surg*. 2002; 10: 25-30.
- 52 Elkins RC, Dawson PE, Goldstein S, Walsh SP, Black KS. Decellularized human valve allografts. *Ann Thorac Surg*. 2001; 71: S428-32.
- 53 Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, Pething 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 (19 Suppl 3): III50-5.
- 54 Dohmen PA, Ozaki S, Nitsch R, Yperman J, Flameng W, Konertz W. A tissue engineered heart valve implanted in juvenile sheep model. *Méd Sci Monit*, 2003; 9(4): 137-144.
- 55 Forough R, Koxama N, Hasenstab D. Overexpression of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 inhibits vascular smooth muscle cell function in vitro and in vivo. *Circ Res*. 1996; 79: 812-20.
- 56 Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann thorac Surg*, 1995; 60: 513-16.
- 57 Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation*. 2000; 102 (suppl III): III44-9.
- 58 Stock UA, Nagashima M, Khalil PN. Tissue engineering valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000; 119: 732-40.
- 59 Da Costa FD, Dohmen PM, Lopes SV, Pohl F, Vilani R, Vieira ED, Da Costa MB, Konertz W. Estudo experimental com homoenxertos valvares decelularizados – a prótese do futuro. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2004; 19(1): 332.
- 60 Da Costa FD, Dohmen PM, Lopes SV, Lacerda G, Pohl F, Vilani R, Vieira ED, Da Costa MB, Yoschi S, Konertz W, Da Costa IA. Comparison of cryopreserved homografts and decellularized porcine heterografts implanted in Sheep. *Artif Organs*. 2004; 28(4): 366-370.
- 61 Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E, Wolner W. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve Synergraft in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003; 23: 1002-6.
- 62 Allaire E, Gueltter C, Michel JB. Cell-free grafts: Morphologic characteristics of aortic isografts and xenografts in rats. *J Vasc Surg*. 1994; 19: 446-456.
- 63 Dohmen PM, Lembcke A, Hotz H, Kivelitz D, Konertz WF. Ross operation with a tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg*. 2002; 47: 1438-42.

-
- 64 Tavakkol Z, Gelehrter S, Goldberg CS, Bove EL, Devaney EJ, Ohye RG. Superior durability of Synergraft pulmonary allograft compared with standard cryopreserved allografts. *Ann Thorac Surg*. 2005; 80: 1610-4.
- 65 Matthias-Bechtel JF, Gellissen J, Erasm AW, Petersen M, Hiob A, Stierle U, Sievers HH. Mid-term findings on echocardiography and computed tomography after RVOT-reconstruction: comparison of decellularized (Synergraft) and conventional allografts. *Eur J Cardio-thorac Surg*. 2005; 27: 410-5.
- 66 O'Brien MF, Harrocks S, Satafford EG, Gardner MA, Pohlner PG, Tesar PJ, Stephens D. The homograft aortic valve: a 29-year, 99,3% follow-up of 1022 valve replacements. *J Heart Valve Dis*. 2001; 10 (N.3): 334-45.
- 67 Meuris, B, Ozaki S, Herijgers P, Verbeken E, Flameng W. Influence os species, enviromental factors, and tissue cellularity on calcification of porcine aortic wall tissue. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2001; 13 (Suppl I): 99-105.
- 68 Ozaki S, Dohmen PA, Flameng W, Konertz W: Superiority of tissue engineered heart valves to stentless porcine aortic bioprosthesis. *Artif Organs*. 2001; (25): 84.
- 69 Hopkins RA, Jones LA, Wol?nbarger L, Moore MA, Bert AA, Lo?and GK. Decellularization reduces calci?cation while improving both durability and 1-year functional results of pulmonary homograft valves in juvenile sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009; 137: 907-13.
- 70 Hilbert SL, Luna RE, Zhang J, Wang Y, Hopkins RA, Yu ZX, Ferrans JF. Allograft heart valves: The role of apoptosis-mediated cell loss. *J of Thorac Cardiovasc Surg*. 1999; 117 (3): 454-62.
- 71 Numata S, Fujisato T, Niwaya K, Nakatani T, Kitamura S. Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: comparyson with cryopreserved allograft. *The J Heart Valve Tissue*. 2004; 13: 984-990.
- 72 Lopes SAV, da Costa FDA, de Paula JB, Dohmen PM, Phol F, Vilani R, Roderjan JG, Vieira ED. Decellularized heterografts versus cryopreserved homografts: experimental study in sheep model. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2009; 24 (1): 15-22.
- 73 Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, Hilfiker A, Mertsching H, Leyh R, Breymann T, Kallenbach K, Maniuc L, Batrinac A, Repin O, Maliga O, Ciubotaru A, Haverich A. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitors cells. *Circulation*. 2006; 114 (1 Suppl): I132-7.
- 74 Meliones JN, Snider AR, Bove EL, Serwer GA, Peters J, Lacina SJ, Florentine MS, Rosenthal A. Doppler evaluation of homograft valved conduits in children. *Am J Cardiol*. 1989; 64 (5): 354-8.

-
- ⁷⁵ Chan KC, Fyfe DA, McKay CA, Sade RM, Crawford FA. Right ventricular outflow reconstruction with cryopreserved homografts in paediatric patients: intermediate-term follow-up with serial echocardiographic assessment. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 24: 483-9.

NORMAS ADOTADAS

Manual de Normas de Vancouver: referências e citações. Curitiba: Sistema Integrado de Bibliotecas da PUCPR, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2009.

International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Inter Med.* 1997; 126(1): 36-47.



PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**NÚCLEO DE BIOÉTICA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Curitiba, 11 de junho de 2007.

PARECER N. 55/07/CEUA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (a),

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais, em reunião realizada no dia 04 de junho do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado “Avaliação do comportamento biológico de homoenxertos valvares pulmonares decelularizados com solução PUC I: estudo experimental em ovinos”, sob o registro no CEUA /PUCPR nº 228.

O colegiado do CEUA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

- Esclarecer se os animais que fornecerão os enxertos serão abatidos para a pesquisa ou virão de animais abatidos para consumo.

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,




Prof.^a Graçinda Maria D'Almeida e Oliveira
Presidente do Comitê de Ética no Uso de Animais PUCPR

Ilmo Sr

Fábio Binhara Navarro

ANEXO II – CRITÉRIOS PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA

CARACTERIZAÇÃO DA RECELULARIZAÇÃO

GRADUAÇÃO (pela coloração hematoxilina-eosina):

0 – Nenhuma ou pouca recelularização

- Poucas células na adventícia (até 150 células/campo de 100X)
- Ausência de células na camada média e íntima
- Ausência ou poucas células endoteliais

1 – Moderada recelularização

- Adventícia – presença de 150 a 250 células/campo de 100X
- Envolve a camada média (até 150 células/campo de 100X)
- Células endoteliais próximas às anastomose, menos de 1/3 da luz do enxerto

2 – Recelularização abundante (celularidade próxima à normal)

- Adventícia – mais de 250 células/campo de 100X
- Média – mais de 150 células/campo de 100X
- Envolve a camada íntima
- Células endoteliais envolvendo mais de 2/3 do enxerto

CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

GRADUAÇÃO (pela presença de células inflamatórias, leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, pela coloração hematoxilina-eosina):

0 – Normal – poucas células inflamatórias (< 25 células/campo 100X)

1 – Pouco Inflamado – moderada quantidade de células inflamatórias (>25 e <150 células inflamatórias)

2 – Inflamado – mais de 150 células/campo 100X

CARACTERIZAÇÃO DA REENDOTELIZAÇÃO

GRADUAÇÃO (pela coloração hematoxilina-eosina):

0 – Pouca ou ausente

- Endotélio ausente ou menos de 1/3 da luz, próximo às anastomoses
- 1 a 2 células/campo 400X

1 – Moderada

- Endotélio em mais de 1/3 e menos de 2/3 da luz
- 5 a 6 células/campo 400X

2 – Grande ou Completa

- Endotélio em mais de 2/3 da superfície do enxerto

CARACTERIZAÇÃO DA NEOVASCULARIZAÇÃO

GRADUAÇÃO (pela presença de neovasos na adventícia, pelas colorações de hematoxilina-eosina e Movat):

0 – Nenhum

- Ausência de neovasos

1 – Poucos

- Menos de 5 neovasos/campo de 100X

2 – Muitos

- Mais de 5 neovasos/campo de 100

CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR

GRADUAÇÃO (pelas colorações de Russell-Movat e Silvermann-Movat):

0 – Desorganizada

- Mais de 70% das fibras colágenas e elásticas rotas, presença de lacunas entre as fibras, ausência de glicosaminoglicanos

1 – Parcialmente Organizada

- Menos de 70% das fibras colágenas e elásticas rotas, camada íntima não festonada, presença de glicosaminoglicanos

2 – Organizada / Normal

- Fibras colágenas e elásticas íntegras, distribuição normal de glicosaminoglicanos

CARACTERIZAÇÃO DA CALCIFICAÇÃO

GRADUAÇÃO (pelas colorações de Alizarina-Red 4.2 – cristais de fosfato de cálcio – e 7.0 – cristais de oxalato de cálcio):

0 – Sem Calcificação

- Ausência de cristais de fosfato ou oxalato de cálcio
- Mínima calcificação ao redor dos fios de sutura nas anastomoses

1 – Pouca Calcificação

- Pequenos cristais de fosfato ou oxalato de cálcio, não causando dano à matriz extracelular do conduto ou cúspide

2 – Calcificação Importante

- Grandes e/ou numerosos cristais de fosfato ou oxalato de cálcio causando dano à matriz extracelular