

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

CLAUDINEI COLLATUSSO

**ANÁLISE DA EFETIVIDADE DA DESCELULARIZAÇÃO COMO MÉTODO
ANTICALCIFICANTE EM PRÓTESES VALVARES DE PERICÁRDIO BOVINO
FIXADO EM GLUTARALDEÍDO. ESTUDO EXPERIMENTAL EM OVINOS**

CURITIBA

2010

CLAUDINEI COLLATUSSO

**ANÁLISE DA EFETIVIDADE DA DESCELULARIZAÇÃO COMO MÉTODO
ANTICALCIFICANTE EM PRÓTESES VALVARES DE PERICÁRDIO BOVINO
FIXADO EM GLUTARALDEÍDO. ESTUDO EXPERIMENTAL EM OVINOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa

Co-Orientador: Dr João Gabriel Roderjan

CURITIBA

2010

COLATUSO, Claudinei.// *Análise da efetividade da descelularização como método anticalcificante em próteses valvares de pericárdio bovino fixado em glutaraldeído, estudo experimental em ovinos.*// Curitiba, 2010.// 54 p.// (Dissertação – Programa de Pós - Graduação em Cirurgia – Pontifícia Universidade Católica do Paraná).

ORIENTADOR(a): Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa

DESCRITORES: 1.Biopróteses 2. Pericárdio bovino 3. Descelularização 4. Calcificação

NLMC – WG169

FOLHA DE APROVAÇÃO

Claudinei Collatusso

Análise da efetividade da descelularização como método anticalcificante em próteses valvares de pericárdio bovino fixado em glutaraldeído. Estudo experimental em ovinos.

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

Aprovado em de de 2010.

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho:

*À minha noiva, Daniele de Fátima Fornazari,
sempre companheira, ao meu lado me incentivando.*

*Aos meus pais, pela educação, exemplo de luta e
por mostrar o caminho para as grandes conquistas.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa, pelo apoio incondicional e incentivo.

Ao grupo de pesquisa do Núcleo de Enxertos Cardiovasculares da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, sem os quais seria impossível realizar este trabalho.

Ao grupo de Cirurgia Cardíaca da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba, pela ajuda durante esta jornada.

Ao Prof. Dr Nelson Itiro Miyagui, pelo tempo dispensado e dedicação na realização dos exames de ecocardiograma.

À Prof^ª. Dra. Lucia de Noronha, pela ajuda na avaliação histológica.

Agradeço a toda a equipe do Hospital Veterinário e à Fazenda Galha Azul da PUCPR por cuidarem com dedicação dos animais estudados.

Agradeço à Prof^ª. Márcia Olandoski pela realização da análise estatística.

RESUMO

Introdução: o pericárdio bovino fixado em glutaraldeído é utilizado na confecção de próteses valvares cardíacas, porém sofre processo de degeneração e calcificação. Vários métodos foram empregados com a finalidade de evitar a calcificação. **Objetivo:** avaliar o processo de descelularização como método anticalcificante em próteses de pericárdio bovino fixado em glutaraldeído, implantados em modelo circulatório de ovinos. **Métodos:** foram confeccionados tubos valvados de pericárdio bovino com 21 mm de diâmetro e divididos em dois grupos: controle com pericárdio fixado em glutaraldeído e grupo estudo com pericárdio descelularizado e fixado em glutaraldeído. Foram implantados em posição pulmonar em ovinos por 180 dias. As peças explantadas foram submetidas à análise macroscópica e radiográfica, análise histológica com hematoxilina e eosina, Alizarina-red e Pentacrômico de Russel-Movatz e quantificação de cálcio por espectrometria de absorção atômica. **Resultados:** foram explantados seis enxertos de cada grupo. Todos os enxertos do grupo controle apresentavam calcificação intensa das cúspides e algumas regiões dos condutos, já os enxertos descelularizados apresentavam-se preservados sem calcificações grosseiras evidentes. Dados foram comprovados por radiografia. A análise histológica evidenciou infiltrado inflamatório monomorfonuclear com reação de corpo estranho nos dois grupos, com predomínio proximal e adventicial. Tanto as cúspides como os condutos estavam cobertos por camada neointimal, mais espessa nas porções proximais. A matriz estava preservada nos enxertos descelularizados e desorganizada com roturas de fibras no controle. Observaram-se calcificações grosseiras nos folhetos e condutos do grupo controle e apenas pontos focais no grupo estudo. O conteúdo de cálcio medido nos condutos foi de $35,25 \pm 42,13$ no controle *versus* $15,75 \pm 10,44$ no descelularizado: já nas cúspides foi de $264,4 \pm 126,16$ no controle *versus* $94,29 \pm 27,05$ no estudo ($p=0,009$). **Conclusão:** a descelularização mostrou-se como um método anticalcificante eficaz em pericárdio bovino descelularizado implantado em modelo circulatório de ovinos por 180 dias

DESCRITORES: Biopróteses. Pericárdio bovino. Descelularização. Calcificação.

ABSTRACT

Introduction: bovine pericardium preserved into glutaraldehyde is used in cardiac bioprosthesis, however a process of degeneration and calcification is identified. Many treatments are used to try avoid this calcification. **Objective:** to analyze the descelularization process in bovine pericardium preserved in glutaraldehyde like anticalcification method in valves implanted in a circulatory sheep model. **Methods:** it was produced valved tubs with 21 mm diameter and divided in two groups: control group – bovine pericardium preserved in glutaraldehyde and study group – bovine pericardium descelularized and preserved in glutaraldehyde. The tubs were implanted in pulmonary artery position in sheep model by 180 days. After explantation the tubs were analyzed by x-ray macroscopy, histology by hematoxylin-eosin, alizarin-red and Russel-Movatz pentacromic. The calcium content was measured by flame atomic absorption spectrometry. **Results:** six tubs were analyzed in each group. All cusps in the control group were intense calcified and some areas in the wall tub too. But ther decellularized group presented only little calcification points. Dates were proved by x-ray exams. The histological analysis showed the same monomorfonuclear infiltrate mainly in basis and adventicial regions with granulomas reaction. In the wall and cusps were covered by neointimal formation in both groups and were thicker in basis. The matrix was preserved in descelularized group, however in the control group had damage fibers. Calcification was observed in all cusps in control group and in some areas in the walls and only little points in the study group. The wall calcium content was $35,25 \pm 42,13$ I the control versus $15,75 \pm 10,44$ in the descelularized: in the cusps was $264,4 \pm 126,16$ in controls versus $94,29 \pm 27,05$ in decelularized ($p=0,009$). **Conclusions:** descelularization showed a good power anticalcification in bovine pericardium tested in circulatory sheep model by 180 days.

DESCRIPTORS: Bioprosthesis. Bovine pericardium. Descellularization. Calcification.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Ecocardiográficos obtidos na evolução tardia.....	26
Tabela 2 -	Análise macroscópica dos enxertos explantados.....	29
Tabela 3 -	Mensuração de cálcio nas cúspides valvares e condutos.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A - tubo de pericárdio demonstrando os três folhetos da valva suturados na porção proximal; b - aspecto macroscópico externo dos tubos valvados.....	16
Figura 2 -	Fotomicrografia do controle histológico de pericárdio bovino após processo de descelularização, evidenciando ausência completa de células e boa preservação da matriz extracelular (he 100x).....	17
Figura 3 -	Fotografia demonstrando a monitorização do carneiro na sala cirúrgica.....	18
Figura 4 -	Fotografia demonstrando aspecto final da operação.....	20
Figura 5 -	Fotografia dos segmentos de conduto (inferior) e de folheto (superior) separados para aferição do cálcio por espectrometria de absorção atômica.....	23
Figura 6 -	Análise macroscópica dos tubos valvados durante a operação para o explante.....	26
Figura 7 -	Aspecto macroscópico dos enxertos após secção do conduto....	27
Figura 8 -	Fotos dos tubos valvados explantados após 180 dias.....	28
Figura 9 -	A,C,E,G,I e K representam enxertos GDA. Podemos observar calcificação intensa dos folhetos (setas). B,D,F,H,J e L enxertos DESC apresentam apenas pontos focais de calcificações (setas).....	30
Figura 10 -	Fotomicrografia de enxerto GDA: presença de infiltrado	

	inflamatório, desorganização da matriz (setas), formação da camada neointima e adventícia com neovasos (HE 40x).....	31
Figura 11 -	Fotomicrografia de enxerto GDA: podemos observar o infiltrado inflamatório da parede do tubo com metaplasia óssea. A seta indica um osteoclasto (HE 200x).....	32
Figura 12 -	Fotomicrografia de enxerto GDA: podemos observar formação neointimal com predomínio nas porções basais e na face arterial e presença de calcificação distrófica na cúspide (setas) (HE 40x).....	33
Figura 13 -	Fotomicrografia de enxerto DESC: observa-se um maior infiltrado inflamatório com predomínio na inserção (seta) e formação neointimal espessa (HE 40x).....	34
Figura 14 -	Fotomicrografia de enxertos DESC.....	34
Figura 15 -	Fotomicrografia de enxerto DESC. podemos observar ponto de calcificação em linha de sutura (setas) envolvida por processo inflamatório (HE 100x).....	35
Figura 16 -	Fotomicrografia de enxerto GDA: desorganização da matriz com encolhimento das fibras colagenas (setas). Presença de infiltrado inflamatório ao redor do enxerto e pouca concentração de glicosaminoglicanos. (Pentacromico de Russel-Movatz 100x).....	36
Figura 17	Fotomicrografia de enxerto DESC: preservação da matriz colágena sinalizada com a seta. Grande concentração de glicosaminoglicanos corados e azul e maior infiltrado inflamatório. (Pentacrômico de Russel-Movat's. 200x).....	37
Figura 18 -	A - enxerto GDA com calcificação distrófica; B - enxerto DESC com ausência de calcificação. (Alizarin-red 40x ph 4,2).....	38
Figura 19 -	A - enxerto GDA com calcificação distrófica do folheto; B - enxerto DESC com ausência de calcificação. (Alizarin-red ph 7 40x).....	38
Figura 20 -	Enxerto DESC mostrando ponto isolado de calcificação ao redor do fio de sutura. (Alizarin-red ph 4,2 200x).....	39
Figura 21 -	Gráfico com os valores de cálcio medidos nos condutos valvares, $p = 0,297$	40
Figura 22 -	Gráfico demonstrando os valores de cálcio medidos nas cúspides valvares, $p = 0,009$	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlCl ₃ -	Cloreto de alumínio
CEC	Circulação extracorpórea
GDA	Glutaraldeído
Grupo DESC	Grupo descelularizado
HCL	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina e eosina
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
MAX	Máximo
MIN	Mínimo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCSC	Tecido celular subcutâneo

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
3 MÉTODOS	15
3.1 AMOSTRA	15
3.2 PREPARO DO ENXERTO	15
3.2.1 Obtenção dos Pericárdios Bovinos	15
3.2.2 Preparo dos Heteroenxertos Fixados em GDA.....	16
3.2.3 Preparo dos Heteroenxertos Descelularizados.....	17
3.3 PRÉ - OPERATÓRIO.....	17
3.4 ANESTESIA E PREPARO CIRÚRGICO	18
3.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	19
3.6 PÓS - OPERATÓRIO	21
3.7 EUTANÁSIA.....	21
3.8 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO	22
3.8.1 Análise Ecocardiográfica.....	22
3.8.2 Análise Macroscópica	22
3.8.3 Análise Radiológica.....	23
3.8.4 Preparo dos Segmentos Valvares	23
3.8.5 Análise de Cálcio	24
3.8.6 Análise Histológica.....	24
3.8.7 Análise Estatística	24
4 RESULTADOS	25
4.1 EVOLUÇÃO CLÍNICA	25
4.2 ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA	25
4.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA	26

4.4 ANÁLISE RADIOLÓGICA	29
4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA	31
4.5.1 Coloração de HE.....	31
4.5.2 Coloração Pentacrômico de Russel-Movat´s.....	35
4.5.3 Coloração Alizarin-red ph 4,2.....	37
4.5.4 Coloração Alizarin-red ph 7	38
4.6 MENSURAÇÃO DO CÁLCIO.....	39
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Diversas condições clínicas, tais como a moléstia reumática, cardiopatias congênitas e doenças degenerativas ou infecciosas podem causar lesões em valvas cardíacas nativas, com elevada morbi-mortalidade. Estima-se que o número de pacientes que necessitam de cirurgia para substituição valvar seja de 270.000/ano no mundo. Não existe a prótese valvar ideal, e apesar dos avanços tecnológicos, a escolha do melhor substituto ainda é um problema, pois todas apresentam vantagens e desvantagens^{1,2}.

Existem dois tipos de próteses cardíacas: as biológicas e as mecânicas. As próteses biológicas, que podem ser construídas com tecidos autólogos, homólogos ou heterólogos, apresentam boa função hemodinâmica, não requerem o uso de medicação anticoagulante no pós-operatório, mas apresentam durabilidade limitada, por degeneração precoce, especialmente em pacientes jovens³. Já, as próteses metálicas são duráveis, porém pelo alto risco de eventos tromboembólicos, necessitam de anticoagulação permanente, estando sujeitas às complicações hemorrágicas. Em países em desenvolvimento como o Brasil, a condição precária para o adequado controle da anticoagulação, faz com que o uso de próteses metálicas seja ainda mais limitado⁴.

Dentre as próteses biológicas, as de pericárdio bovino fixadas em glutaraldeído (GDA) são utilizadas desde a década de 70 e seus resultados clínicos bem conhecidos⁶. Uma vez implantadas, estão sujeitas à disfunção estrutural progressiva por degeneração tecidual, especialmente em decorrência da calcificação distrófica. Os mecanismos responsáveis pela calcificação são multifatoriais e são influenciados pelo sítio de implante, condições de stress mecânico e de pressão e contato com o sangue⁷⁻¹¹.

Admite-se, entretanto, que uma das principais causas da calcificação em tecidos protéticos, se deve a atração eletrostática entre o cálcio circulante e os fosfolípídeos, presentes nas membranas e debris celulares de tecidos fixados pela perda da bomba ativa de cálcio^{11,12}.

O uso do GDA no preparo de tecidos biológicos para próteses valvares, foi introduzido por Carpentier *et al* em 1967, para próteses porcinas⁵. O GDA, além de ser efetivo na esterilização, diminui significativamente a antigenicidade por mascarar os antígenos teciduais. Porém, a permanência de aldeídos residuais no tecido fixado é citotóxica, causando reação inflamatória e funcionando como um sítio inicial à deposição de cálcio¹⁶.

Diversos tratamentos foram propostos com a finalidade de eliminar ou retardar a calcificação, com resultados experimentais e clínicos variados. Dentre os métodos propostos, incluem-se a utilização de concentrações maiores de GDA, com ou sem processo de detoxificação^{21,22}. Outros tratamentos incluem alcoóis para remoção de fosfolípidos^{24,25}, metais trivalentes como ferro e alumínio, associado ou não ao etanol^{26,27}, ácido L-glutâmico^{28,29}, calor³⁰, radiação gama³¹, ácido amino-oléico^{32,33} e ácido tânico³⁴. Foi testado também o sinergismo de alguns tratamentos³⁵, porém nenhum foi completamente eficaz.

É bem sabido, que a presença de células mortas e restos celulares nos tecidos fixados são antigênicos e funcionam como núcleos iniciais de calcificação. Recentemente, a descclularização tem sido utilizada como uma alternativa no processamento de tecidos biológicos de próteses cardiovasculares que por eliminar as células pode retardar a calcificação³⁶.

A descclularização pode ser feita por processos físicos, químicos ou enzimáticos. O método ideal seria aquele que pudesse eliminar todas as células do tecido sem causar nenhum dano a matriz extracelular, preservando todos os seus demais componentes, mantendo suas propriedades biomecânicas intactas. Dentre as soluções descclularizantes mais comumente empregadas, estão as baseadas em dodecil sulfato de sódio (SDS), deoxicolato de sódio, Triton X100, tripsina e DNAses³⁶⁻⁴².

Nosso grupo de pesquisa, na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) desenvolveu e patenteou método de descclularização de homoenxertos valvares, baseada numa solução de SDS. Os resultados experimentais e clínicos demonstraram que com esse método, os enxertos se tornaram mais biocompatíveis e dentre uma série de vantagens, apresentam maior resistência à degeneração por calcificação^{48,49}.

Trabalho experimental (dados em análise para publicação) realizado em nossa instituição demonstrou que a descclularização com SDS de pericárdios

bovinos fixados em GDA e implantados no tecido celular subcutâneo (TCSC) de ratos, foi muito eficaz em reduzir a calcificação por períodos de até 90 dias. Dados semelhantes foram publicados por outros investigadores^{43,44}. Além disso, as próteses porcinas Hancock II, que tem um tratamento anticalcificante que inclui o SDS, apresentaram ótima durabilidade em estudos clínicos, com incidência reduzida de calcificação^{52,53}.

Desta forma, o presente trabalho representa a continuidade de uma linha de pesquisa de nossa instituição e pretende avaliar se a eficácia da descelularização com SDS de pericárdios bovinos fixados em GDA, como método anticalcificante observada em ratos, pode ser confirmada num modelo circulatório de animal de maior porte.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi analisar a efetividade da descelularização tecidual com dodecil sulfato de sódio, como método anticalcificante em próteses de pericárdio bovino fixadas em glutaraldeído, substituindo o tronco da artéria pulmonar de ovinos por 180 dias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A doença valvar cardíaca de causa congênita, reumática, degenerativa ou infecciosa, afeta indivíduos de todas as faixas etárias, sendo na maioria dos casos, necessário a substituição por próteses. As próteses disponíveis podem ser biológicas ou metálicas, todas apresentando vantagens e desvantagens. A experiência clínica de mais de 50 anos com o uso de próteses valvares biológicas demonstrou que possuem bom desempenho hemodinâmico e baixa incidência de complicações tromboembólicas, estando associado com excelente recuperação funcional dos pacientes. Entretanto, sua durabilidade ainda é muito limitada, especialmente em crianças e adultos jovens, sendo a calcificação distrófica o seu mecanismo mais frequente de disfunção. Na experiência de Alsoufi *et al*, os resultados de próteses biológicas em crianças e jovens mostraram que apenas 20% destes pacientes estão livres de reoperação após 16 anos de implante¹. Apesar da disfunção por degeneração, a utilização das próteses biológicas vem aumentando nos últimos anos, devido ao menor índice de eventos adversos e melhor qualidade de vida².

Em pacientes acima de 65 anos de idade a durabilidade das próteses biológicas é bem melhor. Brandão *et al*, estudaram os resultados de 12 anos das biopróteses de pericárdio bovino em pacientes com média de idade de 70 anos. Nesta faixa etária a calcificação foi menos frequente, com 98% dos pacientes livres de calcificação na prótese³. Braile *et al*, demonstraram a segurança do uso das biopróteses aplicadas em posição aórtica em nosso meio, com sobrevida livre de disfunção primária por calcificação após 12 anos, de 96%. As disfunções observadas nesta série também ocorreram em pacientes mais jovens com média de idade de 49 anos⁴.

O uso do GDA como método de tratamento de tecidos heterólogos, o qual possibilitou a construção de próteses biológicas, foi descrito em 1967 por Carpentier *et al*, para próteses valvares porcinas⁵. Dentre as suas vantagens, a fixação pelo GDA aumenta a resistência tecidual à fadiga, reduz de forma significativa sua antigenicidade, além de ser bastante efetivo na esterilização.

Alguns anos mais tarde, Ionescu *et al* introduziram um novo modelo de bioprótese, utilizando pericárdio bovino fixado em GDA que era moldado em anel de suporte formando uma valva tricúspide⁶. Subsequentemente, tanto as próteses porcinas como as de pericárdio bovino, passaram a ser extensivamente empregadas clinicamente na substituição de valvas cardíacas patológicas. Ao longo dos anos, essas próteses tiveram uma série de refinamentos tecnológicos no seu método de construção e controle de qualidade, entretanto, o conceito básico de um tecido heterólogo fixado em GDA e montado em um anel de suporte, persiste até os dias atuais.

O pericárdio bovino, além de ser utilizado na confecção de biopróteses, também é utilizado em cirurgia cardiovascular como remendo na correção de defeitos congênitos, substituto de parede atrial, ventricular ou de vasos. A degeneração tecidual depende de vários fatores como sítio de implante, condições de stress e pressão, e contato direto com a corrente sanguínea. Pires *et al*, demonstraram que implantes de pericárdio bovino fixado em GDA em diferentes localizações anatômicas em cães, apresentaram degeneração em graus variáveis e as alterações foram mais evidentes quando o tecido esteve em contato com o sangue do animal⁷. Gabbay *et al*, submetem o pericárdio bovino, fixado em GDA, ao stress mecânico ao substituírem cordas da válvula mitral em cães por cordas de tecido pericárdico fixado. Observaram degeneração significativa das cordas com calcificação extensa. Já o pericárdio implantado como substituto da parede atrial não apresentou grandes alterações⁸.

Meuris *et al*, demonstraram que além das condições como pressão e contato com o sangue, a calcificação pode ser variável dependendo da espécie animal. Este resultado foi observado após implantes de heteroenxertos porcinos fixados em GDA, implantados em TCSC de ratos, onde ocorreu calcificação importante, enquanto nos implantes em tecido subcutâneo de ovelhas a calcificação não ocorreu⁹.

A degeneração dos tecidos pode ocorrer independente da calcificação. Vesely *et al*, submetem cúspides de próteses porcinas explantadas à testes mecânicos e histológicos. Observaram que o dano mecânico rompe as fibras colágenas da matriz independente da presença, ou não, de calcificação. Entretanto, os locais onde existem fibras rotas podem funcionar como sítios iniciais de formação de cristais de cálcio¹⁰.

Os mecanismos responsáveis pela calcificação distrófica dos heteroenxertos protéticos, foram amplamente discutidos e revisados por Schoen e Levy. A calcificação depende de fatores do receptor, características da estrutura e química do implante, além de fatores mecânicos já citados. A formação de cristais de cálcio é iniciada nas células desvitalizadas e debris celulares, não removidos pelo tratamento de fixação. As células mortas perdem a função da bomba de cálcio, e com isso ocorre um influxo de cálcio do fluido extracelular para o intracelular. Este cálcio se liga aos fosfolipídeos das membranas celulares e ácidos nucléicos, formando os cristais de fosfato de cálcio. Os cristais se ligam formando nódulos grosseiros que espessam e enfraquecem o tecido. Os grupos aldeídos, livres residuais da fixação com GDA, também funcionam como focos iniciais de calcificação¹¹.

O potencial de calcificação intrínseca de um tecido se deve muito às propriedades estruturais, especificamente a quantidade de fosfolipídeos incorporada ao tecido, principalmente nas células e organelas nucleares. Cunanan *et al*, analisaram o conteúdo de fosfolipídeos em tecidos de próteses de pericárdio bovino e porcino, disponíveis para uso clínico no mercado e relacionaram com a calcificação observada em implantes no TCSC de ratos por 90 dias. O tecido porcino apresentou três vezes mais fosfolipídeos que o pericárdio fresco, já os tecidos fixados apresentaram concentrações menores. Houve importante correlação entre os níveis de fosfolipídeos e a intensidade da calcificação¹².

Baseado nos mecanismos que levam a calcificação, são traçadas estratégias de tratamentos anticalcificantes, os quais são testados em ensaios pré-clínicos. Os principais métodos anticalcificantes incluem: uso de inibidores da calcificação, métodos de fixação alternativos ao GDA, metais trivalentes, ácido amino-oléico, alcoóis, remoção de células e restos celulares por processos de descelularização e engenharia de tecidos¹³.

Os tratamentos anticalcificantes deveriam ser efetivos, sem causar dano tecidual ou toxicidade celular. A investigação pré-clínica da eficácia e segurança do tratamento deve seguir quatro passos: implante heterotópico em TCSC de ratos, mais barato e com calcificação em 90 dias; estudos biomecânicos *in vitro* e de durabilidade; estudo morfológico de válvulas não implantadas e por fim implante em modelo circulatório em grandes animais. O principal modelo utilizado

é o implante ortotópico em modelo circulatório de ovinos jovens, que apresentam hemodinâmica semelhante aos humanos e calcificação acelerada¹⁴. Flameng *et al*, avaliaram em uma série de cirurgias experimentais em ovinos, os fatores que influenciaram a calcificação neste modelo, sendo mais intensa no carneiro juvenil, em posição mitral, em próteses sem suporte. A calcificação está estabelecida a partir do terceiro mês de implante¹⁵.

As próteses valvares de heteroenxertos, liberadas para uso clínico na atualidade são fixadas em GDA. As funções do GDA são: a fixação do tecido conferindo resistência à degeneração e diminuição da antigenicidade por mascarar os antígenos teciduais. Porém, em pacientes jovens a degeneração é mais precoce, ou seja, o processo não evita a rejeição imune. Manji *et al*, em estudo experimental utilizando enxertos singênicos e xenogênicos, fixados em GDA implantados em ratos, verificaram que havia uma maior presença de células inflamatórias nos implantes xenogênicos e quando associaram esteróides ao tratamento houve importante diminuição na inflamação. O aumento da inflamação correlacionou-se com maior calcificação. O GDA por si só não evita completamente a rejeição celular e humoral¹⁶.

Como o GDA também tem participação nos processos de calcificação, outros métodos de fixação foram testados. A fixação com triglicidilamina associada com bifosfonatos demonstrou importante efeito anticalcificante na parede aórtica e cúspide Porcina implantados em ratos, sem causar dano histológico ao tecido, podendo ser uma alternativa futura¹⁷. A carbodimide também foi testada em segmentos de cúspide e parede aórtica porcina em implantes em TCSC de ratos por 8 semanas, obtendo redução na calcificação, porém necessita ensaios em modelo circulatório e testes clínicos¹⁸.

Os aldeídos residuais da fixação com GDA estão implicados nos processos de calcificação. O processo de liofilização, ou seja, congelamento à seco, reduz estes grupos, diminuindo com isso a citotoxicidade do tecido e conseqüentemente a calcificação¹⁹.

Zilla *et al*, observaram em ensaio com ratos, que elevadas concentrações de GDA reduziram a calcificação. Este resultado foi avaliado em heteroenxertos porcinos implantados no arco aórtico de ovinos por seis meses. Observou-se redução na calcificação na parede aórtica em 38% e ausência nos folhetos, talvez

por uma maior supressão imune do tecido. Porém, não foram avaliados os possíveis efeitos citotóxicos deste tratamento²⁰.

Trantina- Yates *et al*, demonstraram que o aumento na concentração do GDA associado a um processo de detoxicação para remoção do excesso dos resíduos em heteroenxertos porcinos implantados em arco aórtico de ovinos, diminuíram a calcificação da parede aórtica em 79% e nas cúspides porcinas em 95%, ou seja, houve um sinergismo no processo²¹. O método de foto-oxidação na fixação de tecidos também foi efetivo em inibir a calcificação, tanto em parede aórtica como nas cúspides porcinas implantadas em posição pulmonar de ovinos aos 3 e 6 meses²².

Outra opção de tratamento testada foi o polietilenoglicol, um ácido que pode ser utilizado na preservação tecidual e é muito pouco citotóxico, além de possuir efeitos antiinflamatórios e antitrombóticos. Em implantes de próteses porcinas, fixadas com este método por 150 dias em ovinos, observou-se que o tecido tratado com este ácido apresentava níveis reduzidos de cálcio, além de boa reendotelização do tecido com células viáveis do receptor. O efeito protetor do endotélio contra a calcificação poderia aumentar a durabilidade da prótese²³.

Além de alternativas à fixação, foram testados métodos com o objetivo de remover os fosfolípidos presentes nos tecidos. O octanediol, um álcool alifático de cadeia longa, foi utilizado para lavagem do pericárdio após fixação com GDA. Observou-se que em implantes de fragmentos de pericárdio bovino fixado em GDA, em ratos tratados com este método por 75 dias, a calcificação foi reduzida de forma significativa sem alteração estrutural da matriz colágena²⁴. O etanol a 80% também foi utilizado com esta finalidade em heteroenxertos pulmonares porcinos, implantadas em posição pulmonar de ovinos por 210 dias. Ocorreu importante redução da calcificação das cúspides, porém não houve o mesmo efeito na parede aórtica porcina devido ao maior teor de elastina na parede aórtica²⁵.

Na tentativa de melhorar o resultado na parede aórtica, o cloreto de alumínio (AlCl₃) foi associado. O AlCl₃ altera a estrutura da elastina e se liga ao fosfato além de inibir a atividade da fosfatase alcalina. Em associação com etanol, o AlCl₃ foi testado em fragmentos de cúspides e parede aórtica porcinas em implantes em ratos e em enxertos em posição mitral de ovelhas, conseguindo-se com isso redução na calcificação da parede e cúspide aórtica porcina, porém

observou-se que o contato do alumínio com a cúspide aumenta a calcificação da mesma²⁶. Nesta mesma linha, estudo realizado na PUCPR foi analisado se o $AlCl_3$ apresenta melhor efeito anticalcificante isolado ou em associação com etanol em parede aórtica porcina em modelo subcutâneo de ratos. A combinação dos tratamentos proporcionou menor calcificação com menos inflamação do tecido do que o seu uso isolado²⁷. Outro estudo realizado em nossa instituição teve por objetivo encontrar outro método eficaz tanto para cúspide quanto à parede aórtica porcina. Experimentou-se o ácido L-glutâmico em comparação com o etanol em modelo de ratos. O ácido L-glutâmico se liga aos aldeídos residuais do GDA, inibindo seus efeitos tóxicos. Neste estudo, apenas uma leve atenuação na calcificação da parede aórtica foi observada, porém sem efeito nas cúspides²⁸. Por outro lado, o ácido L-glutâmico em pericárdio bovino, em concentrações e pH diferentes em modelo subcutâneo de ratos em até 60 dias, foi eficaz em reduzir a calcificação principalmente quando utilizado na concentração de 0,8% e em pH ácido²⁹.

O efeito do calor também foi avaliado como método anticalcificante. O aumento da temperatura causa desnaturação das proteínas e fosfolípidos envolvidos nos processos de calcificação. Pericárdio bovino e tecido valvar porcino submetidos a temperaturas de 37 a 70 graus Celsius de 2 a 12 semanas, implantados em posição mitral de ovinos por cinco meses e em ratos por três meses, demonstraram redução na calcificação nos dois tecidos em ambos os modelos testados³⁰.

Foi suposto que a radiação gama poderia alterar a conformação espacial da fosfatase alcalina inibindo sua atividade enzimática, interferindo assim na calcificação. Foi avaliado o comportamento mecânico e a calcificação do pericárdio bovino fixado em GDA submetido a várias doses de irradiação gama. Isto resultou em alteração importante na resistência do tecido e aumento na calcificação após quatro meses de implante em ratos³¹.

Da mesma forma que o ácido L-glutâmico, o ácido amino-oléico se liga aos grupos aminos residuais do GDA, com isso diminuindo o efeito tóxico e conseqüentemente os focos de calcificação. A parede aórtica de heteroenxertos porcinos tratados com ácido amino-oléico, implantados em ratos por 60 dias, apresentou redução na concentração de cálcio³². Este resultado foi comprovado

no modelo circulatório, em posição mitral, confirmando o poder anticalcificante do método³³.

Além de todos esses métodos, algumas substâncias foram estudadas com mecanismos diversos de ação. Dentre estas podemos citar o tratamento do pericárdio com ácido tânico que foi testado em implante em ratos e demonstrou efeito anticalcificante por diminuir a reação inflamatória, com menor expressão de metaloproteinases tenacina c e macrófagos³⁴. Outras substâncias com possíveis efeitos anticalcificantes foram testadas de forma isolada e sequencial em ratos, para avaliar possível efeito sinérgico em pericárdio bovino. Foram testados: temperatura de 50°, éter dietílico, quitosana, heparina, brometo de sódio e formaldeído a 4%. Houve redução da calcificação com todos os tratamentos isolados, exceto com a quitosana, porém houve sinergismo quando do uso sequencial destas substâncias³⁵.

Todos esses tratamentos estudados apresentaram resultados nos modelos experimentais, com eficiência variável e a efetividade na prática clínica nem sempre foi observada. Pela necessidade de um método que atue em todos os tecidos, independente da estrutura, o processo de descelularização tem sido empregado. O objetivo da descelularização é remover o material nuclear e celular, principal foco de calcificação, causando mínimos efeitos adversos na composição, atividade biológica e integridade mecânica da matriz extracelular. Os métodos mais comuns de descelularização envolvem uma combinação de métodos químicos, físicos e enzimáticos. Os métodos físicos incluem congelamento, pressurização, sonificação e agitação. Estes métodos rompem as células, liberam o conteúdo e facilitam a remoção por outros agentes. Os métodos químicos incluem bases e ácidos, detergentes iônicos (SDS) e não iônicos (Triton x 100). Os métodos enzimáticos incluem tripsina e nucleases. As enzimas removem ou separam o material celular da matriz extracelular. Os detergentes não iônicos rompem interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, mas não rompem proteína-proteína. Os detergentes iônicos solubilizam o citoplasma e membrana celular e tendem a desnaturar as ligações proteína-proteína. O SDS é muito efetivo em remover componentes celulares. Normalmente uma completa descelularização requer combinação de métodos físicos químicos e enzimáticos³⁶.

Vários autores estudaram os diferentes métodos e efeitos da descelularização nos tecidos biológicos. Layland *et al*, estudaram os efeitos do

método enzimático de descélularização com tripsina na matriz extracelular de tecidos. Observaram que as alterações estruturais, mecânicas e eficiência em remover células foi tempo dependente. Com tempo prolongado ocorre remoção do colágeno insolúvel e mais glicosaminoglicanos levando ao enfraquecimento da matriz³⁷.

Liao *et al*, compararam os impactos da descélularização em cúpides porcinos utilizando o detergente não iônico triton x 100, iônico SDS e enzimático com tripsina. Através de microscopia eletrônica observaram que existe rotura na rede de colágeno com os três processos abordados. O SDS foi o que melhor manteve as propriedades mecânicas e micro-estruturais da matriz, formando poros menores. Isto pode ser um empecilho ao repovoamento celular podendo levar a matriz à degeneração com o tempo. Todos os métodos estudados removeram de forma completa os componentes celulares³⁸.

Rieder *et al*, em estudo semelhante compararam três métodos de descélularização utilizando tripsina, SDS e triton x 100 associado a deoxicolato de sódio em xenoenxertos porcinos. Observaram descélularização incompleta no protocolo com tripsina. Já, nos outros dois métodos houve descélularização completa, porém o SDS foi citotóxico nos testes de rescelularização *in vitro*³⁹.

Wilcox *et al*, estudaram a biocompatibilidade de heteroenxertos descélularizados com SDS e tripsina *in vitro*. Em contato com células cultivadas, não houve inibição do crescimento. Concluíram que a matriz descélularizada foi biocompatível, não apresentando citotoxicidade com potencial de rescelularização⁴⁰.

Oswal *et al*, analisaram as propriedades biomecânicas e citotóxicas do pericárdio bovino, descélularizado com SDS e fixado em GDA em diferentes concentrações. O pericárdio bovino descélularizado estava completamente livre de células pela análise histológica e manteve suas propriedades biomecânicas e a arquitetura da matriz intacta após o processo, porém apresentou citotoxicidade mesmo quando se utilizaram concentrações menores de GDA⁴¹.

Diferentes métodos de descélularização de pericárdio bovino foram testados e analisados, quanto à remoção de células e proteínas estruturais que funcionam como antígenos. Somente o tratamento com SDS foi capaz de remover completamente as células e proteínas estruturais que são os principais xenoantígenos do pericárdio bovino. A ausência de células não elimina por

completo a antigenicidade do tecido. O SDS foi o tratamento mais eficaz em remover tais antígenos⁴².

O efeito anticalcificante da descelularização foi analisado nos diferentes tipos de tecidos utilizados para confecção de biopróteses. Costa *et al*, compararam o pericárdio bovino comercial *versus* descelularizado quanto às propriedades físicas, durabilidade e capacidade de induzir atividade inflamatória em modelo experimental em ratos. O pericárdio foi descelularizado com uso de bases e então fixado em GDA. Após análise histológica, teste de tração e deformação e avaliação hidrodinâmica, não houve diferença nas propriedades físicas e mecânicas nem no infiltrado inflamatório e presença de granuloma. No experimento não foi observado calcificação⁴³.

Flameng *et al*, estudaram dois modelos diferentes de próteses de pericárdio bovino descelularizado com *tween* 80, em posição mitral de carneiros por cinco meses. Estes autores encontraram valores extremamente baixos de cálcio comprovando a efetividade do método empregado⁴⁴.

Elkins *et al*, avaliaram a descelularização em homoenxertos humanos, homoenxertos pulmonares de ovinos. Testes *in vitro* mostraram manutenção das características biomecânicas e de resistência dos tecidos. Os homoenxertos implantados em carneiros apresentaram boa performance através de análise ecocardiográfica. Análise histológica dos implantes mostrou rescelularização do enxerto por células do hospedeiro. Na análise clínico – laboratorial, dos pacientes submetidos à implante de homoenxertos descelularizados, observaram manutenção do painel de reatividade de anticorpos estável, sugerindo que o processo de descelularização removeu antígenos celulares⁴⁵.

Dohmen *et al*, avaliaram a capacidade de rescelularização de matrizes porcinas descelularizadas com ácido deoxicólico. Estas matrizes foram semeadas com células endoteliais extraídas da veia jugular ou safena porcinas e então implantadas em carneiros jovens em posição pulmonar por 3 e 6 meses. Após explantados, estes enxertos apresentavam ausência de calcificação nas cúspides, com evidências do efeito protetor do endotélio⁴⁶.

Visscher *et al*, demonstraram que pericárdio bovino descelularizado e fixado pelo método de foto-oxidação, foi passível de rescelularização intra-peritoneal em ovinos, demonstrando ausência de toxicidade desse processo. Estes tecidos foram implantados em posição pulmonar de ovinos. Apresentaram

funcionalidade durante o período de estudo, porém com retração das cúspides do tecido reendotelizado. Esta análise demonstrou que a descelularização associada a métodos alternativos de fixação, evita a toxicidade permitindo a aderência de células do receptor. Não foi observado aumento na calcificação comparada com enxertos não implantados⁴⁷.

Costa *et al*, avaliaram o comportamento funcional de homoenxertos criopreservados e heteroenxertos porcinos descelularizados com ácido deoxicólico, implantado em posição pulmonar de ovinos. Após 150 dias de implante observaram boa funcionalidade dos homoenxertos e heteroenxertos. Nos enxertos descelularizados as cúspides estavam bem preservadas e sem sinais de degeneração ou calcificação. A matriz estava preservada com repopulação por fibroblastos e células endoteliais. O conteúdo de cálcio foi maior nos homoenxertos criopreservados⁴⁸. Lopes *et al*, nesta mesma linha compararam heteroenxertos porcinos descelularizados com homoenxertos criopreservados, em modelo circulatório de ovinos por 280 dias. Observaram preservação da matriz descelularizada, repovoamento por células do animal e ausência de calcificação⁴⁹.

Bastian *et al*, demonstraram *in vitro* que heteroenxertos porcinos descelularizados são capazes de ativar o sistema imune levando a formação de anticorpos e ativação da via clássica do complemento. Este processo leva a deposição de polimorfonucleares no tecido. Isto poderia explicar a falência do tecido descelularizado observada em crianças⁵⁰.

Hopkins *et al*, compararam homoenxertos descelularizados com homoenxertos criopreservados, em implantes realizados em carneiros durante o período de um ano. Foram avaliadas a função, durabilidade e calcificação. Os homoenxertos descelularizados apresentaram boa funcionalidade em um ano com ausência de calcificação dos folhetos, já os homoenxertos criopreservados apresentaram disfunção por franca calcificação dos folhetos⁵¹.

O SDS vem sendo utilizado no tratamento anticalcificante das biopróteses Hancock II, desde 1982. Este visava a remoção de fosfolípidos e não descelularização, porém o seguimento de 15 anos desta prótese mostrou sobrevida livre de disfunção estrutural em pacientes com mais de 60 anos em 96% na posição aórtica e em 88% na posição mitral⁵².

Bottio *et al*, analisaram 22 próteses Hancock II explantadas devido a reoperações. Foi analisada a patologia responsável pela falência destas próteses, em especial a calcificação distrófica. Desta análise observaram redução significativa na calcificação distrófica e a falência deveu-se, na maioria dos casos, por rotura devido ao dano mecânico. Foi observado um influxo tardio de lipídeos nas cúspides, acarretando um processo de degeneração semelhante à aterosclerose⁵³.

3 MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

Foram utilizados 16 carneiros jovens da raça Soulfok, com idade de 14 ± 2 semanas (mín = 12 e máx = 16) e peso de 24 ± 3 kg (mín = 20 e máx = 30), divididos em dois grupos de oito animais cada. Nos animais do grupo GDA (Grupo controle) foram implantados tubos valvados de pericárdio bovino fixados em GDA 0,5% e nos do grupo DESC (Grupo Descelularizado), tubos valvados de pericárdio bovino descelularizados com SDS e posteriormente fixados em GDA 0,5%. Em ambos os grupos, os tubos valvados foram implantados de forma ortotópica, na via de saída do ventrículo direito, substituindo a valva pulmonar e a porção inicial do tronco da artéria pulmonar. Os animais foram acompanhados por um período de 180 dias, quando foi realizado o explante dos enxertos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Animais, sob protocolo N° 263, com parecer N° 173/07 CEUA PUCPR em 03/10/07.

3.2 PREPARO DO ENXERTO

3.2.1 Obtenção dos Pericárdios Bovinos

Os pericárdios bovinos foram coletados em abatedouros da região metropolitana de Curitiba - PR, supervisionados pelo Serviço de Inspeção Federal. Após a coleta os pericárdios foram transportados até as dependências do Laboratório de Engenharia e Transplante Celular da PUCPR, em solução salina fisiológica a 4°C, onde foi feita a dissecação de toda a gordura pericárdica sob fluxo laminar (Trox Brasil, FLU CL1). Em seguida, foram imersos em meio nutriente Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma®) contendo antibióticos (cefoxitina 240µg/ml, lincomicina) 120µg/ml, polimixina B 100µg/ml e vancomicina 50µg/ml) por 24 horas, seguindo protocolos semelhantes aos empregados na produção comercial de próteses valvares.

3.2.2 Preparo dos Heteroenxertos Fixados em GDA

Os pericárdios bovinos, após o processo de descontaminação, foram fixados em solução de GDA 0,5% por 72 horas, também seguindo as rotinas utilizadas pela Cardioprótese LTDA no preparo de tecidos para confecção de próteses cardíacas. Com o tecido já fixado, foram construídos tubos valvados de 21 mm em diâmetro, contendo uma valva com três folhetos, posicionada na porção inferior do tubo, os quais foram armazenados em solução tamponada de metil paraben até o momento do implante (Figura 1).

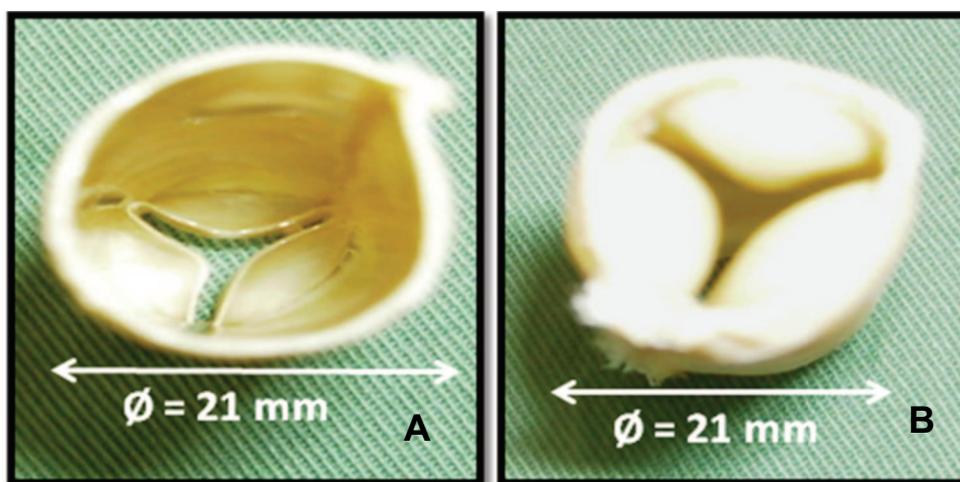


Figura 1. A - tubo de pericárdio demonstrando os três folhetos da valva suturados na porção proximal; B - aspecto macroscópico externo dos tubos valvados

3.2.3 Preparo dos Heteroenxertos Descelularizados

Neste grupo, os pericárdios, uma vez descontaminados, foram submetidos ao processo de descelularização com SDS 0,1% segundo tecnologia desenvolvida e patenteada na PUCPR (pedido de patente Brasileira: PI 800603-2).

Um segmento do tecido descelularizado foi encaminhado para análise histológica com HE para comprovação da efetividade da descelularização (Figura 2). Após isso, foram fixados em GDA 0,5%, sendo o restante do processo semelhante ao do Grupo Controle.

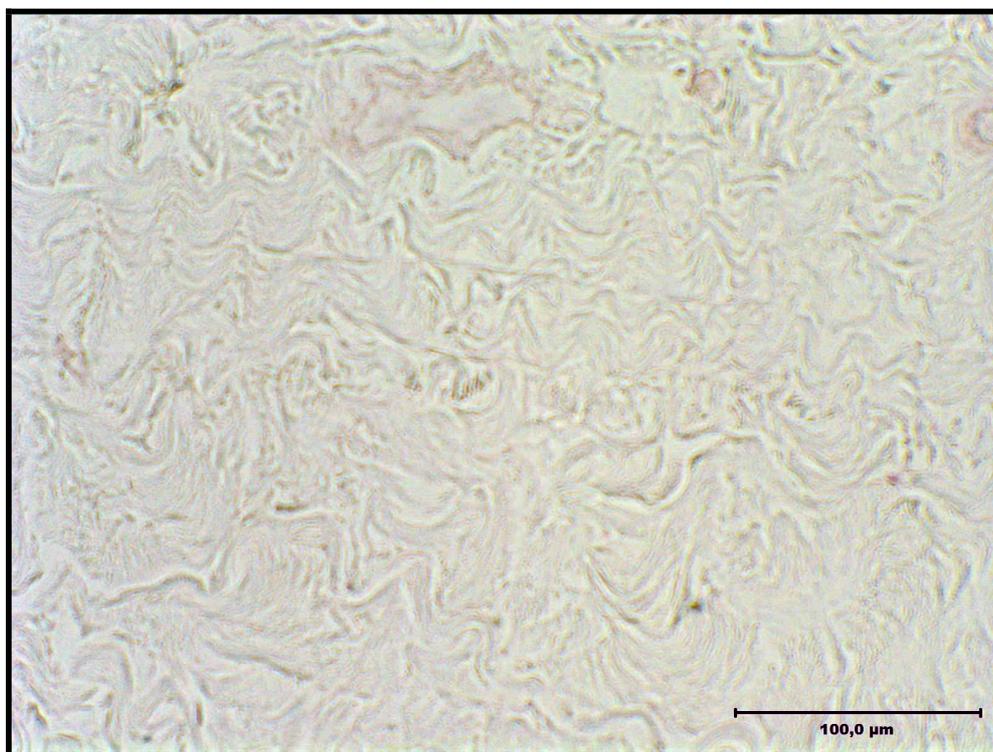


Figura 2. Fotomicrografia do controle histológico de pericárdio bovino após processo de descelularização, evidenciando ausência completa de células e boa preservação da matriz extracelular (HE 100X)

3.3 PRÉ-OPERATÓRIO

Os animais foram admitidos no Hospital Veterinário, sendo submetidos à avaliação clínica e pesagem. Foram realizados os seguintes exames laboratoriais: hematócrito e dosagem de hemoglobina, ferro sérico, eletrólitos sanguíneos e

parasitológico de fezes. Foram aceitos somente animais saudáveis vacinados contra Clostridium C e D e toxóide tetânico. Adicionalmente, foi administrado por via intravenosa, Levamisol (Ripercol®, Cyanamida) 7,5 mg/Kg e Ivermectina (Ivomec®, Merck) 200µg/Kg por via intramuscular para prevenção de infecção parasitária. Após atingirem peso mínimo de 20 Kg, hematócrito de 30% e estarem adequadamente imunizados e desverminados, os animais foram liberados para a operação. Todos ficaram em jejum pré-operatório de 36 horas para sólidos e 12 horas para líquidos. Na véspera da operação foi feita a medicação antibiótica profilática com cloridrato de ceftiofur 1 mg/kg (Excenel® RTU, Pfizer) e sulfato de gentamicina 4 mg/kg (Gentocin®, Schering-Plough).

3.4 ANESTESIA E PREPARO CIRÚRGICO

Na sala cirúrgica, foi realizada tricotomia torácica à esquerda e puncionada a veia cefálica do membro anterior esquerdo e cateterizada a artéria dorsal da orelha para monitorização invasiva da pressão arterial. Foi feita a monitorização contínua com eletrocardiograma de cinco canais e da saturação arterial de oxigênio com oxímetro de pulso colocado na língua do animal (Figura 3).



Figura 3. Fotografia demonstrando a monitorização do carneiro na sala cirúrgica

A medicação pré-anestésica consistiu de Diazepan® 0,5 mg/Kg (Nova Química-Sigma Pharma) e tartarato de butorfanol 0,4mg/Kg (Turbogesic®, Forte Dodge). Neste tempo, foi reforçada a dose profilática de antibiótico, por via intravenosa com cefitiofur 1mg/kg e sulfato de gantamicina 4 mg/kg e coletada uma amostra de sangue para controle do hematócrito e dos eletrólitos sanguíneos.

A indução anestésica foi feita com 4mg/Kg de propofol (Diprivan®, Astra Zeneca), seguida de intubação orotraqueal com sonda de 7 mm com balonete. O oxigênio foi provido por um circuito fechado de oxigenação com ventilação por pressão positiva intermitente através de respirador a volume oxigel 1722 (Oxigel Mats. Hosps. Ind. e Com. Ltda®), com frequência respiratória de 12 a 15 ventilações por minuto com fração inspirada de oxigênio de 60% e a manutenção anestésica realizada com propofol (Diprivan®, AstraZeneca) 0,6mg/Kg/min através de bomba de infusão peristáltica rotativa (MP-20®, CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos). Para diminuir a dor pós-operatória, foi feito bloqueio anestésico intercostal com 12 ml de cloridrato de bupivacaína a 0,5% (Marcaina® 0,5%, AstraZeneca do Brasil) nos segundo, terceiro e quarto espaços intercostais, imediatamente antes do início do procedimento cirúrgico. Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito.

3.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no centro cirúrgico do Hospital Veterinário para animais de pequeno e médio porte no Campus II - PUCPR. Foi realizada uma toracotomia lateral esquerda no 4º espaço intercostal. O pericárdio foi incisado longitudinalmente para expor o átrio direito e artéria pulmonar. Neste momento foi injetado 1 mg/kg de cloridrato de lidocaína (Xylocaina® 2%, AstraZeneca do Brasil) e 200 U/kg de heparina sódica (Liquemine®, Roche Química e Farmacêutica).

A aorta torácica descendente foi canulada logo abaixo da origem da artéria subclávia com cânula arterial 18 Fr (Braile Biomédica) e o átrio direito com cânula venosa de estágio único 32 ou 34 Fr (Braile Biomédica).

A CEC foi feita em normotermia com um sistema de rolete e oxigenador de membrana pediátrico (Biomédica ECO-1, Braile Biomédica), mantendo um fluxo de 2 a 2,3 l/min . Os procedimentos foram realizados sem pinçamento da aorta e com o coração batendo

Foi realizada a secção transversa da artéria pulmonar e ressecada as cúspides pulmonares nativas. A via de saída do ventrículo direito foi reconstruída com implante de tubo valvado de pericárdio bovino selecionado, com suturas contínuas de fios de polipropileno 4.0 (Prolene 4.0[®], Ethicon), em sua porção proximal e distal (figura 4). Terminado o implante valvar, a circulação extracorpórea foi descontinuada. Após revisão da hemostasia, as costelas foram aproximadas com pontos de fio de polipropileno 2 (Prolene 2[®], Ethicon), a musculatura e o tecido celular subcutâneo com poliglactina 910 (Vicryl 1[®], Ethicon) e a pele com mononylon 3.0 (Mononylon 3.0[®], Ethicon). O dreno torácico foi mantido em aspiração contínua até sua remoção logo após a extubação.

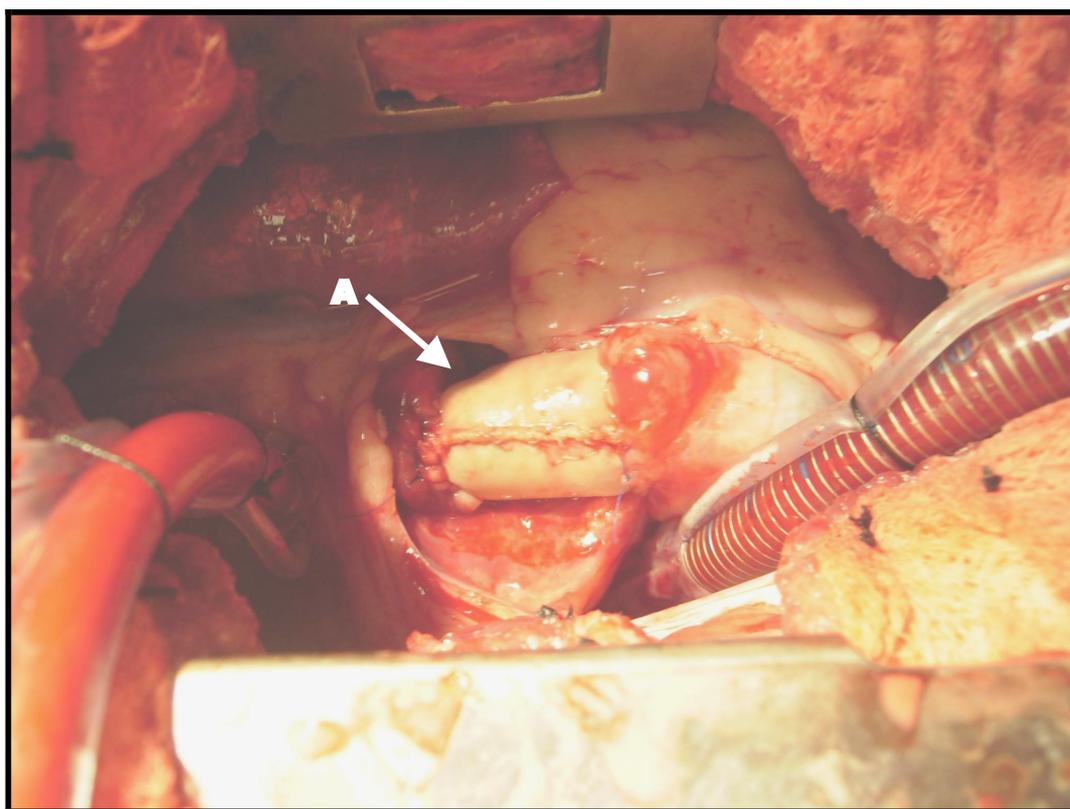


Figura 4. Fotografia demonstrando aspecto final da operação (A = tubo valvado de pericárdio bovino descelularizado reconstruindo a via de saída do ventrículo direito)

3.6 PÓS-OPERATÓRIO

Os animais permaneceram por 24h no Hospital Veterinário onde receberam analgesia com flumexil meglumine (Banamine®, Shering Plough) 1,5mg/Kg endovenoso e cuidados pós-operatórios. A avaliação da dor foi realizada subjetivamente através da observação de claudicação do membro anterior esquerdo, ingestão de alimentos e permanência com o grupo. Após, foram encaminhados para o Hospital Veterinário na Fazenda Gralha Azul - PUCPR, onde ficaram confinados com alimentação adequada. Realizaram-se exames laboratoriais de controle, mantida antibioticoterapia com ceftiofur (Ceftiofur Exenel®, Pfizer) 1mg/Kg ao dia e gentamicina (Gentamicina®, Neo-química) 4mg/Kg de 12/12 horas cinco dias.

3.7 EUTANÁSIA

Os animais foram submetidos à eutanásia com 180 dias de evolução após o procedimento operatório. Os procedimentos foram feitos no mesmo centro cirúrgico em condições assépticas. Foi realizada tricotomia torácica lateral esquerda e acesso venoso em membro anterior esquerdo. Após ser feita medicação pré-anestésica com cloridrato de ketamina (Vetarnecol®, Konig) 12mg/Kg, foi feita a intubação orotraqueal e anestesia inalatória com halotano (Fluothane®, AstraZeneca) a 2% com ventilação mecânica. Realizada toracotomia lateral esquerda no 4º espaço intercostal e heparinização plena com 250U/Kg de heparina (Liquemine®, Roche).

Após a abertura do pericárdio, foram avaliados o aspecto macroscópico externo do tubo valvado e o grau de aderência ao redor do enxerto. Em seguida foi feita a dissecação das aderências e antes do explante definitivo do enxerto, foi administrado 40 mEq de cloreto de potássio endovenoso. Procedeu-se, então, a retirada do tubo valvado para análise macroscópica e documentação fotográfica.

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

3.8 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO

3.8.1 Análise Ecocardiográfica

Os animais foram submetidos a exames ecocardiográficos (SONOS 5500, PHILIPS) realizados no Departamento de Cirurgia Experimental da PUCPR. Os exames foram feitos na evolução tardia, com 7 a 10 dias antes do explante dos enxertos. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) diâmetro interno do tubo;
- b) gradiente transvalvar instantâneo máximo e médio;
- c) velocidade instantânea máxima e média de fluxo por análise de *Doppler* contínuo e pulsado.

3.8.2 Análise Macroscópica

Durante o explante foram analisadas as aderências em torno dos enxertos, sendo classificadas em leve, moderada e intensa de acordo com a facilidade de dissecação dos órgãos adjacentes. Em seguida a peça foi explantada e foi feita inspeção macroscópica da valva observando-se:

- a) consistência do enxerto (mole /duro);
- b) mobilidade do folheto (móvel/ imóvel);
- c) existência e distribuição de áreas de calcificação no conduto e no folheto (evidente/ pouco evidente);
- d) presença de trombos (presente/ ausente);
- e) presença de vegetação (presente/ ausente).

A documentação fotográfica foi obtida com máquina digital (Sony Cyber-Shot® 5.1).

3.8.3 Análise Radiológica

Todas as peças após explantadas foram submetidas à exame radiográfico pela técnica de mamografia utilizando o aparelho Mammomat C3 da Siemens.

Foram realizadas radiografias com a peça inteira em corte axial e sagital para a observação de pontos de calcificação, sua localização e extensão da área calcificada.

3.8.4 Preparo dos Segmentos Valvares

Posteriormente à análise macroscópica, as valvas foram divididas por meio de secção longitudinal ao nível das comissuras, em três segmentos compostos por folhetos e conduto, para serem encaminhadas respectivamente à microscopia ótica e quantificação de cálcio por absorção atômica. Para aferição do cálcio foi selecionada a cúspide e o segmento do conduto, mais calcificado (Figura 5). Para a análise histológica foi selecionado um segmento de cúspide e conduto. Os segmentos menos calcificados foram submetidos à congelamento para posterior análise se necessário.

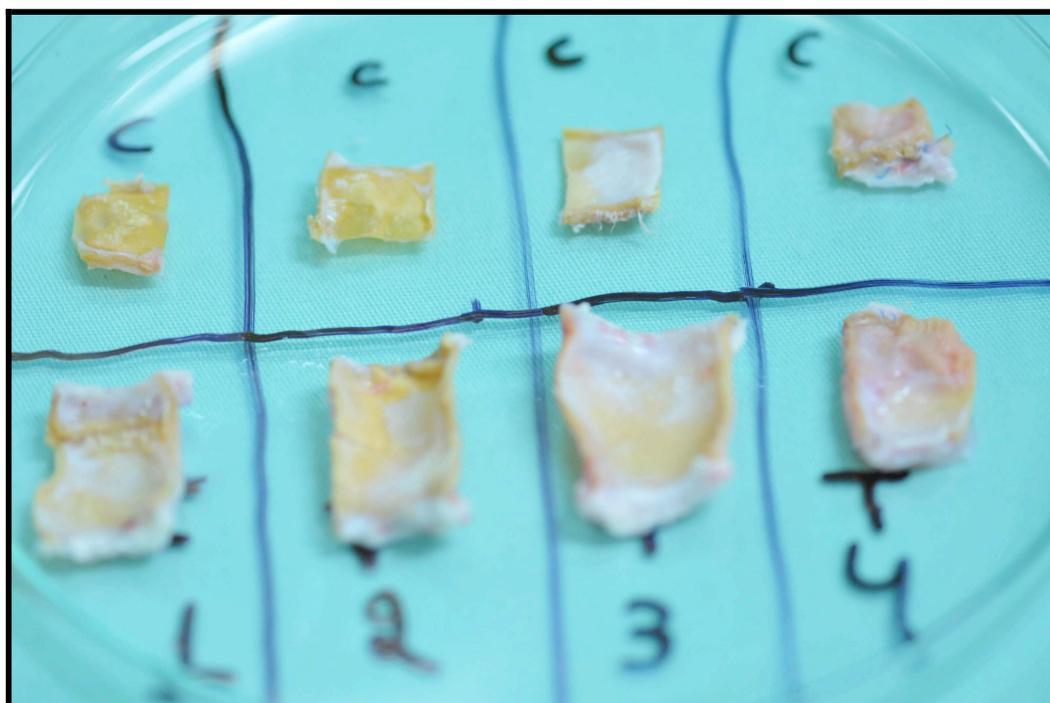


Figura 5. Fotografia dos segmentos de conduto (inferior) e de folheto (superior) separados para aferição do cálcio por espectrometria de absorção atômica.

3.8.5 Análise de Cálcio

A quantidade de cálcio foi medida através de espectrometria por absorção atômica e expressada em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco de tecido analisado. Foram divididos em folheto e conduto. Após a separação do conduto e folheto, estes foram desidratados à 60°C por 24 horas e pesados. Os segmentos foram triturados com lâmina de bisturi em fragmentos menores e mantidos em HCl 6N por 72 horas à temperatura de 60°C . As amostras hidrolisadas foram enviadas ao LACTEC (Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento – PR) para a análise de quantificação de cálcio por espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (PERKIN ELMER, 4100).

3.8.6 Análise Histológica

Para a análise histológica, um segmento da parede do tubo com o folheto ainda inserido, foi embocado de maneira a permitir um corte de perfil, mostrando a continuidade da cúspide com sua inserção no conduto. Esse segmento foi fixado em formalina 10%, sendo, em seguida, preparados os blocos de parafina e realizados cortes de $4\mu\text{m}$ de acordo com as técnicas convencionais de embocamento. Os cortes foram então corados com Hematoxilina-Eosina para avaliar distribuição celular e a presença de infiltrado inflamatório, Alizarina Red pH 4,2 e 7,0 para análise da calcificação através dos cristais de fosfato de cálcio e oxalato de cálcio respectivamente, e pentacrômico de Russel-Movat's para avaliação da distribuição e arquitetura da matriz extracelular.

3.8.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrão. Para a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas foi considerado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

4 RESULTADOS

4.1 EVOLUÇÃO CLÍNICA

Não houve óbitos imediatos, entretanto, quatro animais (dois em cada grupo) faleceram na evolução tardia, antes da data programada para o explante. Dois animais faleceram em decorrência de endocardite bacteriana no tubo valvado, ambos já no primeiro mês de evolução. Um animal morreu por hemorragia no enxerto no 2º dia pós-operatório e o outro, secundário a infecção abdominal por rotura do abomaso na 2ª semana. Todos os óbitos foram verificados por necropsia e excluídos do estudo.

Os demais animais tiveram evolução clínica satisfatória, com ganho pondero-estatural adequado, sendo o peso final dos animais de $43 \pm 5,6$ Kg (mín = 38, Max =49).

4.2 ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA

Os resultados dos ecocardiogramas transtorácicos, realizados na semana que antecedeu aos explantes, estão demonstrados na Tabela 1.

Em três animais de cada grupo não foi possível a avaliação ecocardiográfica em decorrência da falta de transdutor adequado para o tamanho dos animais. Apesar de não ser possível fazer uma análise estatística em decorrência do pequeno número de animais, as velocidades de fluxo e os gradientes transvalvares do grupo GDA foram maiores do que os do grupo DESC.

Tabela 1- Dados ecocardiográficos obtidos na evolução tardia

VARIÁVEL	GRUPO	n	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO
Diâmetro	Controle	3	1,7	1,7	1,6	1,9	0,15
	Estudo	3	1,8	1,8	1,7	1,9	0,11
Δp máx.	Controle	3	58	62,1	41,5	70,9	15,09
	Estudo	3	30	30,7	23,6	35,8	6,13
Δp méd.	Controle	3	34	33,8	24,4	45,6	10,62
	Estudo	3	19	20,5	12,8	23,7	5,60
Velocidade máx.	Controle	3	3,7	3,9	3,2	4,2	0,51
	Estudo	3	2,7	2,7	2,4	2,9	0,28
Velocidade méd.	Controle	3	2,8	2,9	2,3	3,1	0,43
	Estudo	3	2,0	2,1	1,5	2,3	0,40

Δp máx : gradiente máximo e Δp min: gradiente mínimo

4.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Houve nítida diferença nas aderências pós-operatórias entre os grupos. Em todos os animais do grupo GDA, as aderências foram intensas, com marcada reação inflamatória ao redor dos enxertos, havendo dificuldades para a sua dissecação durante o explante. Já no grupo DESC as aderências foram frouxas, havendo um plano de dissecação mais evidente (Figura 6).

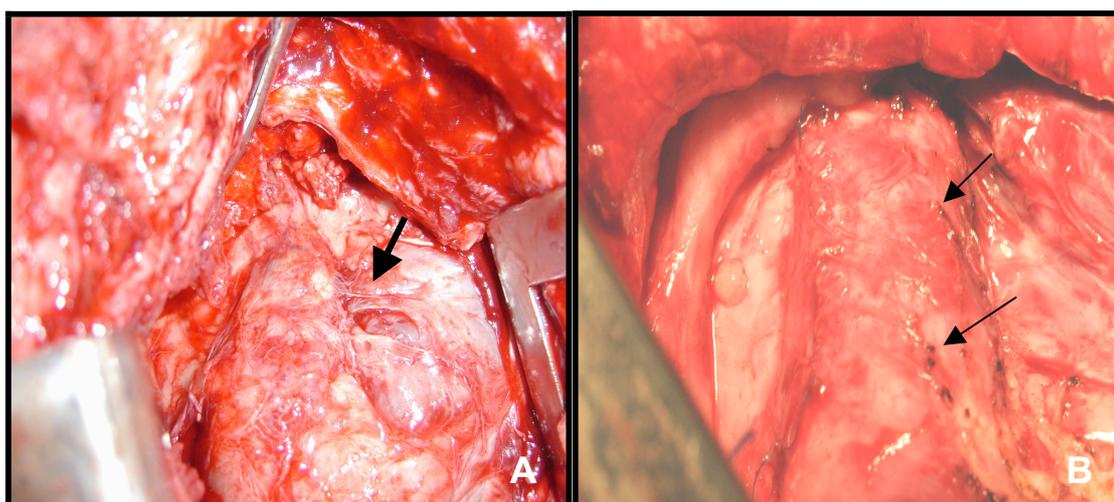


Figura 6. Análise macroscópica dos tubos valvados durante a operação para o explante(A = tubo valvado GDA, com intensas aderências ao redor do enxerto (seta); B = tubo valvado DESC com aderências frouxas e de fácil dissecação (setas)

Pela palpação, os enxertos do grupo controle eram bastante endurecidos, especialmente nas linhas de sutura. Apesar disso, não se visualizava sinais macroscópicos de calcificação grosseira. Por outro lado, os tubos de tecido descelularizado apresentavam consistência mole, sendo mais abundantemente recobertos por *pannus*.

Após o explante, as peças foram abertas longitudinalmente, e pode-se verificar que no grupo controle, as cúspides estavam sempre bastante calcificadas e imóveis, enquanto que as paredes dos condutos tinham calcificação menos acentuada. Já no grupo DESC, as cúspides eram móveis, sem calcificações grosseiras, e a parede dos condutos também se mostrava bem preservada. (Figura 7 – A e B).

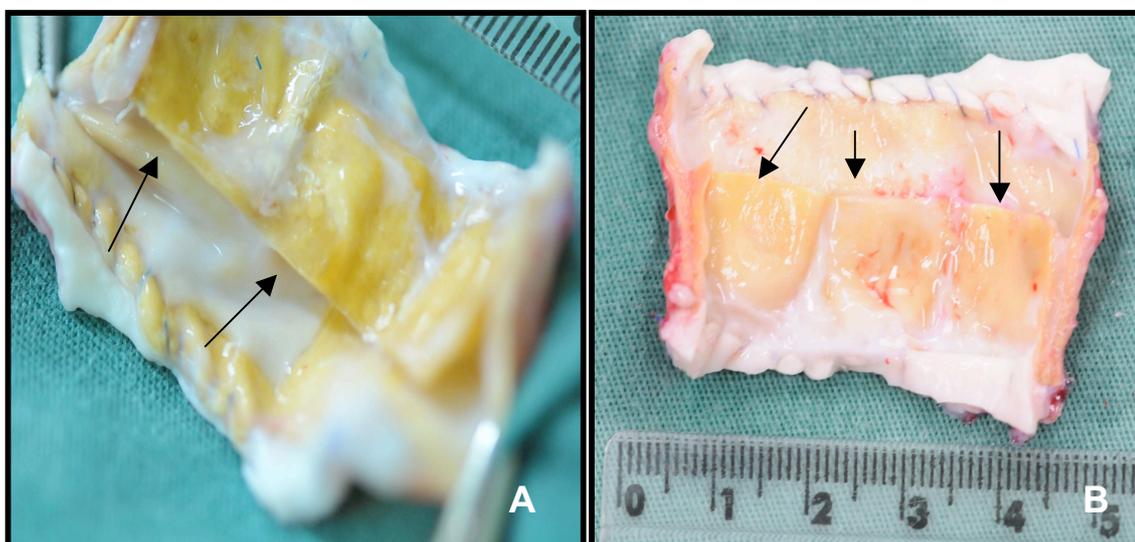


Figura 7. Aspecto macroscópico dos enxertos após secção do conduto. A = tubo valvado GDA com cúspides calcificadas (setas); B = tubo valvado DESC com cúspides preservadas sem calcificação grosseira (setas)

Não foram observados trombos ou vegetações em nenhum caso. Na Figura 8, todas as peças explantadas estão demonstradas para comparação visual.

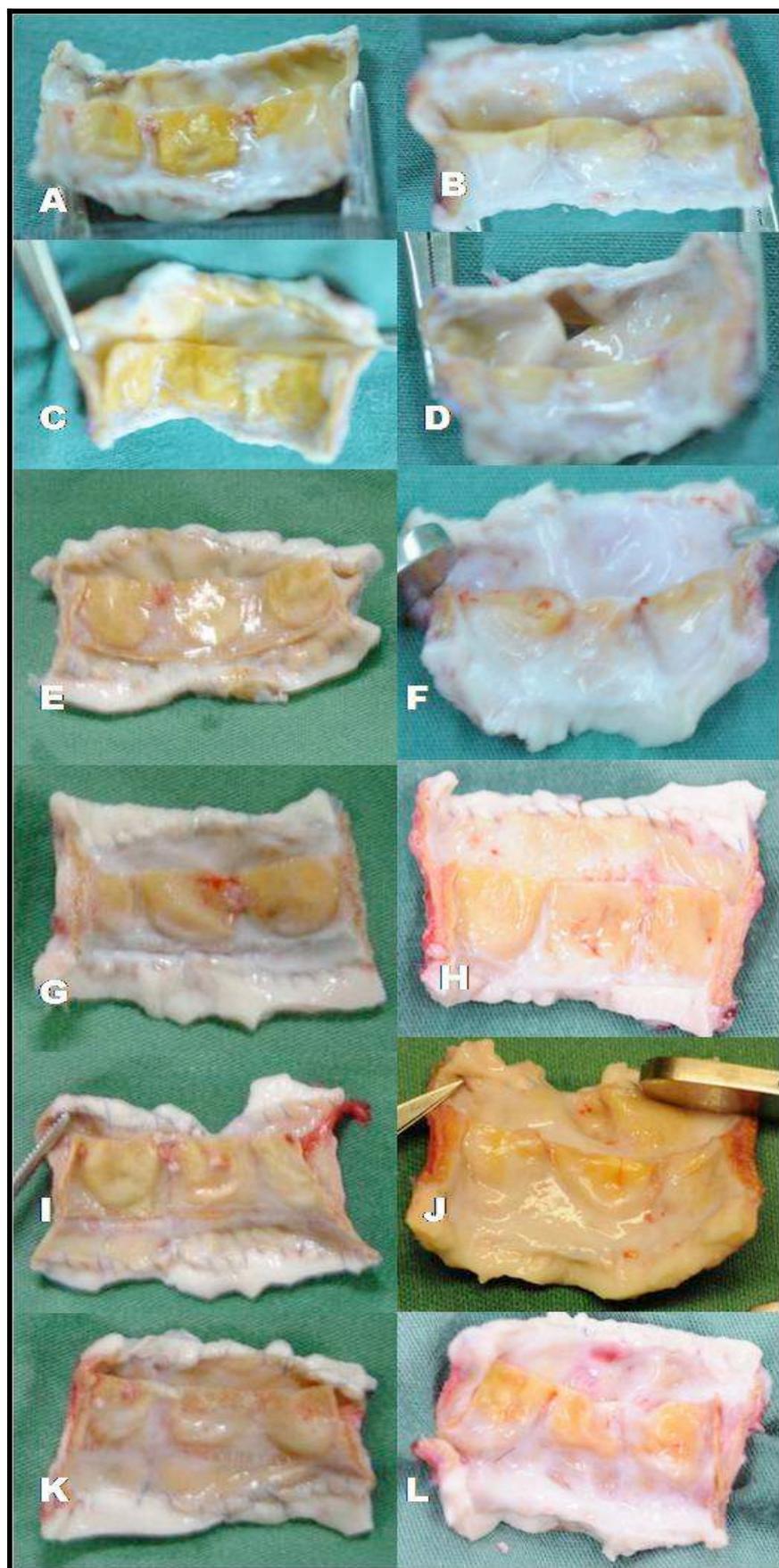


Figura 8. Fotos dos tubos valvados explantados após 180 dias (A,C,E,G,I e K = grupo GDA; B,D,F,H, J e L = grupo DESC)

Os resultados individuais da análise macroscópica e palpação estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise macroscópica dos enxertos explantados

PARÂMETROS AMOSTRAS	CONSISTÊNCIA DO TUBO/FOLHETO		MOBILIDADE DO FOLHETO	CALCIFICAÇÃO TUBO/FOLHETO		TROMBO	VEGETAÇÃO
Controle 1	mole	Duro	Imóvel	Pouco evidente	evidente	Ausente	Ausente
Controle 2	mole	Duro	Imóvel	Pouco evidente	evidente	Ausente	Ausente
Controle 3	mole	Duro	Imóvel	Pouco evidente	evidente	Ausente	Ausente
Controle 4	mole	endurecida	Pouco móvel	Pouco evidente	evidente	Ausente	Ausente
Controle 5	mole	Duro	Imóvel	Pouco evidente	evidente	Ausente	Ausente
Controle 6	mole	Duro	Imóvel	Pouco evidente	evidente	Ausente	Ausente
Desc 1	mole	Mole	móvel	Pouco evidente	Pouco evidente	Ausente	Ausente
Desc 2	mole	Mole	móvel	Pouco evidente	Pouco evidente	Ausente	Ausente
Desc 3	mole	Mole	móvel	Pouco evidente	Pouco evidente	Ausente	Ausente
Desc 4	mole	Mole	móvel	Pouco evidente	Pouco evidente	Ausente	Ausente
Desc 5	mole	Mole	móvel	Pouco evidente	Pouco evidente	Ausente	Ausente
Desc 6	mole	Mole	móvel	Pouco evidente	Pouco evidente	Ausente	Ausente

4.4 ANÁLISE RADIOLÓGICA

Pela análise radiográfica dos enxertos nas incidências sagital e axial, pudemos observar no Grupo Controle, calcificação intensa das cúspides, já nos condutos, observamos apenas pontos focais de calcificação distribuídos próximos às linhas de sutura e regiões comissurais. Ao contrário, nos enxertos do grupo DESC não foi observado calcificação nem dos folhetos, nem dos condutos, apenas pontos focais de calcificação nas linhas de sutura proximal e distal e nas suturas das cúspides ao tubo. Estes achados podem ser observados na Figura 9.

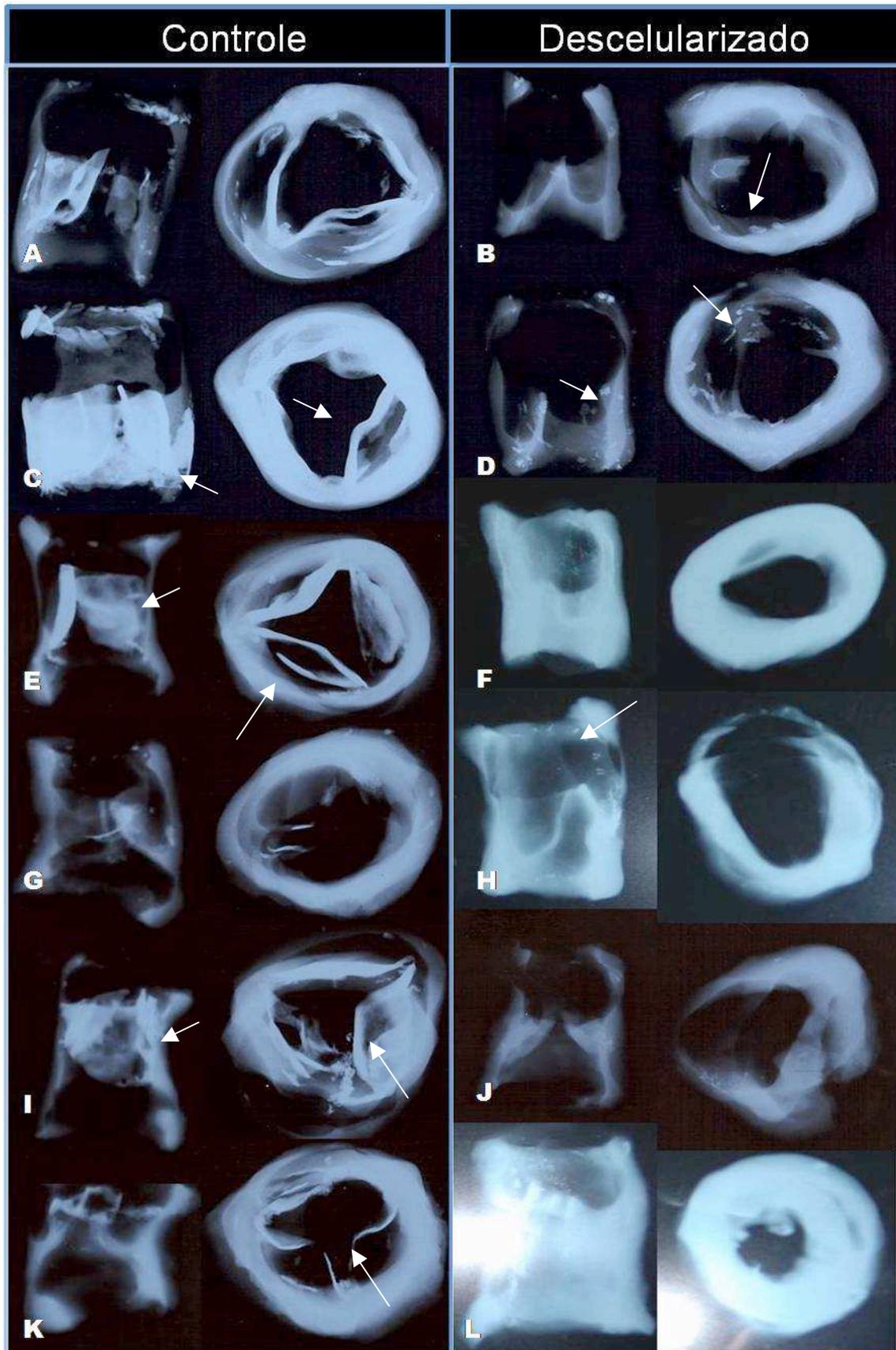


Figura 9. A,C,E,G,I e K representam enxertos GDA. Podemos observar calcificação intensa dos folhetos (setas). B,D,F,H,J e L enxertos DESC apresentam apenas pontos focais de calcificações (setas)

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.5.1 Coloração de HE

No grupo GDA, pode-se observar que tanto nas cúspides como nos condutos a matriz extracelular se encontrava desorganizada, com áreas de necrose e rotura de fibras colágenas. Apresentava infiltrado inflamatório crônico constituído de leucócitos mononucleares constituído por: células fagocitárias gigantes multinucleadas, linfócitos, macrófagos e histiócitos, sugerindo reação granulomatosa de corpo estranho. Havia também a presença de células com características de fibroblastos infiltrando a matriz (Figura 10).



Figura 10. Fotomicrografia de enxerto GDA: presença de infiltrado inflamatório, desorganização da matriz (setas), formação da camada neointima e adventícia com neovasos (HE 40x)

Na parede do tubo, o infiltrado inflamatório foi mais evidente na sua porção proximal, sendo mais intenso na sua face adventicial, onde havia presença de neovascularização. Em algumas regiões do conduto, pode-se observar a presença de condrócitos e fibroblastos com formação de áreas de metaplasia osteóide em fase inicial. Nas cúspides, o infiltrado inflamatório foi mais pronunciado nas suas porções basal e média, sendo mais atenuado na região mais distal. (Figura 11)

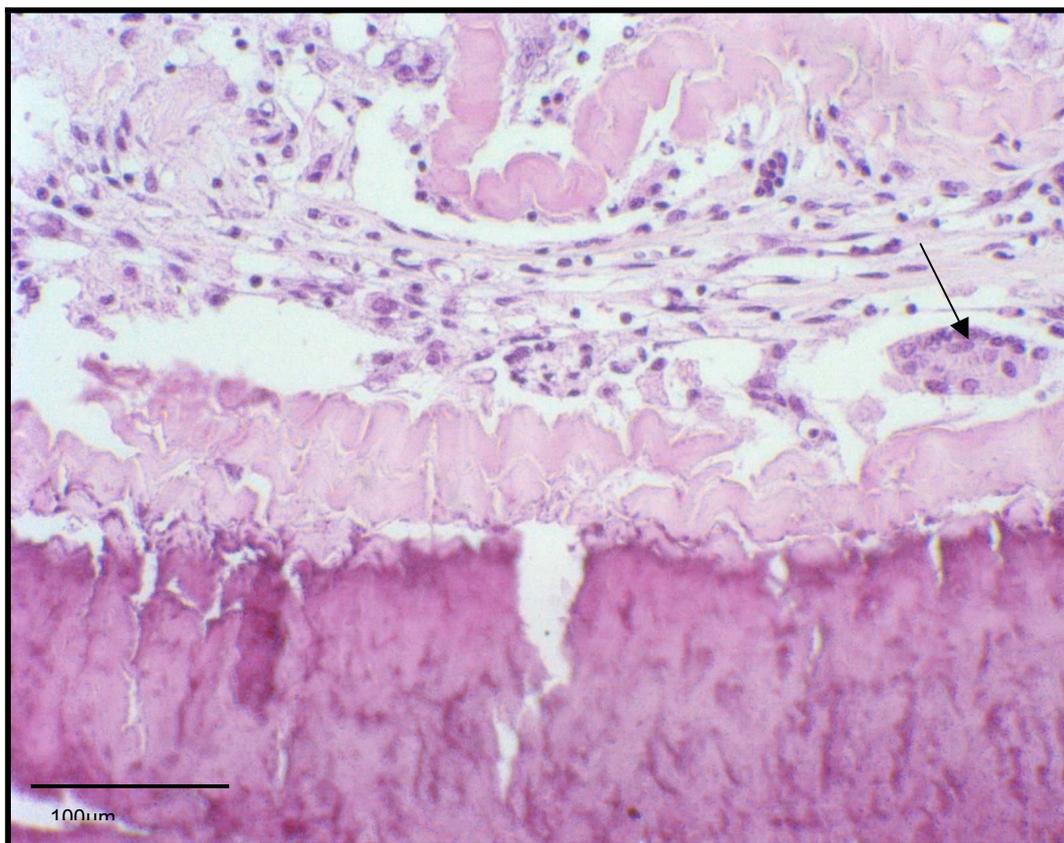


Figura 11. Fotomicrografia de enxerto GDA: podemos observar o infiltrado inflamatório da parede do tubo com metaplasia óssea. A seta indica um osteoclasto (HE 200x)

Pode-se também observar a formação de camada neo-intimal, constituída pela formação de tecido conjuntivo frouxo de origem trombótica contendo células inflamatórias e pontos focais de endotélio. A camada neo-íntima foi observada tanto na face luminal dos condutos como nas cúspides valvares, sendo bem mais intensa na sua face arterial e na sua região basal, próximo de sua inserção no conduto.

Observaram-se áreas com morfologia e coloração indicativas de calcificação distrófica, principalmente nas cúspides na região médio distal, na parede do tubo e pontos próximos as linhas de sutura (Figura 12).



Figura 12. Fotomicrografia de enxerto GDA: podemos observar formação neointimal com predomínio nas porções basais e na face arterial e presença de calcificação distrófica na cúspide (setas) (HE 40x)

No grupo de enxertos DESC pode-se observar o mesmo tipo de infiltrado inflamatório, entretanto, a matriz extracelular estava preservada com menor fragmentação das fibras colágenas. Ao contrário do grupo controle, não se observaram focos grosseiros de calcificação, nem formações osteóides, apenas pontos de calcificação próximos às linhas de sutura. Também houve formação de tecido neo-intimal, que foi mais intenso do que no grupo controle, com predomínio na face arterial (Figuras 13, 14 e 15).

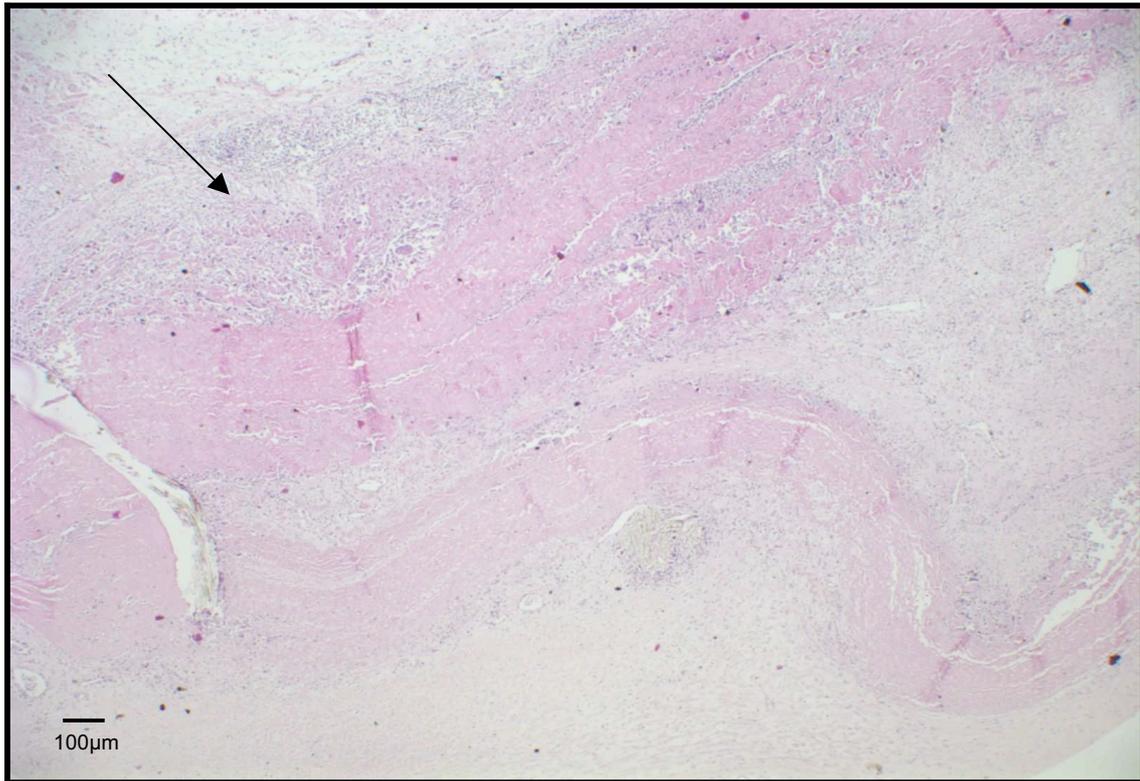


Figura 13. Fotomicrografia de enxerto DESG: observa-se um maior infiltrado inflamatório com predomínio na inserção (seta) e formação neointimal espessa (HE 40x)

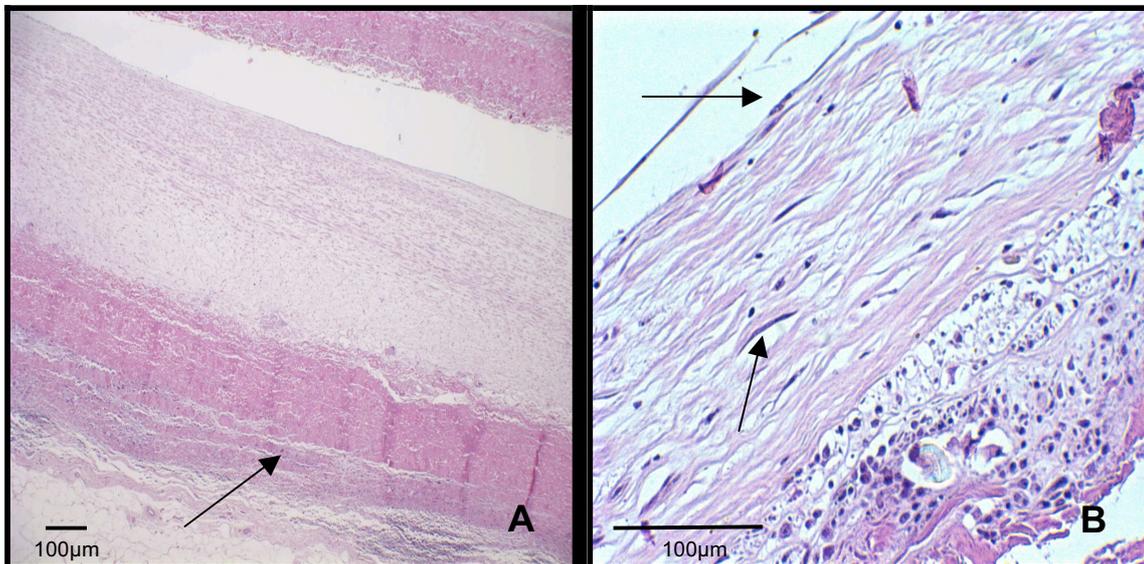


Figura 14. Fotomicrografia de enxertos DESG. A = cúspide com matriz compacta (seta) e reação neointimal (HE 40x); B = reação neointimal formada por tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos e endotélio (setas) (HE 400x)



Figura 15. Fotomicrografia de enxerto DESC. Podemos observar ponto de calcificação em linha de sutura (setas) envolvida por processo inflamatório (HE 100x)

4.5.2 Coloração Pentacrômico de Russel- Movat's

No grupo GDA, houve perda de afinidade tintorial, sugerindo que o tecido era necrótico e desvitalizado. As fibras colágenas, coradas em amarelo se mostraram rotas, enrugadas e desorganizadas. A quantidade de glicosaminoglicanos, corados em azul ou verde azulados estava bastante reduzida. A camada neo - intimal foi bem caracterizada, contendo áreas focais de endotelização, com poucas células inflamatórias havendo também importante fibrose rica em fibras elásticas no tecido do animal adjacente a implantação do enxerto (Figura 16).

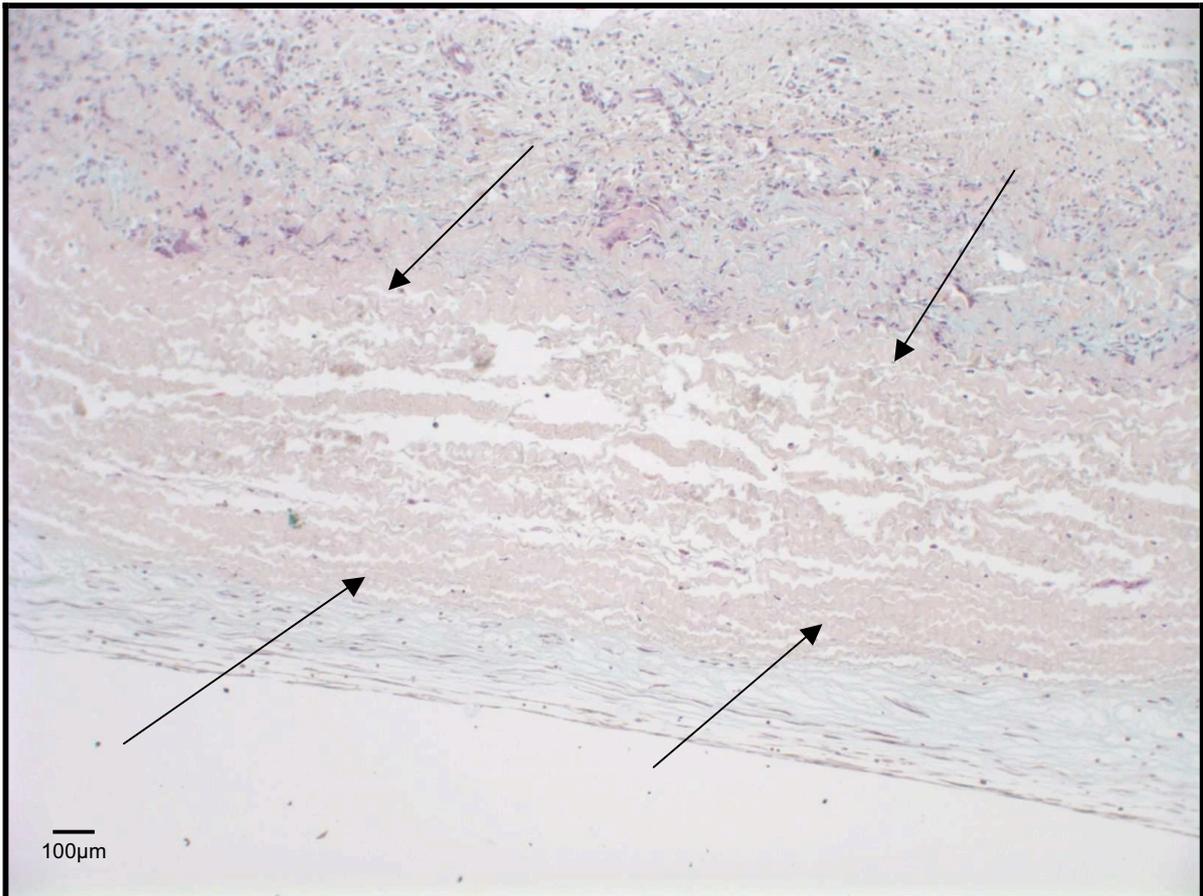


Figura 16. Fotomicrografia de enxerto GDA: desorganização da matriz com encolhimento das fibras colágenas (setas). Presença de infiltrado inflamatório ao redor do enxerto e pouca concentração de glicosaminoglicanos. (Pentacromico de Russel-Movatz 100x)

No grupo DESC houve maior afinidade tintorial (metacromasia) quando comparado com o grupo GDA. . A matriz extracelular também mostrava algum grau de desorganização, entretanto, as fibras colágenas estavam dispostas paralelamente e de forma compacta, havendo maior quantidade de glicosaminoglicanos. A formação neo-intimal também era intensa, e com as mesmas características do grupo controle. Observou-se presença de poucas fibras elásticas com aspecto degenerado devido à alteração morfológica e pouca afinidade tintorial, entre as fibras colágenas (Figura 17).

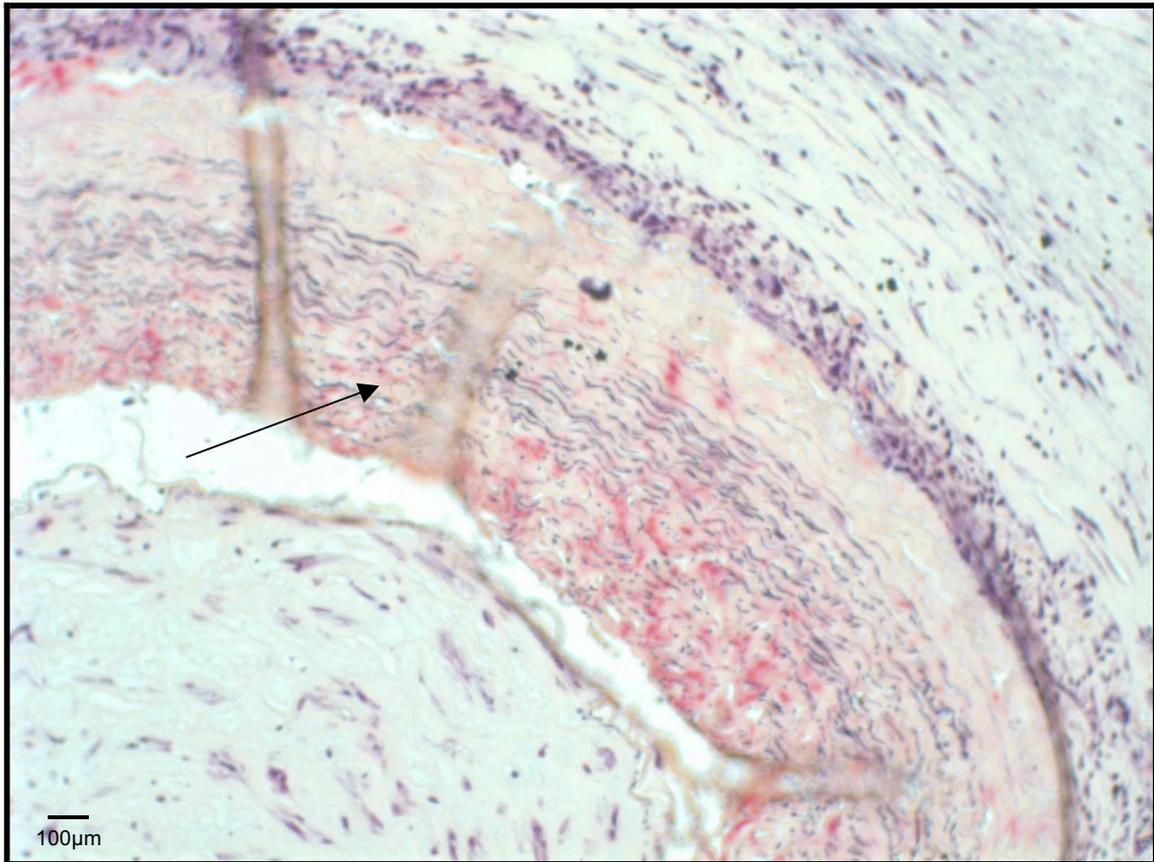


Figura 17. Fotomicrografia de enxerto DESC: preservação da matriz colágena sinalizada com a seta. Grande concentração de glicosaminoglicanos corados e azul e maior infiltrado inflamatório. (Pentacrômico de Russel-Movat's. 200x)

4.5.3 Coloração Alizarin-red ph 4,2

O grupo GDA apresentou afinidade expressiva pela coloração devido à presença de cristais de fosfato de cálcio localizados na porção médio distal das cúspides e porção médio-proximal do tubo, já no grupo DESC houve ausência de afinidade pela coloração, ou seja, ausência de calcificação distrófica, observando-se somente alguns pontos de calcificação próximos às linhas de sutura (Figura 18).

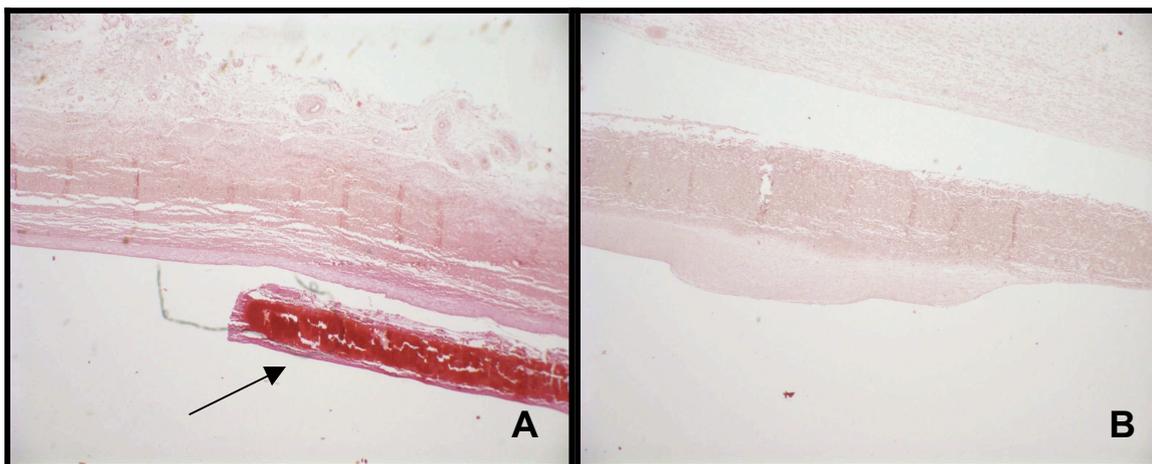


Figura 18. A - enxerto GDA com calcificação distrófica; B - enxerto DESC com ausência de calcificação. (Alizarin-red 40x ph 4,2)

4.5.4 Coloração Alizarin-red ph 7

O grupo GDA apresentou intensidade tintorial maior que o DESC demonstrando calcificação, devido à presença de cristais principalmente de oxalato de cálcio e também outros sais de cálcio, acometendo importantes áreas das cúspides e parede do tubo. No grupo DESC, observou-se apenas pontos de calcificação ao redor das suturas (Figuras 19 e 20).

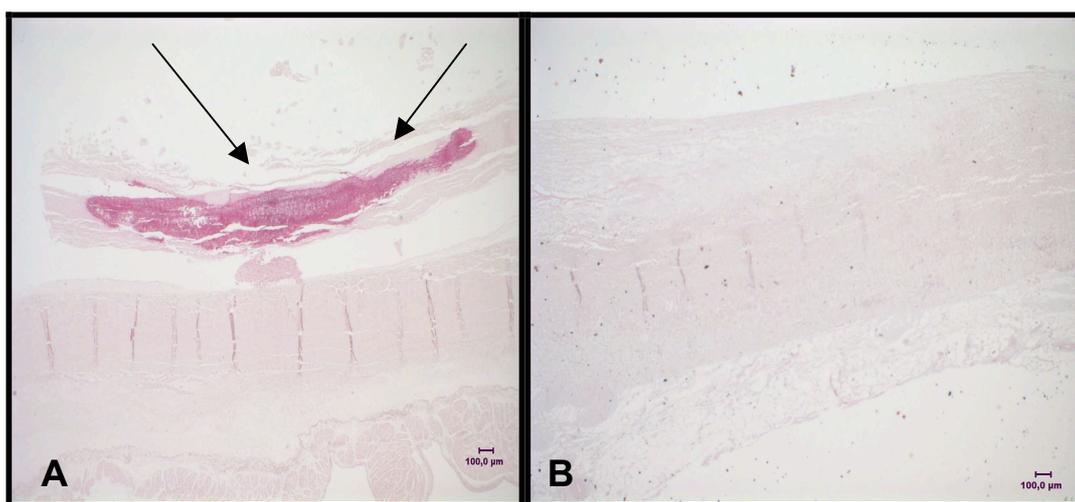


Figura 19. A - enxerto GDA com calcificação distrófica do folheto; B - enxerto DESC com ausência de calcificação. (Alizarin-red ph 7 40x)

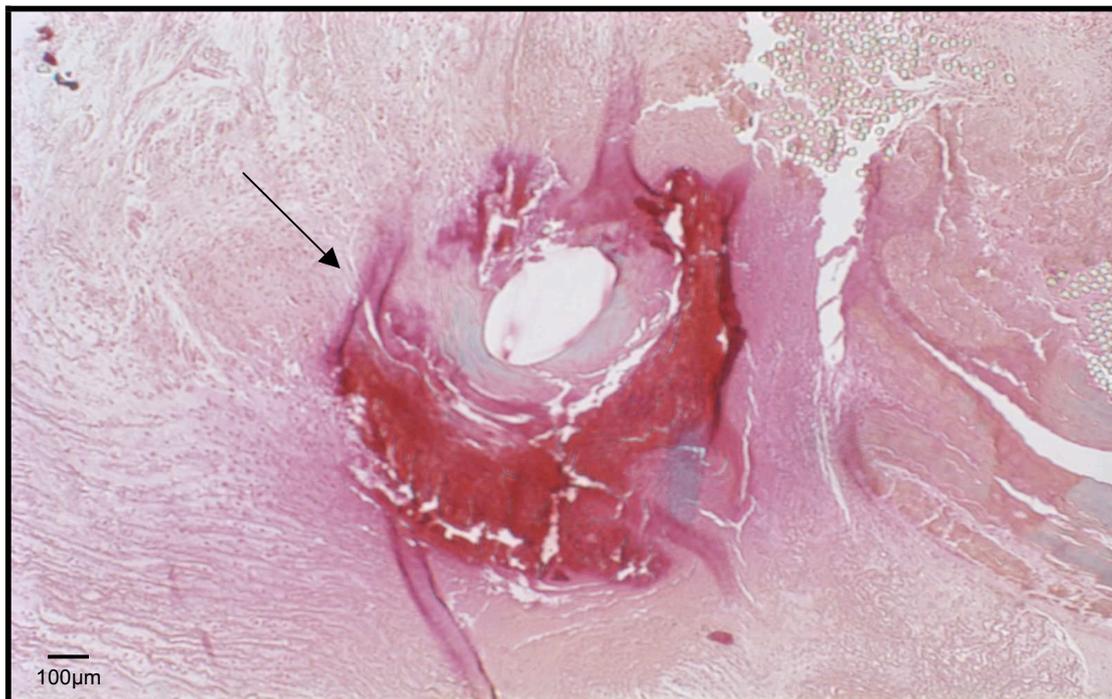


Figura 20. Enxerto DESC mostrando ponto isolado de calcificação ao redor do fio de sutura. (Alizarin-red ph 4,2 200x)

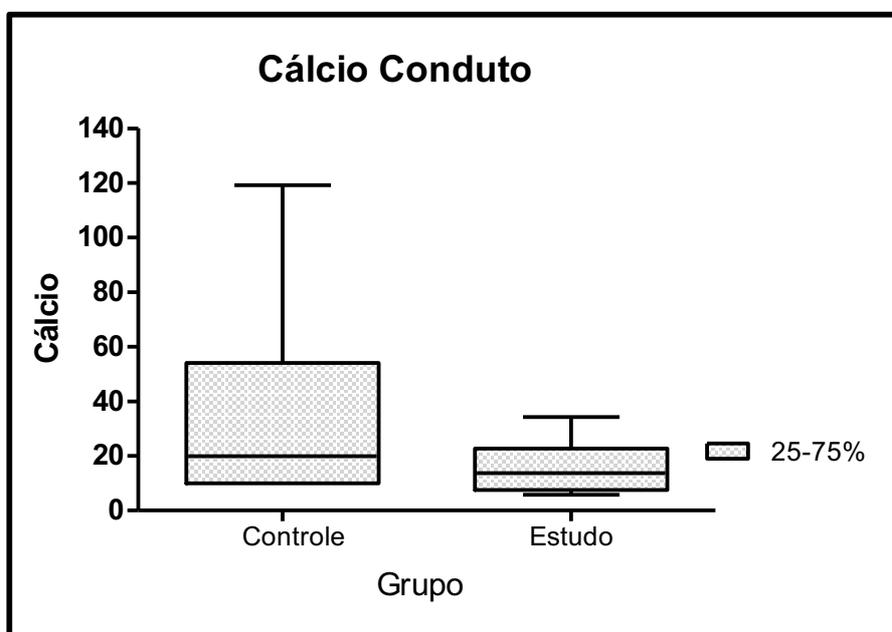
4.6 MENSURAÇÃO DO CÁLCIO

A quantidade de cálcio foi maior nas cúspides valvares do que nos condutos, em ambos os grupos. Nas cúspides valvares do grupo DESC, a quantidade de cálcio foi reduzida em 64% e nos condutos em 54%. Entretanto, apenas a redução do cálcio nas cúspides, foi estatisticamente significativa com $p=0,009$. Os valores para a quantidade de cálcio em ambos os grupos estão detalhados na Tabela 3 e Figuras 21 e 22.

Tabela 3 - Mensuração de cálcio nas cúspides valvares e condutos

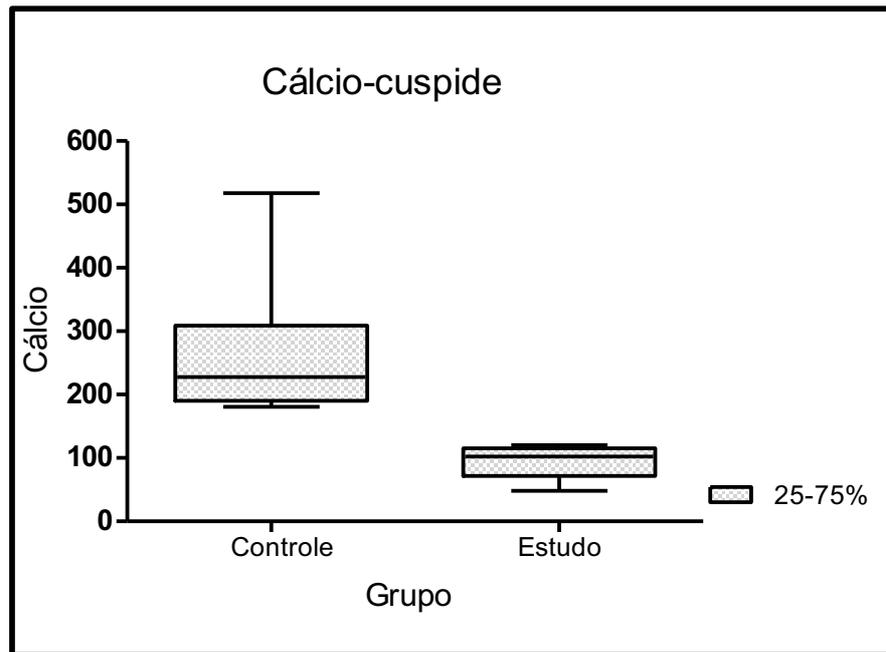
VARIÁVEL	GRUPO	n	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p*
Cálcio-conduto	GDA	6	35,25	19,93	10,00	119,22	42,13	0,297
	DESC	6	15,75	13,75	5,76	34,24	10,44	
Cálcio-cúspide	GDA	6	264,4	227,94	180,56	517,58	126,16	0,009
	DESC	6	94,29	102,23	48,49	120,22	27,05	

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$. Valores expressos em μg de Ca/mg de tecido.



Fonte: Tabela 3

Figura 21. Gráfico com os valores de cálcio medidos nos condutos valvares, $p = 0,297$



Fonte: Tabela 3

Figura 22. Gráfico demonstrando os valores de cálcio medidos nas cúspides valvares, $p=0,009$

5 DISCUSSÃO

Próteses valvares biológicas apresentam uma série de vantagens em relação às próteses mecânicas, e as indicações para o seu uso, a nível mundial, tem sido crescente nos últimos anos². Isso também é verdadeiro em nosso meio, sendo que a prótese biológica mais empregada no Brasil é a de pericárdio bovino fixada em GDA⁴.

Apesar de todos os avanços tecnológicos na estrutura das próteses e nos métodos de tratamento químico de tecidos biológicos, a maior limitação para seu emprego continua sendo a durabilidade limitada, em decorrência de degeneração tecidual por calcificação distrófica¹¹.

Apesar dos resultados em humanos nem sempre serem correspondentes, qualquer novo método de tratamento anticalcificante deve ser extensivamente avaliado em modelos experimentais antes de se iniciar o seu uso clínico. No caso de tecidos biológicos para próteses valvares cardíacas, os modelos mais frequentemente empregados são o implante no TCSC de ratos ou o modelo circulatório em ovinos jovens, visto que em ambos o processo de calcificação é bastante intenso e acelerado^{13,14}. Segundo Manjii *et al*, isto se deve ao fato destas espécies apresentarem uma resposta inflamatória exacerbada, sendo a calcificação uma consequência proporcional¹⁶. A metodologia aqui empregada, já foi por nós previamente testada no TCSC de ratos (dados não publicados), e esse estudo representa a confirmação daqueles resultados num modelo mais caro, sofisticado e provavelmente mais sensível.

É bem sabido que a calcificação das biopróteses é de origem multifatorial e em decorrência, diversas abordagens tem sido testadas para a sua prevenção¹¹. Dentre eles, podemos citar a fixação de tecidos em carbodimida¹⁸ ou com triglicidiamina e bifosfonatos¹⁷, o uso de octanodiol²⁴ ou etanol^{25,26}, ácido α amino-oléico^{32,33}, cloreto de alumínio^{26,27}, ácido glutâmico^{28,29} entre outros. A efetividade destas soluções foi variada dependendo do tecido estudado, do modelo experimental e da metodologia de análise.

Diversos estudos já demonstraram que os principais focos iniciais de formação de cristais de cálcio são as células mortas e os restos celulares^{11,12,13}.

Assim sendo, a descélularização, por remover todas as células, seus remanescentes e os antígenos presentes nas membranas celulares, mantendo apenas a matriz extracelular, pode ser um método bastante efetivo para eliminar ou retardar a calcificação distrófica^{36,37,38}.

Nosso grupo de pesquisa na PUCPR desenvolveu metodologia de descélularização de homoenxertos valvares aórticos e pulmonares baseados numa solução de SDS 0,1%™. Este método foi efetivo em fazer retirada completa de todas as células, mantendo uma matriz extracelular intacta, biocompatível e com propriedades biomecânicas bem preservadas. Neste trabalho, pudemos confirmar, através da histologia com HE, que esta metodologia também foi efetiva para a descélularização completa de pericárdios bovinos. Oswal *et al*,⁴¹ confirmaram a eficiência na remoção celular em pericárdio bovino com SDS e Rieder *et al*,³⁹ comprovaram o mesmo resultado em valvas porcinas.

Homoenxertos e heteroenxertos valvares, assim processados, demonstraram resultados experimentais e clínicos bastante satisfatórios, sendo evidente a menor tendência de calcificação, quando comparado com homoenxertos criopreservados^{48,49}. Em decorrência destes resultados, resolvemos testar a efetividade da descélularização, como método anticalcificante no pericárdio bovino fixado em GDA. Os resultados no modelo de TCSC de ratos demonstraram que a descélularização dos pericárdios antes de sua fixação em GDA, reduziu em 96% e 98% a quantidade de cálcio em 45 e 90 dias respectivamente, quando comparados com o grupo controle (dados ainda não publicados).

Em nosso estudo, utilizamos um conduto valvado de pericárdio bovino que nos permitiu analisar a calcificação não só das cúspides valvares submetidas ao stress mecânico de abertura e fechamento, mas também da parede arterial do conduto.

Por ocasião dos explantes, pudemos observar que as aderências em torno dos tubos descélularizados foram bem menos intensas do que no grupo controle, sugerindo que o tecido descélularizado foi mais biocompatível. Achados semelhantes foram reportados por Da Costa *et al*⁴⁸, que analisaram heteroenxertos porcinos descélularizados em posição pulmonar de ovinos.

Gabbay *et al*⁸ e Pires *et al*⁷ observaram que em implantes de pericárdio bovino fixado em GDA em cães, houve formação de intensas aderências, sendo esse fenômeno associado pelo contato do tecido com o sangue do receptor.

Em ambos os grupos, notamos a presença de *pannus* sobre as cúspides valvares e face interna dos condutos, e que histologicamente foram caracterizadas como hiperplasia intimal com áreas focais de neo-endotelização. Esta reação em enxertos vasculares já é bem conhecida e representa o remodelamento de microtrombos e de elementos sanguíneos depositados sobre uma superfície trombogênica não endotelizada^{7,8}. Apesar deste tipo de reação ser encontrado em próteses valvares implantadas em humanos, a sua intensidade parece bem maior em carneiros.

A análise macroscópica evidenciou que em ambos os grupos, a calcificação foi mais intensa nas cúspides valvares do que na parede do conduto, confirmando as observações de Gabbay *et al*⁸ de que a calcificação depende não somente do sítio de implantação, mas também do stress mecânico sobre o tecido. Isso também ficou evidenciado na análise radiográfica, onde pudemos observar no grupo controle, concentrações de cálcio mais intensas nas regiões comissurais e na base dos folhetos junto da sua inserção no conduto, com padrões semelhantes aos descritos por Flameng *et al*⁴⁴ em biopróteses de pericárdio bovino implantadas em posição mitral de carneiros. Segundo Vesely *et al*¹⁰ a calcificação nestas regiões que sofrem maior stress mecânico, é uma consequência da ruptura progressiva das fibras colágenas, que por sua vez facilita a deposição de cálcio. As cúspides dos condutos descelularizados se mostraram radiograficamente livres e intactas, podendo-se observar apenas alguns pontos focais de calcificação na região comissural e nas regiões traumatizadas pelas linhas de sutura proximal e distal do conduto.

A análise histológica com HE e Alizarina-red evidenciou nas cúspides valvares do grupo controle, intensa calcificação distrófica por deposição tanto de cristais de oxalato de cálcio como por fosfato de cálcio no interior do tecido. Já no grupo descelularizado, as cúspides se mostraram bem preservadas, com pontos de calcificações focais muito discretos. Estes achados histológicos foram confirmados pela mensuração quantitativa de cálcio, havendo redução de 65% e 58% na calcificação das cúspides e condutos respectivamente.

A eficiência dos métodos anticalcificantes tem sido variada na literatura, dependendo do tecido e modelo experimental analisado. A maioria dos trabalhos tem sido feita no TCSC de ratos, o que limita a sua interpretação, pois não avalia a influência dos efeitos da corrente sanguínea e do stress tecidual na calcificação. Dessa forma, Pettenazzo *et al*,²⁴ encontraram redução de conteúdo de cálcio de 90 ± 12 para $1.42 \pm 4,3$ μg de cálcio / mg de tecido com uso de octanodiol em pericárdio bovino em ratos por 75 dias enquanto Carpentier *et al*,³⁰ conseguiram redução de 108 ± 10 para $19,5 \pm 8$ utilizando o calor como tratamento em ratos por 90 dias. Wang *et al*,³⁴ utilizaram ácido tânico em pericárdio bovino em ratos em 21 dias e obtiveram redução de cálcio de 90 ± 32 para $6,4 \pm 1,2$. Em nosso meio, Baucia *et al*,³⁵ com tratamento sequencial em pericárdio bovino em implante em ratos por 120 dias, obtiveram redução de cálcio de 194 ± 19 vs $0,17 \pm 0,04$. Ferreira *et al*,²⁹ observaram calcificação mínima em pericárdio bovino tratado com ácido L-glutâmico em ratos por 60 dias, comparado ao pericárdio controle. Costa *et al*,⁴³ encontraram em implante de pericárdio bovino descelularizado em ratos em 90 dias ausência de calcificação, além de que o grupo controle inesperadamente também não calcificou.

Flameng *et al*,⁴⁴ encontraram valores de 3,23 e 1,05 μg de cálcio / mg de tecido de cúspides de diferentes próteses de pericárdio bovino descelularizado com tween-80 implantado em posição mitral de carneiros por cinco meses. Bottio *et al*,⁵² analisaram o tecido de próteses Hancock II, explantadas de pacientes submetidos à reoperações e encontraram níveis de cálcio de 14,70 μg de cálcio / mg de tecido em próteses sem degeneração estrutural, *versus* 99,11 nas próteses com degeneração calcifica. O tratamento destas próteses tinha o objetivo de remoção lipídica e não descelularização, porém a inclusão de SDS modificou a história natural. Nosso estudo conseguiu a redução de 264 μg de cálcio / mg de tecido para 94 nas cúspides, confirmando a eficiência da descelularização como método anticalcificante.

A espectrofotometria de absorção atômica mede não somente a calcificação distrófica, mas sim a quantidade total de cálcio tecidual. Em nossa metodologia, o segmento de cúspide analisado englobou a linha de sutura proximal, o que certamente contribuiu para a concentração total de cálcio. Acreditamos que se a cúspide tivesse sido recortada junto a sua base de implantação, os valores finais de cálcio no grupo descelularizado teriam sido ainda menores. Esta interpretação

se deve ao fato de não termos detectado calcificação histológica nas cúspides valvares, o que seria compatível com quantidades finais de cálcio ainda menores do que as medidas pela espectrofotometria.

Nossa avaliação ecocardiográfica foi prejudicada pelo fato do transdutor disponível não ser apropriado para animais de maior porte, o que inviabilizou o exame em alguns. Naqueles, onde o exame foi tecnicamente possível, pudemos observar que os enxertos do grupo controle mostraram cúspides calcificadas, com redução importante de sua mobilidade e gradientes transvalvares elevados. Ao contrário, no grupo descelularizado, as cúspides eram móveis, havendo apenas discreto espessamento das mesmas. Os gradientes transvalvares, apesar de menores do que no grupo controle, também estavam elevados. A presença de gradientes em próteses morfológicamente preservadas, deveu-se ao ganho pondero-estatural dos animais que dobraram de peso na evolução, fazendo com que as próteses ficassem proporcionalmente pequenas no seguimento clínico, ocasionando o que se chama de desproporção prótese/paciente.

Na análise histomorfológica com coloração HE, pudemos observar a presença de infiltrado inflamatório monomorfonuclear com reação granulomatosa de corpo estranho em ambos os grupos. Esse infiltrado foi mais intenso na região adjacente à anastomose proximal junto da inserção do folheto no conduto, sendo também maior na região adventicial do que na sua face luminal. Esses achados estão de acordo com os estudos de Da Costa *et al*⁴⁸, Lopes *et al*⁴⁹ e Hopkins *et al*⁵¹ que sugeriram que o infiltrado é proveniente do tecido muscular adjacente do animal. Comparativamente, os enxertos descelularizados tiveram a mesma infiltração inflamatória do que no grupo controle, porém com ausência de calcificação e a interpretação deste achado fica prejudicada pela falta de análise imunohistoquímica mais detalhada. Manji *et al*¹⁶ estudaram a calcificação de enxertos singênicos e xenogênicos em TCSC de ratos, e concluíram que a resposta imune mais intensa, com maior infiltrado inflamatório no grupo xenogênico esteve associada com índices mais elevados de calcificação. De forma contraditória, no estudo de Costa *et al*⁴³, o infiltrado inflamatório de pericárdios controles e descelularizados foi semelhante, entretanto, a calcificação foi ausente nos dois tipos de enxertos.

Em nosso estudo, a celularidade aumentada no interior do tecido pode significar que o tecido descelularizado foi mais biocompatível, permitindo melhor

incorporação pelo hospedeiro, sendo o infiltrado inflamatório um remodelamento natural. Observamos também uma maior presença de glicosaminoglicanos. Schenke-Layland *et al*³⁷ e Bastian *et al*⁵⁰, observaram redução dos glicosaminoglicanos da matriz com o processo de descelularização de heteroenxertos porcinos. Sabidamente, os glicosaminoglicanos são protetores à matriz diminuindo o impacto produzido pelo stress, além de modular a reação inflamatória⁵⁰. Essa interpretação pode ser reforçada pelos achados histológicos na coloração pentacrômica de Movat, que demonstrou que a matriz colágena do tecido descelularizado estava mais íntegra, com fibras colágenas melhor preservadas e com maior quantidade de glicosaminoglicanos, e sem calcificações. Já nos enxertos do grupo controle, havia marcada fragmentação das fibras colágenas, calcificação e até metaplasia cartilaginosa, evidenciando infiltrado inflamatório crônico com degeneração tecidual acentuada. De qualquer forma, a análise pormenorizada com caracterização imunohistoquímica das células presentes no infiltrado inflamatório será necessária para melhor compreender estes aspectos.

Nosso experimento confirmou os achados encontrados no modelo subcutâneo de ratos, comprovando a efetividade deste tratamento nos modelos animais. Consideramos que este tratamento pode ser uma boa alternativa somando-se aos tratamentos já empregados. Após a realização de testes de resistência e durabilidade *in vitro*, achamos que este material deve ser testado clinicamente, principalmente em pacientes mais jovens, esperando a reprodução dos mesmos efeitos na espécie humana.

6 CONCLUSÃO

A descelularização com dodecil sulfato de sódio é efetiva como método anticalcificante de próteses valvares de pericárdio bovino, fixadas em glutaraldeído e implantadas na via de saída do ventrículo direito de ovinos, por até 180 dias.

REFERÊNCIAS

1. Alsoufi B, Manlihot C, McCrindle BW, Canver CC, Sallehuddin A, Al-Oufi S, *et al.* Aortic and mitral valve replacement in children: is there any hole for biologic and bioprosthetic substitutes?. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009;36:84-90.
2. Brown JM, O'Brien SM, Wu C, Sikora JA, Griffith BP, Gammie JS. Isolated aortic valve replacement in North America comprising 108,687 patients in 10 years: changes in risks, valve types, and outcomes in the Society of Thoracic Surgeons National Database. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;137(1): 82-90.
3. Brandão CMA, Pomerantzeff PMA, Puig LB, Cardoso LF, Tarasoutchi F, Grimberg M, *et al.* Substituição valvar em idosos com bioprotese de pericárdio bovino: resultados tardios de 12 anos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1999; 14(1): 27-31.
4. Braile DM, Leal JC, Godoy MF, Braile MCV, Neto AP. Substituição valvar aórtica por bioprótese de pericárdio bovino: 12 anos de experiência. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2003; 18(3): 217-20.
5. Carpentier A, Lemaigre 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.
6. Ionescu MI, Pakrashi BC, Holden MP, Mary DA, Wooler GH. Results of aortic valve replacement with frame-supported fascia lata and pericardial grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1972; 64(3): 340-53.
7. Pires AC, Saporito WF, Leão LEV, Forte V, Cardoso SH, Ramaciotti O. Pericárdio bovino utilizado como remendo no sistema cardiovascular. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1997; 12(2): 176-87.
8. Gabbay S, Bortolotti U, Factor S, Shore DF, Frater RW. Calcification of implanted xenograft pericardium. Influence of site and function. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1984; 87(5): 782-7.
9. Meuris B, Ozaki S, Herijgers P, Verbeken E, Flameng W. Bioprosthetic tissue calcification: influence of blood contact and arterial pressure. An experimental study in rats and sheep. *J Heart Valve Dis.* 2003; 12(3): 392-9.

10. Vesely I, Barber JE, Ratliff NB. Tissue damage and calcification may be independent mechanisms of bioprosthetic heart valve failure. *J Heart Valve Dis.* 2001; 10(4): 471-7.
11. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg.* 2005; 79(3): 1072-80.
12. Cunanan CM, Cabiling CM, Dinh TT, Shen S, Tran-hata P, Rutledge JH, *et al.* Tissue characterization and calcification potential of commercial bioprosthetic heart valves. *Ann Thorac Surg.* 2001; 71(5 Suppl):S417-21.
13. Gross JM. Calcification of bioprosthetic heart valves and its assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 121(3): 428-30.
14. Schoen FJ, Levy RJ, Hilbert SL, Bianco RW. Antimineralization treatments for bioprosthetic heart valves. Assessment of efficacy and safety. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992; 104(5): 1285-8.
15. Flameng W, Meuris B, Yperman J, De Visscher G, Herijgers P, Verbeken E. Factors influencing calcification of cardiac bioprostheses in adolescent sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 132(1): 89-98
16. Manji RA, Zhu LF, Nijjar NK, Rayner DC, Korbut GS, Churchill TA, *et al.* Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection. *Circulation.* 2006; 114(4):318-27.
17. Rapoport HS, Connolly JM, Fulmer J, Dai N, Murti BH, Gorman RC, *et al.* Mechanisms of the in vivo inhibition of calcification of bioprosthetic porcine aortic valve cusps and aortic wall with triglycidylamine/mercapto bisphosphonate. *Biomaterials.* 2007; 28(4):690-9.
18. Everaerts F, Torrianni M, Van Luyn M, Van Wachem P, Feijen J, Hendriks M. Reduced calcification of bioprostheses, cross-linked via an improved carbodiimide based method. *Biomaterials.* 2004; 25(24):5523-30.
19. Maizato MJ, Higa OZ, Mathor MB, Camillo MA, Spencer PJ, Pitombo RN, *et al.* Glutaraldehyde-treated bovine pericardium: effects of lyophilization on cytotoxicity and residual aldehydes. *Artif Organs.* 2003; 27(8):692-4.

20. Zilla P, Weissenstein C, Humann P, Dower T, von Oppell UO. High glutaraldehyde concentrations mitigate bioprosthetic root calcification in the sheep model. *Ann Thorac Surg.* 2000; 70(6):2091-5.
21. Trantina-Yates AE, Human P, Zilla P. Detoxification on top of enhanced, diamine- extended glutaraldehyde fixation significantly reduces bioprosthetic root calcification in the sheep model. *J Heart Valve Dis.* 2003; 12(1):93-101.
22. Flameng W, Ozaki S, Meuris B, Herijgers P, Yperman J, Van Lommel A, *et al.* Antimineralization treatments in stentless porcine bioprostheses: an experimental study. *J Heart Valve Dis.* 2001; 10(4):489-94.
23. Nina VJS, Pomerantzeff PMA, Casagrande ISJ, Chung D, Brandão CMA, Nascimento SAB, *et al.* Endotelização in vivo das bioprotéses cardíacas: preservação convencional *versus* não aldeídica. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2004; 19(2): 136-43.
24. Pettenazzo E, Valente M, Thiene G. Octanediol treatment of glutaraldehyde fixed bovine pericardium: evidence of anticalcification efficacy in the subcutaneous rat model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008; 34(2):418-22.
25. Da Rosa GRS, Da Costa FDA, Vilani RGDC, Souza FP, Reichert L, Costa ISEA. Utilização do etanol na prevenção da calcificação em heteroenxerto valvar pulmonar porcino: estudo experimental em ovinos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2006; 21(3): 304-13.
26. Levy RJ, Vyavahare N, Ashworth P, Bianco R, Schoen FJ. Inhibition of cusp and aortic wall calcification in ethanol and aluminum treated bioprosthetic heart valves in sheep: background, mechanisms and synergism. *J Heart Valve Dis.* 2003; 12(2):209-16.
27. Sardeto EA, Da Costa FDA, Costa ISEA, Roderjan JG, Discher E, Scheneider RA, *et al.* Eficácia do AICI3 e etanol na prevenção da calcificação de fragmentos da parede aórtica porcina fixados em GDA. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2006; 21(4): 409-17.
28. Da Rosa GRS, Da Costa FDA, Mesquita L, Costa ISEA. Estudo comparativo da eficácia do etanol e do ácido L-glutâmico na prevenção da calcificação das cúspides e parede aórtica porcina: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2002; 17(2): 40-51.

29. Ferreira ADA, Da Costa FDA, Santos EAA, Sardeto EA, Gomes CHGG, Collatusso C, *et al.* Acido L-glutamico na prevenção da calcificação de pericárdio bovino fixado em glutaraldeido: estudo em ratos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2007; 22(3): 303-9.
30. Carpentier SM, Chen L, Shen M, Fornes P, Martinet B, Quintero LJ, *et al.* Heat treatment mitigates calcification of valvular bioprostheses. *Ann Thorac Surg.* 1998; 66(6 Suppl):S264-6.
31. Baucia JA, Neto RML, Rogero JR, Nascimento N, Reyes CAC. Efeitos da radiação gama no comportamento mecânico e na calcificação do pericárdio bovino fixado com glutaraldeido. *Rev Bras Cir Cardiovasc Surg.* 2007; 22(1): 68-74.
32. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Carbodiimide treatment dramatically potentiates the anticalcific effect of alpha- amino oleic acid on glutaraldehyde-fixed aortic wall tissue. *Ann Thorac Surg.* 2005; 79(3):905-10.
33. Weber PA, Jouan J, Matsunaga A, Pettenazzo E, Joudinaud T, Thiene G, *et al.* Evidence of mitigate calcification of the mosaic versus hancock standard valve xenograft in the mitral position of young sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 132(5): 1137-43.
34. Wang D, Jiang H, Li J, Zhou JY, Hu SS. Mitigated calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium by tannic acid in rats. *Chin Med J (Engl).* 2008; 121(17):1675-9.
35. Baucia JA, Neto RML, Rogero JR, Nascimento N. Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado em glutaraldeido: comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2006; 21(2): 180-7.
36. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissue and organs. *Biomaterials* 2006; 27(19): 3675-83.
37. Schenke-Layland K, Vasilevsk O, Opitz F, König K, Riemann I, Halbhuber KJ, *et al.* Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol.* 2003; 143(3): 201-8.

38. Liao J, Joyce EM, Sacks MS. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. *Biomaterials* 2008; 29(8): 1065-74.
39. Rieder E, Kasimir M, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, *et al.* Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 127(2): 399-405.
40. Wilcox HE, Korossis SA, Booth C, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, *et al.* Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *J Heart Valve Dis.* 2005; 14(2): 228-7.
41. Oswal D, Korossis S, Mirsadraee S, Wicox H, Watterson K, Fisher J, *et al.* Biomechanical characterization of decellularized and cross-linked bovine pericardium. *J Heart Valve Dis.* 2007; 16(2): 165-74.
42. Gonçalves AC, Griffiths LG, Anthony RV, Orton EC. Decellularization of bovine pericardium for tissue engineering by target removal of xenoantigens. *J Heart Valve Dis.* 2005; 14(2): 212-7.
43. Costa JNL, Pomerantzeff PMA, Braile DM, Ramirez VA, Goissis G, Stolf NAG. Comparação entre o pericardio bovino decelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de bioprotéses valvares cardíacas. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2005; 20: 14-22.
44. Flameng W, Meuris B, De Vischer G, Cunanan C, Lane E, Verbeken E, *et al.* Trilogy pericardial valve: hemodynamic performance and calcification in adolescent sheep. *Ann Thorac Surg.* 2008; 85(2): 587-92.
45. Elkins RC, Dawson PE, Goldstein S, Walsh SP, Black KS. Decellularized human valve allografts. *Ann Thorac Surg.* 2001; 71(5 Suppl):S428-32.
46. Dohmen PM, Ozaki S, Yperman J, Flameng W, Konertz W. Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep. *Semin Thorac and Cardiovasc Surg.* 2001; 13(4 Suppl 1): 93-8.
47. Visscher G, Blockx H, Meuris B, Oosterwyck H, Verbeken E, Herregods M, *et al.* Functional and biomechanical evaluation of a completely recellularized stentless pulmonary bioprosthesis in sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008; 135(2): 395- 404.

48. Affonso da Costa FD, Dohmen PM, Lopes SV, Lacerda G, Pohl F, Vilani R, *et al.* Comparison of cryopreserved homografts and decellularized porcine heterografts implanted in sheep. *Artif Organs.* 2004;28(4):366-70.
49. Lopes SV, Affonso da Costa FD, De Paula JB, Dhomen P, Phol F, Vilani R, *et al.* Análise do comportamento biológico de heteroenxertos descelularizados e homoenxertos criopreservados: estudo em ovinos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2009; 24(1):15-22.
50. Bastian F, Stelzmuller M, Kratochwill K, Kasimir M, Simon P, Weigel G. IgG deposition and activation of the classical complement pathway involvement in the activation of human granulocytes by decellularized porcine heart valve tissue. *Biomaterials* 2008; 29(12): 1824-32.
51. Hopkins RA, Jones AL, Wolfinbarger L, Moore MA, Bert AA, Lofland GK. Decellularization reduces calcification while improving both durability and 1-year functional results of pulmonary homograft valves in juvenile sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009; 137(4): 907-13.
52. Rizzoli G, Mirone S, Ius P, Polesel E, Bottio T, Salvador L, *et al.* Fifteen-year results with the Hancock II valve: a multicenter experience. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 132(3): 602-9.
53. Bottio T, Thiene G, Pettenazzo E, Ius P, Bortolotti U, Rizzoli G, *et al.* Hancock II bioprosthesis: a glance at the microscope in mild-long-term explants. *J Thoracic Cardiovasc Surg.* 2003; 126(1): 99-105.

- Figura 1. A - tubo de pericárdio demonstrando os três folhetos da valva suturados na porção proximal; B - aspecto macroscópico externo dos tubos valvados16**
- Figura 2. Fotomicrografia do controle histológico de pericárdio bovino após processo de descelularização, evidenciando ausência completa de células e boa preservação da matriz extracelular (HE 100X) ..17**
- Figura 3. Fotografia demonstrando a monitorização do carneiro na sala cirúrgica.....18**
- Figura 4. Fotografia demonstrando aspecto final da operação (A = tubo valvado de pericárdio bovino descelularizado reconstruindo a via de saída do ventrículo direito).....20**
- Figura 5. Fotografia dos segmentos de conduto (inferior) e de folheto (superior) separados para aferição do cálcio por espectrometria de absorção atômica.23**
- Figura 6. Análise macroscópica dos tubos valvados durante a operação para o explante(A = tubo valvado GDA, com intensas aderências ao redor do enxerto (seta); B = tubo valvado DESC com aderências frouxas e de fácil dissecação (setas)26**
- Figura 7. Aspecto macroscópico dos enxertos após secção do conduto. A = tubo valvado GDA com cúspides calcificadas (setas); B = tubo valvado DESC com cúspides preservadas sem calcificação grosseira (setas)27**
- Figura 8. Fotos dos tubos valvados explantados após 180 dias (A,C,E,G,I e K = grupo GDA; B,D,F,H, J e L = grupo DESC).....28**
- Figura 9. A,C,E,G,I e K representam enxertos GDA. Podemos observar calcificação intensa dos folhetos (setas). B,D,F,H,J e L enxertos DESC apresentam apenas pontos focais de calcificações (setas)30**
- Figura 10. Fotomicrografia de enxerto GDA: presença de infiltrado inflamatório, desorganização da matriz (setas), formação da camada neointima e adventícia com neovasos (HE 40x)31**
- Figura 11. Fotomicrografia de enxerto GDA: podemos observar o infiltrado inflamatório da parede do tubo com metaplasia óssea. A seta indica um osteoclasto (HE 200x).....32**
- Figura 12. Fotomicrografia de enxerto GDA: podemos observar formação neointimal com predomínio nas porções basais e na face arterial e presença de calcificação distrófica na cúspide (setas) (HE 40x)33**

- Figura 13. Fotomicrografia de enxerto DESC: observa-se um maior infiltrado inflamatório com predomínio na inserção (seta) e formação neointimal espessa (HE 40x)34**
- Figura 14. Fotomicrografia de enxertos DESC. A = cúspide com matriz compacta (seta) e reação neointimal (HE 40x); B = reação neointimal formada por tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos e endotélio (setas) (HE 400x)34**
- Figura 15. Fotomicrografia de enxerto DESC. Podemos observar ponto de calcificação em linha de sutura (setas) envolvida por processo inflamatório (HE 100x).....35**
- Figura 16. Fotomicrografia de enxerto GDA: desorganização da matriz com encolhimento das fibras colagenas (setas). Presença de infiltrado inflamatório ao redor do enxerto e pouca concentração de glicosaminoglicanos. (Pentacromico de Russel-Movatz 100x)....36**
- Figura 17. Fotomicrografia de enxerto DESC: preservação da matriz colágena sinalizada com a seta. Grande concentração de glicosaminoglicanos corados e azul e maior infiltrado inflamatório. (Pentacrômico de Russel-Movatz's. 200x)37**
- Figura 18. A - enxerto GDA com calcificação distrófica; B - enxerto DESC com ausência de calcificação. (Alizarin-red 40x ph 4,2).....38**
- Figura 19. A - enxerto GDA com calcificação distrófica do folheto; B - enxerto DESC com ausência de calcificação. (Alizarin-red ph 7 40x).....38**
- Figura 20. Enxerto DESC mostrando ponto isolado de calcificação ao redor do fio de sutura. (Alizarin-red ph 4,2 200x)39**
- Figura 21. Gráfico com os valores de cálcio medidos nos condutos valvares, $p = 0,297$ 40**
- Figura 22. Gráfico demonstrando os valores de cálcio medidos nas cúspides valvares, $p = 0,009$ 41**