

EVANDRO ANTONIO SARDETO

**ANÁLISE DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM
CLORETO DE ALUMÍNIO E ETANOL NA
PREVENÇÃO DA CALCIFICAÇÃO E DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE FRAGMENTOS
DA PAREDE AÓRTICA PORCINA FIXADOS EM
GLUTARALDEÍDO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM
RATOS**

MESTRADO EM

MEDICINA

PUCPR

CURITIBA

2005

EVANDRO ANTONIO SARDETO

**ANÁLISE DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM
CLORETO DE ALUMÍNIO E ETANOL NA
PREVENÇÃO DA CALCIFICAÇÃO E DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE FRAGMENTOS
DA PAREDE AÓRTICA PORCINA FIXADOS EM
GLUTARALDEÍDO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM
RATOS**

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

Orientador: Prof Dr Francisco Diniz Affonso da Costa

Coordenador: Prof Dr Paulo Roberto Slud Brofman.

**CURITIBA
2005**

SARDETO, Evandro Antonio. // *Análise da eficácia do tratamento com cloreto de alumínio e etanol na prevenção da calcificação e da resposta inflamatória de fragmentos da parede aórtica porcina fixados em glutaraldeído: estudo experimental em ratos.* // Curitiba, 2005. // 92 p. // (Dissertação -Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná).

ORIENTADOR: Prof Dr Francisco Diniz Affonso da Costa

DESCRITORES: 1.Parede aórtica porcina. 2.Calcificação.
3.Etanol e cloreto de alumínio.
NLMC

FOLHA DE APROVAÇÃO

Evandro Antonio Sardeto

Análise da eficácia do tratamento com cloreto de alumínio e etanol na prevenção da calcificação e da resposta inflamatória de fragmentos de parede aórtica porcina fixados em glutaraldeído: estudo experimental em ratos.

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

Aprovado em

Banca examinadora

Prof.Dr.....Instituição:.....
Julgamento:.....Assinatura:.....

Prof.Dr.....Instituição:.....
Julgamento:.....Assinatura:.....

Prof.Dr.....Instituição:.....
Julgamento:.....Assinatura:.....

À minha esposa, pelo
incentivo,
companheirismo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Paulo Roberto Slud Brofman, pela oportunidade de estar entre o grupo de mestrandos de Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Ao Prof. Dr Francisco Diniz Affonso da Costa, pelo grande apoio e orientação criteriosa deste trabalho, agradeço sincera e profundamente.

Ao Prof. Dr Iseu de Santo Elias Affonso da Costa, pelo apoio e correção ortográfica.

Ao Bioquímico João Gabriel Roderjan, pelo imenso auxílio na execução deste trabalho.

A Prof^a Márcia Olandosky, pela realização do estudo estatístico.

A Prof^a Lúcia Noronha, pela dedicada e competente análise das lâminas histológicas

A Cardiopótese ®, pelo processamento e fornecimento das válvulas aórticas porcinas.

Aos Drs Andréa Dumsch de Aragon Ferreira, Claudinei Colatusso, Carlos Henrique Gori Gomes, Jairo Leal, Ricardo Alexandre Schneider, Daniel Précoma, pelo convívio profissional que possibilitaram a execução deste trabalho.

A bióloga Ana Paula Camargo Martins do laboratório de Patologia do Departamento de Cirurgia Experimental da PUC-PR, pela auxílio no preparo do material histológico.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO.....	4
2. LITERATURA.....	5
2.1 Glutaraldeído e as biopróteses.....	6
2.2 Desempenho das biopróteses.....	7
2.3 Biopróteses e o mecanismo de deterioração.....	8
2.4 Biopróteses porcina e bovina.....	10
2.5 Biopróteses e a resposta inflamatória.....	10
2.6 Biopróteses e o excesso de glutaraldeído.....	11
2.7 Biopróteses e a eficácia dos tratamentos anticalcificantes.....	12
2.8 Papel da fosfatase alcalina na calcificação.....	12
2.9 Tratamentos anticalcificantes.....	13
2.9.1 Ácido 2 aminooleico.....	13
2.9.2 Método react biomodification.....	14
2.9.3 Ácido L-glutâmico.....	15
2.9.4 Outros aminoácidos.....	16
2.9.5 Difosfonatos.....	17
2.9.6 Carbodiamida.....	17
2.9.7 Etanol.....	18
2.9.8 Íons metálicos trivalentes.....	20
3 MÉTODOS.....	25
3.1 Próteses valvares porcinas.....	26
3.1.1 Obtenção das valvas aórticas porcinas.....	26
3.1.2 Procedimento químico.....	27
3.2 Modelo experimental.....	28
3.3 Preparo pré-operatório.....	29
3.4 Anestesia.....	29
3.5 Técnica operatória.....	30
3.6 Observação pós-operatória.....	31
3.7 Análise microscópica.....	31
3.8 Mensuração de cálcio.....	33
3.9 Análise estatística.....	33
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Análise do infiltrado inflamatório e fibras da matriz extracelular nos condutos(cortes histológicos com HE.....	36
4.1.1 Grupo I.....	36
4.1.2 Grupo II.....	41
4.1.3 Grupo III.....	45
4.2 Análise quantitativa do infiltrado inflamatório nos condutos	49
4.3 Análise da calcificação dos condutos pela coloração alizarina no pH 4,2..	51
4.3.1 Grupo I.....	51
4.3.2 Grupo II.....	53
4.3.3 Grupo III.....	55

4.3.4 Análise morfométrica da calcificação dos condutos (coloração alizarina pH 4,2).....	57
4.4 Análise da calcificação dos condutos pela coloração alizarina no pH 7,0...	58
4.4.1 Grupo I.....	58
4.4.2 Grupo II.....	60
4.4.3 grupo III.....	62
4.4.4 Análise morfométrica da calcificação dos condutos (coloração alizarina pH 7,0).....	64
4.5 Análise da calcificação dos condutos pela espectroscopia de absorção atômica.....	65
4.5.1 Grupo I.....	65
4.5.2 Grupo II.....	65
4.5.3 Grupo III.....	65
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÃO.....	73
7 REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tratamento das valvas aórticas porcinas.....	28
Tabela 2	Distribuição dos ratos por grupos.....	29
Tabela 3	Classificação do infiltrado inflamatório.....	32
Tabela 4	Quantificação do infiltrado inflamatório nos três grupos estudados ao longo do tempo (conduto).....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Animal anestesiado pronto para receber os implantes	30
Figura 2	Computador DELL® com programa imagem Pro-plus para quantificar morfometria. Aumento de 100X.....	33
Figura 3	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 15 dias de evolução (HE100X).....	38
Figura 4	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 30 dias de evolução (HE100X).....	39
Figura 5	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 60 dias de evolução (HE100X).....	40
Figura 6	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 15 dias de evolução (HE100X).....	42
Figura 7	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 30 dias de evolução (HE100X).....	43
Figura 8	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 60 dias de evolução (HE100X).....	44
Figura 9.	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 15 dias de evolução (HE100X).....	46
Figura10	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 30 dias de evolução (HE100X).....	47
Figura11	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 60dias de evolução (HE100X).....	48
Figura12	Gráfico da presença da reação inflamatória intensa nos três grupos estudados ao longo do tempo.....	50
Figura13	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 15 dias de evolução, no pH 4,2 (ALIZARINA 100X).....	52
Figura14	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 30 dias de evolução (ALIZARINA 100X).....	52
Figura15	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo controle, com 60 dias de evolução (ALIZARINA 100X).....	52
Figura16	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 15 dias de evolução (ALIZARINA 100X).....	54
Figura17	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 30 dias de	

	evolução (ALIZARINA 100X).....	54
Figura18	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 60 dias de evolução(ALIZARINA 100X).....	54
Figura19	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 15 dias de evolução(ALIZARINA 100X).....	56
Figura20	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 30 dias de evolução(ALIZARINA 100X).....	56
Figura21	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 60 dias de evolução(ALIZARINA 100X).....	56
Figura22	Gráfico da presença de calcificação nos três grupos estudados ao longo do tempo	57
Figura23	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 15 dias de evolução(ALIZARINA 100X).....	59
Figura24	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 30 dias de evolução(ALIZARINA 100X).....	59
Figura25	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 60 dias de evolução(ALIZARINA 100X).....	59
Figura26	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 15 dias de evolução(ALIZARINA 100X).....	61
Figura27	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 30 dias de evolução(ALIZARINA 100X).....	61
Figura28.	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 60 dias de evolução(ALIZARINA 100X).....	61
Figura29	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 15 dias de evolução(ALIZARINA 100X).....	63
Figura30	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 30 dias de evolução.(ALIZARINA 100X).....	63
Figura31	Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 60 dias de evolução(ALIZARINA 100X).....	63
Figura32	Gráfico da presença de calcificação nos três grupos estudados ao longo do tempo	64
Figura33	Gráfico da presença de calcificação nos três grupos estudados ao longo do tempo.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AAO- Ácidoaminooleico

Al⁺⁺⁺- Alumínio

C- Celsius

AlCl₃- Cloreto de Alumínio

FeCl₃- Cloreto de ferro

LaCl₃- Cloreto de lantânio

CO₂- Dióxido de oxigênio

E- Escapular

Fe⁺⁺⁺- Ferro

Ga⁺⁺⁺- Gálio

GDA- Glutaraldeído

HE- Hematoxilina e Eosina

La⁺⁺⁺- Lantânio

L- Lombar

MMP- Metaloproteinases da matriz

Min- Minuto

M- Mol

Ga(NO₃)₃- Nitrato de gálio

n- número da amostra

PUC-PR- Pontifícia Universidade Católica do Paraná

RPM- Rotação por minuto

SSI- Solução salina isotônica

TL- Tóraco-lombar

UNICAMP- Universidade de Campinas

UFPR- Universidade Federal do Paraná

RESUMO

Objetivo: Avaliar a eficácia do cloreto de alumínio e do cloreto de alumínio associado ao etanol na prevenção de calcificação e da resposta inflamatória de fragmentos de parede aórtica porcina fixada em glutaraldeído, implantados no tecido subcutâneo de ratos jovens. **Métodos:** Utilizaram-se 15 ratos da linhagem Sprague-Dawley, em cujas telas subcutâneas, foram implantados fragmentos de parede aórtica porcina, submetidos a três métodos diferentes de tratamento. Os animais foram distribuídos em três grupos de cinco, de acordo com o tipo de tratamento químico dos fragmentos de parede aórtica. As valvas porcinas das quais foram retirados os fragmentos, foram inicialmente fixadas em glutaraldeído 0,5% por 72 horas. Após a fixação inicial, as valvas do grupo I (controle) foram estocadas em glutaraldeído 0,2%. As do grupo II, foram submetidas a tratamento adicional com cloreto de alumínio 0,1M por 105 min e depois estocadas em solução salina isotônica. As do grupo III além do glutaraldeído 0,5%, foram tratadas com etanol 80% por 24 horas mais cloreto de alumínio 0,1M por 105 min, sendo também estocadas em solução salina isotônica até o momento do implante. Os explantes foram realizados com 15, 30 e 60 dias após as operações. Foram realizadas análises histológicas pelas colorações de hematoxilina & eosina e de Alizarina nos pHs de 4,2 e 7,0. Foram dosadas as quantidades de cálcio pela espectroscopia de absorção atômica. **Resultados:** Pelas colorações de hematoxilina & eosina constatou-se que a matriz extracelular das paredes aórticas ficaram melhor preservadas nos explantes do grupo III. A intensidade da reação inflamatória intensa foi menor nesse grupo. Quando corados com Alizarina pH 4,2, o grupo II teve menor índice de calcificação comparado ao controle, e o grupo III teve menor índice de calcificação comparado com os grupos I e II. Com a coloração de Alizarina no pH 7,0, novamente o grupo III teve menor índice de calcificação comparado com os grupos I e II. Pela espectroscopia de absorção atômica, os níveis de cálcio foram semelhantes para os grupos II e III, mas significativamente menores do que os do grupo I. **Conclusão:** O tratamento com cloreto de alumínio diminuiu a calcificação dos fragmentos de parede aórtica porcina preservada em glutaraldeído, implantados na tela subcutânea de ratos jovens. O uso combinado do etanol com cloreto de alumínio foi ainda mais eficiente em inibir a calcificação, e também em diminuir a reação inflamatória.

DESCRITORES: 1. Parede aórtica porcina. 2. Calcificação. 3. Etanol e cloreto de alumínio

ABSTRACT

Objective; Evaluate the efficiency aluminum chloride and aluminum chloride plus ethanol to prevent calcification and inflammatory reaction of fragments of porcine aortic wall fixed with glutaraldehyde and implanted in subdermal of young rats. **Methods:** Fifteen Sprague-Dawley rats were studied. In the subdermal tissue three fragments of porcine aortic wall were implanted. The fragments were subjected to three different methods of treatment. The animals were distributed in three groups of five, according to the chemical treatment of the aortic wall. The porcine aortic valves from which fragments were obtained were fixed in 0,5% glutaraldehyde for 72 hours. After initial fixation in 0,5% glutaraldehyde, the valves of group I(control), were stored in 0,2% glutaraldehyde. Those of the group II, were additional treated with aluminum chloride 0,1M during 105 minutes and thereafter stored in isotonic saline solution. Those of the group III, after treatment with 0,5% glutaraldehyde were treated with ethanol 80% for 24 hours and chloride aluminum 0,1M for 105 minutes, and also stored in isotonic saline solution until implantation. Explantating were done after fifteen, thirty and sixty days. Histological analysis were performed with hematoxilin & eosin and alizarin-red at pHs 4,2 and 7,0. Calcium content was determined by atomic absorbance spectroscopy **Results:** The hematoxilin and eosin and alizarin red dyeing showed that extracelular matrix of aortic wall were better preserved than fragments of the group III. The intensity of inflammatory reaction was lower in this group. When dyed with alizarin red at pH 4,2, the group II had lower degree of calcification compared with group I. The group III had lower degree of calcification compared with the group I and II. With alizarin red dyeing at pH 7,0 the group III, had the lower calcification compared with group I and II. The atomic absorbance spectroscopy showed similar calcium levels the both group II and III, but significantly lower than in the group I. **Conclusion:** The treatment with aluminum chloride inhibited calcification and inflammatory reaction in fragments of aortic wall implanted in the subdermal tissue of the young rats. The combined use ethanol with aluminum chloride was more efficient to inhibit the calcification and also to diminish the inflammatory reaction.

Key Words: Aortic porcine wall. Calcification. Ethanol and aluminum chloride

1 INTRODUÇÃO

A substituição de valvas cardíacas por próteses é, atualmente, procedimento rotineiro. Entretanto, apesar de todos os avanços tecnológicos, o substituto valvar ideal ainda não é disponível.

Existem dois tipos básicos de próteses: as biológicas e as mecânicas. As próteses biológicas, apresentam bom desempenho hemodinâmico e, por apresentarem fluxo central, estão associadas a baixa ocorrência de fenômenos tromboembólicos, mesmo na ausência de terapia anticoagulante. Sua maior desvantagem é a durabilidade limitada, especialmente em crianças e pacientes jovens, nos quais degeneração por calcificação é precoce.

Já as próteses mecânicas são duráveis e também apresentam desempenho hemodinâmico favorável. Entretanto, por apresentarem incidência elevada de complicações tromboembólicas, necessitam de anticoagulação sistêmica permanente. Em populações de baixas condições sócio-econômicas, como as do Brasil, as dificuldades em manter uma anticoagulação efetiva, limitam de forma significativa, seu uso.

Tecidos biológicos têm sido utilizados como substituto valvar desde de 1962, quando uma valva aórtica humana fresca foi transplantada.⁽¹⁾ A partir daquela década estudos com biopróteses intensificaram-se.

Em 1967, foi idealizada a valva de fâscia lata autógena fresca.⁽²⁾

A válvula de dura-mater homóloga, conservada em glicerol, foi proposta por PUIG et al em 1971.⁽³⁾ Tanto as valvas de fâscia lata quanto as de dura-máter, tiveram sua aceitação limitada em decorrência da dificuldade de sua montagem por ser um processo artesanal e em decorrência dos resultados tardios não serem adequados.

As valvas porcinas, propostas por BINET e O' BRIEN em 1967,⁽⁴⁾ tiveram seu uso descontinuado por apresentarem calcificações precoces, o que mais tarde verificou-se ser devido ao processo de fixação pelo formaldeído.

No final da década de 1960, um passo importante foi dado quando CARPENTIER, introduziu o glutaraldeído na fixação de próteses porcinas.⁽⁵⁾

Logo em seguida IONESCU, na década de 1970, idealizou a valva de pericárdio bovino, também preservada em GDA.⁽⁶⁾ A partir de então, as próteses biológicas foram amplamente difundidas. No Brasil, BRAILE, foi o

responsável pelo desenvolvimento de próteses de pericárdio bovino preservadas em GDA ⁽⁷⁾.

O sucesso do glutaraldeído com fixador de tecidos biológicos em próteses valvares foi decorrente da sua eficácia em estabilizar o tecido, reduzir de forma significativa a antigenicidade tecidual, além de ser agente esterilizante. Entretanto, mais recentemente, o GDA tem sido apontado como facilitador da calcificação observada tardiamente com as próteses valvares ⁽⁸⁾.

Com o objetivo de melhorar a durabilidade das próteses biológicas, diversos tratamentos anticalcificantes vêm sendo testados, com graus variados de sucesso, ^(9,10,11) Dentre as diversas substâncias testadas, tanto o etanol como o cloreto de alumínio comprovadamente foram capazes de retardar o processo de calcificação, tanto em modelos animais como em seres humanos

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da PUC-PR, demonstraram que, tanto no modelo subcutâneo de ratos como na circulação de ovinos, o etanol foi eficiente em prevenir a calcificação de cúspides valvares porcinas previamente fixadas em glutaraldeído. Entretanto, o mesmo não ocorreu na parede arterial aórtica. ^(12,13)

O presente trabalho é uma continuação dessa linha de pesquisa, buscando um tratamento químico capaz de prevenir a calcificação não somente das cúspides valvares, mas também na parede arterial das próteses valvares porcinas.

1.1 OBJETIVO

Avaliar a eficácia do cloreto de alumínio isolado e do cloreto de alumínio associado ao etanol na prevenção da calcificação e da resposta inflamatória de fragmentos de parede aórtica porcina fixados em GDA, quando implantados na tela subcutânea de ratos jovens.

2 LITERATURA

O termo bioprótese foi proposto por Carpentier, que o definiu como "xenoenxerto quimicamente condicionado, montado em anel de suporte, cuja antigenicidade é reduzida pela fixação". Sua estabilidade é aumentada pela ligação inter-molecular das fibras de colágeno. Sua durabilidade depende da estabilidade do material, e não da regeneração das fibras pelo receptor.⁽¹⁴⁾

2.1 GLUTARALDEÍDO E AS BIOPRÓTESES

Valvas cardíacas porcinas fixadas em GDA foram implantadas pela primeira vez em 1968 por CARPENTIER et al⁽⁵⁾. Naquele trabalho foram analisados os fatores biológicos que afetam os resultados a longo prazo dos heteroenxertos valvares, sendo sugerido que a reação do hospedeiro ao enxerto tem relação com o grau de antigenicidade do tecido. O método de preservação do enxerto deve eliminar os principais componentes antigênicos, isto é, proteínas solúveis, células, glicoproteínas, mucopolissacarídeos. A passagem das células do hospedeiro para dentro do tecido da bioprótese é geralmente prejudicial pois as células são imunologicamente competentes, e parece desejável prevenir este crescimento por um apropriado método de preservação. Também concluiu que houve evidência de que o método de preservação do enxerto é o principal fator que afeta a durabilidade a longo prazo.⁽⁵⁾

O GDA apresenta-se sob a forma de um líquido oleoso ou de cristais incolores, de cheiro característico. É solúvel em água e etanol. Quimicamente, o GDA, cuja fórmula é $OCH(CH_2)_3CHO$, pode polimerizar-se na presença de água. A reação de condensação é mais rápida em meio alcalino e pode tornar-se intensa em contato com bases fortes. As soluções aquosas de GDA são relativamente estáveis. O GDA é usado para a fixação de próteses valvares cardíacas, além de componente de soluções bactericidas.

GDA reduz riscos de tromboembolismos relacionado à bióprótese e estabiliza o biomaterial, permitindo prolongada vida útil, reduz imunogenicidade, enquanto preserva, esteriliza e cria resistência.⁽⁵⁾

Em 1974, Carpentier, publicou os resultados dos primeiros 104 pacientes operados, nos quais foram utilizados heteroenxertos preservados emGDA

Conclui que os heteroenxertos valvares preservados em GDA pareciam ser a melhor escolha para substituição valvar em posição pulmonar e tricúspide. Isto foi especialmente verdade na posição tricúspide, na qual as próteses biológicas tinham notadamente alto risco de tromboembolismo. Nas posições aórtica e mitral, as substituições por próteses biológicas tinham dado excelente resultado a longo prazo. Entretanto havia o risco de complicações tromboembólicas e necessidade de anticoagulação.⁽¹⁵⁾

2.2 DESEMPENHO DAS BIOPRÓTESES

BRAILE et al⁽⁷⁾, publicaram sua experiência com biopróteses de pericárdio bovino IMC-MACCHI, tratada com GDA com seguimento de quatro anos. Demonstraram bons resultados clínicos e excelente desempenho hemodinâmico. No início da experiência a embolização precoce representou um certo problema, que desapareceu nos últimos 20 meses. Do mesmo modo não ocorreram tromboes valvares. A bioprótese tem baixo potencial trombogênico e portanto, anticoagulação por longo tempo pode não ser necessária.

O desempenho da bioprótese depende criticamente da quantidade do esqueleto de colágeno, e sua resistência à deterioração. Biopróteses não possuem mecanismos de remodelação para substituir colágeno e outros componentes da matriz extracelular que são progressivamente degradados pela proteólise e danos mecânicos, ocasionando uma taxa de deterioração de mais de 50% dentro de 10 a 15 anos⁽¹⁶⁾.

A taxa de deterioração é quase 100% em cinco anos em pacientes com menos de 35 anos de idade, mas apenas 10% em 10 anos em pacientes com mais de 65 anos de idade.⁽¹⁶⁾

VYAVAHARE et al⁽¹⁷⁾ analisando os mecanismos de falência das biopróteses, in vitro, mostraram que a sua fadiga causa desnaturação do colágeno e perda de glicosaminoglicanos, o que contribui para degeneração.

Após o implante, a superfície dos folhetos das biopróteses torna-se variavelmente coberta por fibrina, plaquetas, monócitos, macrófagos e ocasionalmente células gigantes multinucleadas.

Devido à falta de endotélio, plasma, eritrócitos e células inflamatórias podem infiltrarem-se nos folhetos. Desta maneira, restos celulares ligados com colágeno e elastina das cúspides, podem servir como foco de calcificação.⁽¹⁸⁾

2.3 BIOPRÓTESES E O MECANISMO DE DETERIORAÇÃO

O mecanismo mais freqüente de falência das biopróteses é a calcificação.^(19,20) SCHOEN et al⁽¹⁹⁾ mostraram que 20 a 30% das válvulas porcinas preservadas em GDA entram em deterioração por calcificação dentro de dez anos pós implante no homem.

A calcificação é um evento normal ou fisiológico na formação dos ossos e dentes, mas depósitos de cálcio, são prejudiciais ao funcionamento de outros tecidos. A calcificação é um processo direcionado, ativo e requer energia. O mineral predominante na mineralização dos ossos e outros tecidos normais é a hidroxiapatita.

O acúmulo patológico de cristais de fosfato de cálcio em tecidos necróticos, lesados ou alterados é um fenômeno comum em doenças cardiovasculares. Esta calcificação pode ser subdividida em dois tipos: metastática, em hospedeiros hipercalcêmicos e distrófica (normocalcêmicos), no qual os tecidos são necróticos. Ao contrário da mineralização do esqueleto normal que é ordenada e regulada, a calcificação distrófica é caótica e acidental, ocorrendo sem uma progressão temporal lógica.

O termo doenças calcíferas tem sido empregado para descrever a calcificação distrófica, que ocorre em uma variedade de estados patológicos, tais como aterosclerose, doenças valvares, artrites, calcificação arterial levando a isquemia miocárdica e calcificação associada ao implante de prótese.

A calcificação pode ocorrer em tecidos naturais, que se tornaram não viáveis por tratamento químico. A calcificação destes biomateriais ocorre quando há o implante no sistema circulatório ou em certas situações em que estes materiais localizam-se dentro de tecido conectivo ou outros sítios.

O local do início da mineralização pode ser intrínseco (dentro da bioprótese) ou extrínseco, associado com elementos ou tecidos não implantados, como trombos, vegetações, pseudoíntima, neoíntima, restos celulares. A calcificação ocorre dentro de fluidos e células embebidas nos biomateriais ou em tecidos que crescem para dentro do interstício de materiais porosos, esta é uma variante da mineralização extrínseca.

Em geral, os determinantes da mineralização incluem fatores relacionados ao metabolismo do hospedeiro, composição e estrutura química do implante.^(18,19,20,21)

VESELY et al,⁽²²⁾ propuseram que o dano tecidual e calcificação podem ter mecanismos independentes na deterioração das biopróteses porcinas. As biopróteses porcinas têm excelente desempenho hemodinâmico quase não requerendo anticoagulação, mas têm durabilidade limitada. Rotura das cúspides é a forma mais frequente de deterioração valvar. Estas roturas cuspidais, sugerem que o mecanismo de falência da bioprótese é endurecimento causado pela calcificação, que leva a alto estresse e dano secundário às fibras colágenas e rasgo no folheto. Seus resultados não apoiaram a hipótese de que calcificação endurece biopróteses porcinas preservadas em GDA exceto quando a cúspide inteira é transformada em uma massa mineral sólida. Ao contrário, o rasgo pode desenvolver-se como resultado de danos mecânicos cumulativos que independem da calcificação.

2.4 BIOPRÓTESES PORCINA E BOVINA

BANHARDT et al⁽²³⁾ realizaram trabalho experimental em carneiros jovens, no qual avaliaram a deterioração das biopróteses porcinas e de pericárdio bovino. Os achados morfológicos foram similares nas biopróteses porcinas e de pericárdio bovino, e consistiram de depósitos de calcificação, degeneração do colágeno, microtrombos e "*pannus fibroso*". Estes achados são quase idênticos àqueles associados com a deterioração das biopróteses em humanos, que mostraram não haver diferenças no desenvolvimento de calcificação em biopróteses porcinas e de pericárdio bovino.

2.5 BIOPRÓTESE E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

HUMAN et al,⁽²⁴⁾ descreveram o possível papel da resposta imune na deterioração da bioprótese (estudo realizado em modelo experimental em carneiro). Seus achados mostraram que uma melhor ligação covalente (*cross-linking*) do GDA com o tecido da bioprótese resulta em redução significativa da inflamação. A ligação covalente convencional leva macrófagos e células gigantes de corpo estranho a uma forte resposta por baixo do tecido do "*pannus*" e intenso super crescimento. A mais alta densidade de ligação covalente inibe significativamente a reação mononuclear e o crescimento excessivo do tecido na linha de sutura. A densidade da ligação correlaciona-se inversamente com calcificação, ou seja, quanto mais alta a densidade de ligação, menor é a mineralização. Os tecidos fixados convencionalmente provocam forte resposta específica de anticorpos, que pode ser suprimida pela ligação covalente. A exposição do tecido aos anticorpos específicos facilita a calcificação.

2.6 BIOPRÓTESES E O EXCESSO DE GLUTARALDEÍDO

GOLOMB et al,⁽²⁵⁾ pesquisaram o papel do GDA ligado ao tecido de pericárdio bovino em induzir calcificação (estudo experimental em ratos). Mostraram que o emprego do GDA duas ou três vezes além do nível crítico não aumenta a calcificação.

GIRARDOT et al,⁽⁸⁾ estudaram o papel do GDA na calcificação de biopróteses porcinas, comparando cúspide e parede da aorta. Neste estudo experimental os ratos foram divididos em dois grupos. O primeiro para quantificar calcificação em cúspide e parede da aorta e o segundo para análise histológica das cúspides. Os resultados do primeiro grupo indicam que o GDA ligado à cúspide e parede da aorta foi dependente da concentração. A parede da aorta continha significativamente menos GDA do que a cúspide, e que o GDA que penetrava na parede apresentou taxa similar na íntima e adventícia. Mostrou-se que distribuição homogênea através da parede da aorta após sete dias de fixação, exceto na íntima, onde foi significativamente menor. Os resultados histológicos indicaram que a calcificação aparece primeiro no núcleo da célula, antes de se estender a outras estruturas. Após oito semanas do implante, as cúspides estavam todas calcificadas.

O impacto do GDA na calcificação de biopróteses, também foi estudado por GRABENWOGGER et al⁽²⁶⁾ (estudo experimental em ratos), que concluíram que o GDA é nocivo no processo de calcificação e enfatizaram a necessidade de métodos alternativos anticalcificantes.

ZILLA et al⁽²⁷⁾, realizaram um estudo visando verificar se há inibição da calcificação com altas concentrações de GDA (estudo experimental em carneiros). A mineralização coincidiu com a presença de elastina embora cálcio foi encontrado predominantemente no núcleo e membrana das células. A calcificação dos folhetos estava ausente em todas as amostras explantadas após seis semanas.

Em poucos folhetos apresentou-se calcificação heterogênea, após seis meses. As diferenças de concentrações de 0,2%-1% e 3% foram quantitativas, mas não houve padrões de distribuição considerado qualitativo. Não houve diferença na resposta inflamatória do hospedeiro.

2.7 BIOPRÓTESE E A EFICÁCIA DOS TRATAMENTOS ANTICALCIFICANTES

SCHOEN et al⁽²⁶⁾, analisaram a eficácia e segurança de tratamentos anticalcificantes em biopróteses. Concluíram que os tratamentos antimineralizantes devem prevenir a calcificação sem provocar efeitos adversos. A investigação pré-clínica da eficácia e segurança dos tratamentos anticalcificantes compreende quatro fases essenciais: (1) implante subcutâneo em pequenos animais, (2) estudo biomecânico da hemodinâmica e durabilidade in vitro, (3) morfologia das válvulas não implantadas, (4) implante circulatório em grandes animais.

2.8 PAPEL DA FOSFATASE ALCALINA NA CALCIFICAÇÃO

MARANTO et al⁽²⁷⁾, pesquisaram a atividade da fosfatase alcalina no pericárdio bovino preservado em GDA. O processo de mineralização começa em células remanescentes do tecido fixado. Outras calcificações cardiovasculares patológicas e a mineralização fisiológica do esqueleto ósseo e dentário são largamente iniciadas nas células derivadas de estruturas da membrana (chamada matriz vesicular). A fosfatase alcalina tem importante função na patogênese da nucleação mineral. A atividade da fosfatase alcalina foi medida pela conversão do p-nitrofenol fosfato para nitrofenol. A conclusão foi que o pericárdio bovino tratado com GDA retém muito da atividade hidrolítica da fosfatase alcalina, uma enzima associada com esqueleto normal e calcificações cardiovasculares e não cardiovasculares patológicas, e sugere que novo exame do mecanismo desta enzima pode estimular novas pesquisas para retardar ou prevenir a calcificação das biopróteses.

LEVY et al⁽²⁸⁾, estudando a atividade da fosfatase alcalina e sua inibição pelo cloreto de alumínio e cloreto de ferro (mineralização em biopróteses), demonstraram: (a) que a deterioração devida à calcificação clínica das biopróteses pode ser simulada em grandes animais ou em roedores. (b) a calcificação das biopróteses é relacionada à mecânica, ao implante e ao hospedeiro. (c) o evento inicial da calcificação em fragmentos implantados no subcutâneo de ratos foi o depósito mineral em células desvitalizadas intrínseca ao tecido da bioprótese dentro de 48 a 72 horas, seguida mais tarde pela mineralização do colágeno. (d) a fosfatase alcalina associada com a matriz vesicular envolvida na nucleação mineral do osso, está presente em ambos tecidos frescos e tecidos fixados da bioprótese no sítio inicial de mineralização. (e) certos inibidores da calcificação dos tecidos da bioprótese (alumínio, ferro) estão localizados nos sítios onde a fosfatase alcalina está presente. Com base nisto, propuseram que a fosfatase alcalina é o elemento chave na patogênese da mineralização da bioprótese. O cloreto de ferro e de alumínio reduziram a atividade da fosfatase alcalina e inibiram a calcificação.

2.9 TRATAMENTOS ANTICALCIFICANTES

2.9.1 ÁCIDO 2-AMINOOLEICO

GOTT et al⁽²⁹⁾, analisaram um novo método de tratamento anticalcificante com AAO em válvulas porcinas. Após 20 semanas, as próteses foram retiradas e analisadas. No grupo controle (tratamento com GDA), as cúspides estavam imóveis, espessadas e com calcificação. No grupo AAO, as cúspides estavam livres de depósitos de cálcio e encontravam-se flexíveis, mas apresentavam hematomas, superfície rugosa com perda estrutural.

O tratamento com AAO reduziu a mineralização das biopróteses porcinas com a proposição de que o AAO se liga ao grupo livre do aldeído do tecido ligado ao GDA

CHEN et al⁽³⁰⁾, estudaram o mecanismo da eficácia do AAO na inibição da calcificação de biopróteses porcinas tratadas com GDA (estudo experimental em carneiros). Neste estudo foi mostrada significativa redução da difusão do cálcio no tecido valvar. O AAO inibiu a calcificação na cúspide, mas não na parede aórtica.

GOTT et al⁽³¹⁾, testaram a técnica de refinamento do AAO como tratamento anticalcificante em biopróteses (o modelo testado foi subcutâneo de ratos e circulatório em ovinos). Este estudo propôs uma revisão do processo de tratamento anticalcificante. Partículas insolúveis do AAO, presentes na solução de tratamento foram identificadas como causa da abrasão mecânica das cúspides valvares. Estas partículas foram removidas através da filtração da solução. Esta técnica sugere que o refinamento do AAO reduziu a calcificação das cúspides porcinas, mas não da parede.

FLAMENG et al⁽³²⁾, DUARTE et al⁽³³⁾ estudaram a calcificação das biopróteses porcinas (modelo circulatório). Os resultados com AAO foram similares ao de CHEN et al⁽³⁰⁾ e GOTT et al⁽³¹⁾

2.9.2 MÉTODO "NO-REACT BIOMODIFICATION"

ABOLHODA et al⁽¹⁰⁾ estudaram a calcificação de pericárdio bovino comparando o GDA e o *NO-REACT BIOMODIFICATION*. A solução é constituída de AAO, Sódio Dodecil Sulfato e Difosfonatos, entretanto o GDA permanece como agente esterilizante final em todos estes métodos de tratamento. Este trabalho utilizou o modelo in vitro e subcutâneo de ratos. O *NO-REACT BIOMODIFICATION* revelou significativa redução da calcificação in vitro. No modelo experimental havia atenuada calcificação, mas com prolongada resposta inflamatória em forma de células gigantes e infiltrado mononuclear associado a destruição intrínseca do colágeno do tecido tratado com GDA.

No tratado com *NO-REACT BIOMODIFICATION*, com leve reação inflamatória, a morfologia permaneceu íntegra.

2.9.3 ÁCIDO L-GLUTÂMICO

GRIMM et al⁽³⁴⁾, estudaram a biocompatibilidade do aldeído fixado ao pericárdio bovino. Fizeram uma avaliação in vitro e in vivo visando a melhoria das biopróteses. O pericárdio bovino foi tratado com ácido L-glutâmico no pH 3,0.

A taxa de calcificação do pericárdio bovino tratado com ácido L-glutâmico foi significativamente menor comparada com a das biopróteses disponíveis no mercado. Este tratamento também resultou em melhora significativa da compatibilidade das células endoteliais, que indica sucesso na diminuição da toxicidade do grupo aldeído no interior do tecido. A melhora da compatibilidade com este tratamento pode ser devida à ligação química estável com o grupo aldeído livre reativo.

GRIMM et al⁽³⁵⁾ ainda estudando a melhora da biocompatibilidade das biopróteses tratadas com ácido L-glutâmico, mostraram que a calcificação foi marcadamente reduzida, quando comparada com a das biopróteses comercialmente disponíveis. Para testar a influência da liberação tóxica dos grupos aldeídos no crescimento de células endoteliais in vivo, foram utilizados enxertos de pericárdio bovino tratados com ácido L-glutâmico, interpostos em carótidas de carneiros. Três meses pós-implante, os achados foram que 49% ± 20% da superfície da pericárdio preservado de maneira convencional estava coberto com trombos, mas apenas 12% ± 5% do pericárdio tratado com ácido L-glutâmico os apresentavam.

GRABENWOGER et al⁽³⁶⁾, pesquisaram a diminuição da reação tecidual das biopróteses após o tratamento com ácido L-glutâmico. O estudo morfológico, objetivou avaliar as ligações químicas dos grupos aldeídicos reativos com o ácido L-glutâmico e com isto verificar se existe melhora da biocompatibilidade do material da bioprótese. Utilizaram o modelo experimental em ratos da linhagem Sprague-Dawley. Foi um estudo comparativo entre biopróteses comercialmente disponíveis e as tratadas com ácido L-glutâmico. Após 63 dias do implante, a calcificação foi significativamente menor no grupo tratado com ácido L-glutâmico.

Nas biopróteses fixadas de maneira convencional as investigações ultra-estruturais mostraram núcleo em forma de placa de hidroxiapatita na superfície das fibras colágenas e nas células remanescentes do tecido conjuntivo. Nenhum sinal da calcificação foi detectado no grupo tratado com ácido L-glutâmico. A reação inflamatória alcançou o máximo de atividade no 42º dia após implante.

A taxa de infiltrado inflamatório, foi marcadamente diminuída no grupo tratado com ácido L-glutâmico.

2.9.4 OUTROS AMINOÁCIDOS

JORGE-HERRRERO et al⁽³⁷⁾, estudaram a calcificação do tecido pericárdico tratado com diferentes aminoácidos. Os pericardios de bezerras jovens foram tratados com os ácidos: L-lisina, L-glutâmico, L-arginina, e L-glutamina. Os tecidos foram implantados em ratos jovens da linhagem Wistar, com peso variando de 100 a 110 gramas. Estudaram 40 fêmeas e o período de observação foi 21 e 60 dias. Após este período o cálcio foi quantificado pela espectrometria por absorção atômica. Apenas as amostras de 21 dias tratadas com L-lisina e L-arginina tinham menos cálcio acumulado do que o controle com GDA. Após 60 dias, todos os grupos mostraram altos níveis de cálcio depositado.

KOUTSOPOULOS et al⁽³⁸⁾, pesquisaram a calcificação das biopróteses porcinas e da válvula cardíaca humana, testando vários inibidores para antiminerização. Neste estudo in vitro as válvulas foram tratadas com três aminoácidos (fenilalanina, ácido aspártico e ácido glutâmico) e quatro com diclorido metaloceno. Ambas válvulas porcina e humana foram substrato para que o fosfato de cálcio pudesse nuclear e crescer. A formação inicial do fosfato de cálcio pode ser via absorção de fosfato inorgânico do polímero biológico da matriz dos folhetos. Estas substâncias reduziram a taxa de crescimento dos cristais de fosfato de cálcio.

Este efeito inibitório pode ser explicado pela absorção e subsequente bloqueio dos sítios de atividade de crescimento.

2.9.5 DIFOSFONATOS

LEVY et al⁽³⁹⁾, estudaram a inibição da calcificação de biopróteses porcinas por compostos difosfonatos (estudo experimental em ratos jovens). O etanohidroxidifosfonato, foi administrado em injeções diárias (25mg/kg/24hr) por 21 dias e inibiu a calcificação quando comparado com o controle com GDA, mas causou um retardo do crescimento somático alteração do desenvolvimento epifisário. Entretanto, administração local do etanohidroxidifosfonato por bomba osmótica (5mg/kg/24hr), implantado em contato direto com a cúpide porcina por 14 dias preveniu a calcificação, sem efeitos adversos. Concluíram que os difosfonatos inibiram a calcificação, e que os efeitos adversos na terapia sistêmica pode ser evitado pela administração local.

2.9.6 CARBODIAMIDA

EVERAERTS et al⁽⁴⁰⁾, estudaram a redução da calcificação das biopróteses baseada no método de ligação com carbodiamida. Esta substância não age ligando-se ao grupo amino livre, mas sim bloqueando estes grupos com butanal e o tecido então liga-se por meio de ativação da carbodiamida com o grupo carboxílico do tecido, seguido pela reação com polipropilenoglicol e 2-aminopropiléter (experimento realizado em ratos Sprague-Dawley). A calcificação na parede aórtica foi reduzida para 50mg/grama de tecido, comparada à fixação convencional com GDA, que mostrou 120mg/grama em oito semanas pós-implante.

ZILLA et al⁽⁴¹⁾, pesquisaram se o tratamento com carbodiamidas potencializa o efeito anticalcificante do ácido 2-aminooleico em parede de biopróteses porcinas fixadas em glutaraldeído. Estas carbodiamidas ligam-se termino-terminalmente com o glutaraldeído e o composto formado pode ser o inibidor da calcificação.

Neste estudo este composto formado ligou-se ao AAO e esta ligação foi proposta em aumentar o efeito anticalcificante na parede de biopróteses porcinas.

2.9.7 ETANOL

VYAVAHARE et al⁽⁴²⁾, estudaram a prevenção da calcificação das biopróteses pelo tratamento com o etanol. A eficácia seria por alterações de proteínas estruturais e extração lipídica da membrana das células. O estudo utilizou o modelo experimental em ratos Sprague-Dawley e em carneiros. Os resultados demonstraram completa inibição da calcificação das cúspides das biopróteses porcinas fixadas em GDA e tratadas com etanol 80% aos 60 dias do implante (nível de cálcio $1,87 \pm 0,29 \mu\text{g}/\text{mg}$ em implante subcutâneo de ratos e de $5,22 \pm 2,94 \mu\text{g}/\text{mg}$ no modelo circulatório. O mecanismo da inibição pelo etanol pode ser uma alteração irreversível na amida banda I notada pelo espectromêtro infravermelho por ambos colágeno tipo I purificado e GDA ligado (*cross-linked*) aos folhetos das válvulas aórticas porcinas. O etanol também resultou em uma quase completa extração do colesterol e fosfolípídeos dos folhetos.

VYAVAHARE et al⁽⁴³⁾, estudaram a prevenção da calcificação das cúspides aórticas porcinas fixadas em glutaraldeído e tratadas com etanol. Estudo mecânico das proteínas estruturais e relações da água com biomateriais (estudo em ratos Sprague-Dawley). Foi usada a ressonância nuclear magnética com emissão de próton para avaliar os efeitos do etanol no tecido contendo água. As amostras das cúspides foram estudadas pela mudança de conformação das proteínas devido ao etanol (avaliação feita pela espectroscopia infravermelha). A estabilidade material da cúspide foi avaliada em termos de resíduo contendo GDA e degradação pela colagenase. O conteúdo de água da amostra da cúspide foi diminuindo significativamente pelo tratamento com etanol. A mudança conformacional do colágeno da cúspide mostrou que o efeito do tratamento com etanol foi persistente mesmo após sete dias de implante. O tratamento das cúspides com etanol também resultou em aumento da resistência à digestão pela colagenase. O conteúdo cuspidal de GDA não foi mudado pelo tratamento com etanol. Concluíram que o tratamento das cúspides das biopróteses porcinas com etanol causa efeitos múltiplos nos tecidos, e nas características macromoleculares, o que em parte pode ser explicado pelo mecanismo anticalcificante do etanol.

LEE et al⁽⁴⁴⁾, estudaram a inibição da calcificação da parede aórtica das biopróteses porcinas pelo tratamento com etanol. Abordaram os mecanismos biomecânicos e biofísicos. Utilizaram o modelo circulatório e do subcutâneo de ratos. O tratamento com etanol inibiu significativamente a calcificação da parede das biopróteses porcinas, mas não por completo. O máximo da inibição da calcificação da parede das biopróteses porcinas foi alcançado usando o tratamento com álcool 80%.

O aumento do tempo de exposição ao etanol não melhora o efeito inibitório na calcificação da parede aórtica. No modelo circulatório, o etanol inibiu parcialmente a calcificação. A espectroscopia infravermelha demonstrou mudança significativa na estrutura da proteína devida ao tratamento com etanol. O conteúdo de água do tecido da parede aórtica foi avaliado pela ressonância nuclear magnética, mas não mudou significativamente com o tratamento com etanol. A condição ótima do tratamento com etanol 80%, extraiu quase completamente os fosfolípidos e colesterol da parede aórtica. Apesar disto, ocorreu calcificação. A conclusão foi que serão necessárias combinações sinérgicas com outros agentes para conseguir um efeito inibitório total.

SONCINI DA ROSA et al⁽¹²⁾, estudaram experimentalmente, a eficácia do etanol 80% e do ácido L-glutâmico 0,8% na prevenção da calcificação das cúspides e parede aórtica porcina: estudo experimental em ratos Wistar. Analisaram os níveis de cálcio e o infiltrado inflamatório nos períodos de 15, 30 e 60 dias do implante. Os valores de cálcio encontrados na cúspide do grupo etanol 80% foram: com 15 dias ($1,30 \pm 0,21$ mg/mg de tecido) , 30 dias ($1,05 \pm 0,22$ mg/mg de tecido) e 60 dias ($0,53 \pm 0,42$ mg/mg de tecido). No grupo com ácido L-glutâmico 0,8% foram: 15 dias ($12,17 \pm 0,66$ mg de cálcio/mg tecido), 30 dias ($15,31 \pm 2,82$ mg cálcio/mg tecido) e 60 dias ($34,24 \pm 16,28$ mg cálcio/mg tecido). No grupo controle (GDA) os valores foram: 15 dias ($12,44 \pm 2,26$ mg cálcio/g tecido, 30 dias ($13,44 \pm 3,34$ mg cálcio/mg tecido e 60 dias ($50,85 \pm 8,71$ mg cálcio/mg tecido).

Na parede aórtica porcina os valores foram: grupo etanol 80% com 15 dias ($4,62 \pm 0,68$ mg cálcio/mg tecido) 30 dias ($9,47 \pm 2,59$ mg cálcio/mg tecido) e 60 dias ($23,56 \pm 7,75$ mg cálcio/mg tecido).

No grupo ácido L-glutâmico 0,8% foram: 15 dias ($4,31 \pm 0,85$ mg cálcio/mg tecido), 30 dias ($7,69 \pm 1,48$ mg cálcio/mg tecido) e 60 dias ($20,50 \pm 1,22$ mg cálcio/mg tecido). No controle com GDA foram: 15 dias ($7,34 \pm 1,32$ mg cálcio/mg tecido), 30 dias ($9,28 \pm 0,76$ mg cálcio/mg tecido) e 60 dias ($27,60 \pm 1,08$ mg cálcio/mg tecido). No estudo histológico as cúspides aórtica apresentaram uma progressiva calcificação no grupo controle (GDA). Este processo foi parcialmente encontrado com ácido L-glutâmico e totalmente ausente com etanol 80% .

Na parede aórtica houve progressiva calcificação em todos os grupo, ou seja, não foi inibida pelos tratamentos com etanol e ácido L-glutâmico. A reação inflamatória no tratamento com ácido L-glutâmico foi focal no período de 60 dias Na parede aórtica foi focal em todos os períodos. Concluíram que o tratamento com etanol a 80% inibiu a calcificação nas cúspides das biopróteses porcinas, entretanto, não teve a mesma eficácia na parede aórtica.

PATHAK et al⁽⁴⁵⁾, pesquisaram o tratamento dos tecidos das biopróteses com soluções alcoólicas com longas cadeias para diminuir a potencial calcificação (estudo experimental em ratos Sprague-Dawley). Estes autores propuseram que usando uma cadeia curta e longa de álcool combinadas, compostas de 5% 1,2-octanediol em uma solução tampão alcoólica, reduzir-se-ia o conteúdo fosfolipídico e subseqüentemente diminuiria a propensão destes tecidos à calcificação

2.9.8 ÍONS METÁLICOS TRIVALENTES

WEBB et al⁽⁴⁶⁾, estudaram a inibição da calcificação das biopróteses de pericárdio bovino com o alumínio (estudo experimental em subcutâneo de ratos). As biopróteses foram incubadas em 0,1 M $AlCl_3$ por 24 horas, então implantadas no subcutâneo de ratos por 21 dias.

A calcificação foi marcadamente reduzida no grupo tratado com alumínio. Nenhum efeito adverso foi detectado no crescimento do rato ou na morfologia óssea. Concluíram que o cátion trivalente Al^{+++} apresentou um marcado efeito anticalcificante.

PATHAK et al⁽⁴⁷⁾, estudaram a prevenção da calcificação das biopróteses de pericárdio bovino pela liberação controlada de polímeros: estudo do ferro (Fe^{+++} , Al^{+++} , sulfato de protamina e levamisol). Estudo experimental em ratos. Ambos ferro e alumínio inibiram o crescimento e a dissolução dos cristais de hidroxiapatita. O levamisol inibiu a fosfatase alcalina e o sulfato de protamina foi um modificador de cargas. Todos foram incorporados a vários polímeros (silicone, poliuretano).

Os implantes dos polímeros incorporados de ferro e alumínio foram os mais efetivos na inibição dos depósitos do cálcio. O alumínio (Al^{+++}) demonstrou 82% de inibição comparado ao controle (GDA) e o ferro resultou em 80% de inibição. Colorações específicas mostraram que ferro (Fe^{+++} e Al^{+++}) localizaram-se dentro de células desvitalizadas dos tecidos das biopróteses. Nenhum efeito adverso no crescimento somático ou na morfologia óssea foi detectado. A liberação controlada de sulfato de protamina e levamisol não inibiu significativamente a calcificação.

WEBB et al⁽⁴⁸⁾, pesquisaram os efeitos da ligação do alumínio e cátions metálicos na calcificação de biopróteses de pericárdio bovino em subcutâneo de ratos. Foi avaliado o cloreto de alumínio AlCl_3 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} M) incubado, para inibir a calcificação após 21 dias de implante. Outro estudo investigou a capacidade de outros cations metálicos (Fe^{+++} , La^{+++} e Ga^{+++}) usados como tratamento para inibir a calcificação de biopróteses de pericárdio bovino fixadas em GDA após 21 dias de implante. Concluíram que o alumínio inibiu a calcificação uma hora após a incubação. Nenhuma evidência foi observada de que o alumínio foi tóxico. O ferro inibiu a calcificação, mas o La^{+++} ou Ga^{+++} não inibiram a calcificação em 21 dias de implante.

WEBB, et al⁽⁴⁹⁾, estudaram a inibição da calcificação das biopróteses de pericárdio bovino fixadas em glutaraldeído e tratadas com cloreto de alumínio(AlCl_3). O estudo fez comparações com FeCl_3 , LaCl_3 e $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e seu mecanismo da ação(estudo experimental em ratos).

As análises das amostras das biopróteses pré-incubadas em cloreto de alumínio($0,1\text{mol/l}$, 24 horas) mostraram que mais que 75% do alumínio permanece fortemente ligado, após 60 dias de implante, inibindo a calcificação. Todos os animais estavam livres de efeitos adversos destas substâncias.

Na microscopia eletrônica foi demonstrada localização focal do alumínio no sarcolema, citoplasma e membranas nucleares desvitalizadas. Os resultados com ferro foram semelhantes na inibição da calcificação, mas o Ga^{+++} La^{+++} não foram eficazes. Pela coloração com azul da Prússia foi demonstrado ferro localizado dentro de células desvitalizadas.

Os autores concluíram que Fe^{+++} , Al^{+++} inibem significativamente a calcificação das biopróteses de pericárdio bovino fixadas em GDA, pelos mecanismos que são relacionados à alta afinidade desses cátions com associações da membrana celular e outros sítios intracelulares.

LEVY et al⁽²⁸⁾, pesquisaram a inibição da calcificação nas biopróteses, em estudo da atividade da fosfatase alcalina e sua inibição pelo cloreto de alumínio ($AlCl_3$) ou cloreto de ferro ($FeCl_3$) incubados. Nas biopróteses incubadas com $AlCl_3$ ou $FeCl_3$ não apenas preveniu a calcificação, mas também resultou na redução da atividade da fosfatase alcalina. Isto sugere fortemente que a fosfatase alcalina é um importante cofator no mecanismo de mineralização e pode ser efetiva em tratamentos anticalcificantes.

VYAVAHARE et al⁽⁵⁰⁾, estudaram a calcificação da elastina e sua prevenção pelo tratamento com cloreto de alumínio ($AlCl_3$). A elastina, uma abundante proteína estrutural presente na parede arterial, é propensa à calcificação em vários processos patológicos, incluindo a calcificação das biopróteses porcinas e aterosclerose. O mecanismo de calcificação da elastina não é completamente elucidado. O estudo demonstrou a calcificação da elastina purificada em implante subcutâneo de ratos Sprague-Dawley. Os resultados demonstraram que o tratamento com $AlCl_3$ da elastina levou a completa inibição da calcificação da elastina aos 21 dias de implante. O $AlCl_3$ causou ligação irreversível dos íons alumínio com a elastina. Entretanto, os íons alumínio ligados alteraram a configuração espacial da elastina. Concluíram que a elastina purificada calcifica em subcutâneo de ratos, e que o tratamento da com $AlCl_3$ impede completamente a calcificação.

VASUDEVet al⁽⁵¹⁾, estudaram a inibição da calcificação das biopróteses pelo efeito sinérgico dos íons ferro (Fe) e magnésio (Mg) no enxerto de pericárdio bovino montado em polietilenoglicol (PEG). A microscopia eletrônica mostrou aos 21 dias de implante marcada calcificação nas biopróteses fixadas em GDA (grupo controle). Entretanto, o enxerto de pericárdio bovino montado em polietilenoglicol (PEG) e a liberação de Fe/Mg provocaram inibição substancial dos depósitos de cálcio. A atividade da fosfatase alcalina também foi reduzida nos enxertos de pericárdio bovino montado em polietilenoglicol (PEG) e liberação de íons metálicos nas biopróteses. A fosfatase alcalina mostrou pico de atividade nas 72 horas pós implante, mas marcadamente reduzida aos 21 dias. Os altos níveis iniciais podem ser devidos à injúria do tecido pela operação. Isto mostra que os íons Fe⁺⁺ e Mg⁺⁺ podem diminuir ou retardar lentamente o processo de calcificação.

BAILEY et al⁽⁵²⁾, estudaram se o tratamento da elastina com cloreto de alumínio inibe a elastólise pelas metaloproteinases da matriz e leva a inibição da calcificação da elastina. Os implantes subcutâneos de elastina tratada com AlCl₃ mostraram baixa atividade da MMP-9 (metaloproteinase da matriz) e MMP-2 ao redor do implante quando comparado com o grupo controle(GDA). O tratamento com AlCl₃ também inibiu significativamente a calcificação da elastina implantada aos sete dias. Entretanto, o estudo gel zimográfico da elastina mostrou que o tratamento com AlCl₃ inibiu a elastólise pela MMP-9. Foi demonstrada supressão da atividade da MMP-2 nos segmentos de parede aórtica porcina das biopróteses tratadas pelo AlCl₃. O tratamento com AlCl₃ também inibiu significativamente a calcificação da elastina no modelo circulatório. Concluíram que o alumínio ligado à elastina previne elastólise mediada pela MMP e então previne a calcificação da elastina.

OGLE et al⁽⁵³⁾, estudaram a resistência à calcificação de biopróteses porcinas tratadas com etanol-alumínio em carneiros jovens e em subcutâneo de ratos. As amostras foram explantadas do subcutâneo de ratos aos 21 e 60 dias e as do modelo circulatório aos 90 dias. Os explantes demonstraram que a exposição seqüencial ao AlCl₃ e etanol inibiu completamente a calcificação das cúspides e parede aórtica porcina quando comparado com o controle (GDA).

A diferença ocorreu no carneiro (modelo circulatório) que exibiu níveis muito baixos de cálcio nas cúspides e parede. O grupo controle (GDA) exibiu pouca calcificação nas cúspides, mas proeminente na parede aórtica porcina. Concluíram que a combinação do etanol-alumínio reduziu significativamente a calcificação da parede e preveniu a calcificação das cúspides. Além disso, este estudo demonstrou que a exclusão do alumínio do tratamento das cúspides mantendo a exposição ao etanol elimina a calcificação.

CLARK et al⁽⁵⁴⁾, estudaram a prevenção da calcificação das cúspides e parede aórtica porcina das biopróteses com etanol e cloreto de alumínio. As biopróteses porcinas foram tratadas com etanol e alumínio. Os segmentos de parede foram tratados exclusivamente com $AlCl_3$ por 45 minutos, seis horas e oito horas, seguida à incubação das cúspides no etanol 80%, pH 7,4. Concluíram que separadamente aplicado o etanol e o cloreto de alumínio, inibem significativamente a calcificação em cúspide e parede.

3 MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos laboratórios da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), da Cardioprótese Ltda, de Patologia Experimental da PUC-PR e no Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento (LACTEC).

Foram adotadas as Normas de Apresentação de Trabalhos de Vancouver⁽⁵⁵⁾ e a Nômina Anatômica Veterinária⁽⁵⁶⁾. Respeitaram-se os princípios éticos de experimentação animal, conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal⁽⁵⁷⁾.

O Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUC-PR aprovou este experimento sob o registro no CEPA/PUC-PR nº 94

3.1 PRÓTESES VALVARES PORCINAS

3.1.1 OBTENÇÃO DAS VALVAS AÓRTICAS PORCINAS

Foram utilizadas 15 valvas aórticas porcinas obtidas no Abatedouro Basso em Curitiba-PR, imediatamente após o abate e liberação pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). Ainda no abatedouro, as valvas foram dissecadas de forma a se obter um conduto valvado, consistindo da valva aórtica e da porção inicial da aorta ascendente com aproximadamente 3cm de comprimento. As peças foram lavadas com solução salina isotônica e transportadas em solução gelada a 4º C de Ringer Lactato até o laboratório, onde foram processadas.

3.1.2 PROCEDIMENTO QUÍMICO

Em todos os grupos os condutos valvados aórticos foram previamente fixados em GDA 0,5% em solução tampão fosfato, com pH 7,4, por 72 horas, em temperatura ambiente (fixação padrão). Após a fixação inicial, as valvas foram distribuídas em 3 grupos distintos, de acordo com o tratamento químico adicional (Tabela 1).

As valvas do grupo I ou grupo controle, receberam o tratamento convencional empregado em biopróteses comercialmente disponíveis, isto é, após a fixação inicial com GDA 0,5%, foram estocadas em solução tamponada com GDA 0,2% até o momento do implante.

Para as valvas dos grupos II e III após fixação inicial com GDA 0,5%, foram colocadas em frascos de vidro estéril e lavadas com 500ml de solução fisiológica de NaCl 0,9%(SSI) durante 15 minutos a 37° C, sob agitação contínua (Shaker- Quimis-Q225M) a 1700rpm, repetindo-se a lavagem três vezes para remover todo GDA residual.

Após a lavagem as valvas do grupo II, receberam tratamento com solução de AlCl₃ 0,1M, pH 3,0 em frasco estéril, durante 105 min, sob agitação a 1700rpm a 37°C, com troca de solução em 50 minutos e estocadas em SSI.

Já as valvas do grupo III receberam tratamento com etanol a 80% por 24 horas, seguido-se tratamento com AlCl₃ 0,1M, pH 3,0, durante 105 min, sob agitação a 1700rpm a 37°C, com troca de solução em 50 minutos e também estocadas em SSI.

Terminado o tratamento químico, foram obtidos segmentos quadrangulares da parede arterial dos condutos retirados da aorta ascendente, logo acima da junção sinotubular e medindo aproximadamente 0,5cm², com espessura em torno de 4 a 6 mm, (medidos com o paquímetro) os quais foram pesados antes do implante (Balança Metler-Toledo).

Tabela 1- Tratamento das valvas aórticas porcinas nos diferentes grupos

<i>Grupo</i>	<i>Fixação tecido(Tempo I)</i>	<i>do 0,5%</i>	<i>Tratamento adicional(Tempo II)</i>	<i>Estocagem(Tempo III)</i>
I	GDA 72horas	0,5%	-	GDA 0,2%
II	Em GDA por 72 horas	0,5%	AlCl ₃ 0,1M, pH 3,0, 105min	SSI
III	Em GDA por 72 horas	0,5%	Etanol 80% 24 horas + AlCl ₃ 0,1M, pH 3,0, 105min	SSI

3.2 MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 15 ratos (*Ratus norvergicus*) com 21 dias de idade da linhagem Sprague-Dawley. O peso variou entre 50 e 70 gramas. Os animais foram obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade de Campinas (CEMIB-UNICAMP)

Foram divididos em três grupos de cinco animais cada (I, II, III), de acordo com o tipo de tratamento químico dos fragmentos de parede aórtica porcina, demonstrado na tabela I.

Em cada animal foram implantados três segmentos de conduto aórtico, sendo um na região lombar (L), outro na região tóraco-lombar (TL) e o último na região escapular (E). Os fragmentos foram subsequentemente explantados com 15, 30 e 60dias, respectivamente⁽¹²⁾.

Todos os procedimentos foram feitos com anestesia, sendo que por ocasião do último explante, os animais foram sacrificados..

Tabela 2- Distribuição dos ratos em grupos

<i>Grupos</i>	<i>Tratamentos</i>	<i>Tempo de Observação</i>
I	GDA n=5	15dias-L 30dias-TL 60dias-E
II	GDA +ALUMÍNIO n=5	15dias-L 30 dias-TL 60 dias-E
III	GDA+ALUMÍNIO+ETANOL n=5	15dias-L 30dias-TL 60 dias-E

GDA- Glutaraldeído L-Lombar TL-Tóraco-Lombar E-Escapular

3.3 PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO

Os ratos foram mantidos no biotério da PUC-PR em caixas, agrupados em cinco animais, onde receberam ração balanceada para espécie (Nuvitab CR1®), água potável, condições de temperatura de $20\pm 2^{\circ}$ C e luminosidade com ciclos claro/escuro de 12 horas.

3.4 ANESTESIA

Foram utilizados a associação de cetamina (Konig) na dose de 50mg/Kg e xilasina (Bayer) na dose de 10mg/kg, administradas por via intramuscular para indução e manutenção da anestesia

3.5 TÉCNICA OPERATÓRIA

Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre pranchas cirúrgicas, com os quatro membros em abdução, fixados às pranchas por meio de esparadrapo.

Tricotomia da região dorsal alta, com tricótomo elétrico. Limpeza mecânica e antissepsia da região operatória com polivinilpirrolidona-iodo 1%, seguida da colocação de campo cirúrgico estéril fenestrado sobre a área a ser operada.

Foram feitas três incisões verticais paramedianas: a primeira ao nível da escápula, a segunda toraco-lombar e a terceira lombar. As incisões compreenderam toda espessura da pele, com aproximadamente 1,5 cm de comprimento. Cuidadosa e restrita dissecação do tecido subcutâneo proveu lugar para os implantes. Foram colocados os fragmentos de parede aórtica no lado direito, ambos de forma quadrada, com 0,5 cm² de área. Cada animal recebeu três implantes, obedecendo a seguinte ordem: os implantes que seriam mantidos por quinze dias ficaram na região lombar, os que foram mantidos trinta dias na região tóraco-lombar e os mantidos sessenta dias na região escapular.

A sutura da pele foi realizada com dois pontos simples de fio de mononylon 3.0®.



Figura 1- Animal anestesiado pronto para receber os implante

3.6 OBSERVAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

Após as operações, os ratos foram marcados com canetas dermatográficas e colocados em caixas. Em cada caixa ficaram cinco animais, todos do mesmo grupo. Os ratos foram mantidos com alimentação "ad libidum" e cuidados usuais do biotério. Para analgesia foi utilizado dipirona via oral, na dose de 1mg/kg, por 48 horas.

Para explante dos fragmentos de conduto aórtico porcino foi repetido o procedimento de implante. Após a incisão da pele, foram retirados os espécimes. Este procedimento foi repetido por três vezes em cada animal (15, 30 e 60 dias), sendo que no último procedimento os animais foram sacrificados por indução de morte com dióxido de carbono em dessecador de vidro conectado ao cilindro de CO₂.

Os fragmentos de conduto aórtico foram explantados, e divididos em duas partes. Da primeira foram confeccionadas lâminas para estudo histopatológico, sendo que a segunda, foi pesada e utilizada para quantificação de cálcio por espectroscopia de absorção atômica no LACTEC da UFPR.

3.7 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Os explantes foram fixados em solução de formalina a 10% e encaminhados para análise microscópica. O exame histológico foi realizado por um mesmo observador, sem conhecimento do grupo ao qual pertencia o espécime.

A preparação do material histológico seguiu os métodos de histotécnica adotados pelo Laboratório de Patologia da PUC-PR. Após a fixação em solução de formalina tamponada a 10%, o material da amostra foi desidratado pelo álcool etílico, em concentrações progressivas de 70% a 100%, clareado por impregnação com xilol e imerso em parafina a 60%, para constituição de blocos. Realizaram-se cortes de 2 a 4µm de espessura, corados com hematoxilina-eosina (HE) e alizarina.

Nas lâminas coradas por hematoxilina-eosina foram observadas as estruturas do tecido (matriz extracelular) e o infiltrado inflamatório, além de possíveis alterações histológicas que pudessem representar calcificação.

Para esse estudo, criamos, arbitrariamente, uma classificação para a quantificação do infiltrado inflamatório, que foi assim dividido: 0 – ausente , 1 – leve ou moderada , 2– intenso

Tabela 3- Classificação do infiltrado inflamatório

Tipo	Intensidade
0	Ausente
1	Leve a moderado
2	Intenso

Para a análise estatística da intensidade do infiltrado inflamatório entre os grupos, os infiltrados do tipo 0 e 1 foram unificados e comparados com os infiltrados do tipo 2.

Além da coloração HE, as amostras foram coradas com alizarina pH 4,2 (específico para corar cristais de fosfato e carbonato de cálcio) e com alizarina pH 7,0 (específico para corar cristais de oxalato de cálcio) para análise detalhada dos padrões de calcificação. A calcificação observada nas lâminas coradas com alizarina foi quantificada pela análise morfométrica. As aferições foram feitas pela análise de três áreas de cada lâmina: canto superior esquerdo (CSE), centro (C), canto inferior direito (CID). Utilizando a função de contagem e comparação de classes foram realizadas as análises dos tecidos, resultando em uma porcentagem de tecido calcificado por campo estudado. Marcaram-se em verde todas as estruturas características e coradas para calcificação. Marcaram-se em amarelo os tecidos não calcificados. Para estabelecer uma porcentagem de calcificação no tecido foi calculada a média aritmética dos três campos da mesma lâmina (Figura 2).

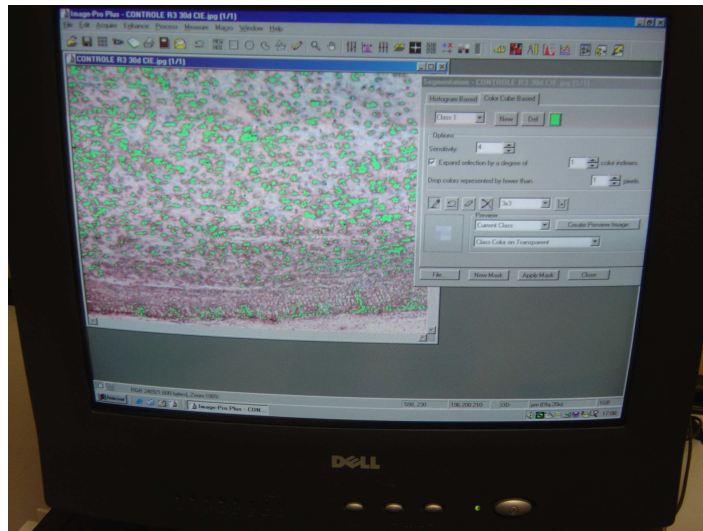


Figura 2- Computador DELL® com programa de morfometria (imagem Pro-plus) para quantificar calcificação. Aumento de 100X.

3.8 MENSURAÇÃO DO CÁLCIO

As amostras de parede aórtica foram submetidas a solubilização com ácido clorídrico em solução aquosa 50% e enviadas ao Laboratório do Instituto para o Desenvolvimento (LACTEC) da Universidade Federal do Paraná, aonde a determinação quantitativa do cálcio foi realizada por espectroscopia de absorção atômica, com espectrômetro Perkin Elmer®, 4100.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis analisadas foram a quantificação de cálcio por espectroscopia de absorção atômica assim como os dados de morfometria. Para a análise do infiltrado inflamatório, os tipos 0 e 1 foram unificados em um grupo, sendo o outro grupo constituído dos infiltrados do tipo 2.

Para a análise das variáveis de calcificação, os grupos foram comparados usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A avaliação do efeito do tempo foi realizada comparando-se os momentos de avaliação.

Para tanto, foi usado o teste não-paramétrico de Friedman e o teste não-paramétrico de Wilcoxon para as comparações múltiplas. Para a análise das variáveis relacionadas ao infiltrado inflamatório, na comparação dos grupos foi usado o teste exato de Fisher e na comparação dos momentos foi usado o teste binomial. O nível de significância adotado foi de 0,05. Nas comparações múltiplas foi usada a correção de Bonferroni ($p < 0,0167$ indicam significância estatística), mantendo-se assim, o nível global de 0,05.

4 RESULTADOS

Houve um óbito no pós-operatório imediato de um animal do grupo controle, causado por hipóxia. Todos os outros animais tiveram boa evolução e os explantes realizados nas datas preconizadas

4.1 ANÁLISE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO E FIBRAS DA MATRIZ EXTRACELULAR NOS CONDUTOS (CORTES HISTOLÓGICOS COM HE)

4.1.1 Grupo I

15 dias

Houve infiltrado inflamatório crônico, evidenciado pela presença de células mononucleares. As fibras da matriz extracelular permaneceram íntegras e com preservação de sua organização original, mantendo o sua orientação original e a proximidade uma da outras, sem evidencia de rompimento ou afastamento (Figura 3).

30dias

O infiltrado inflamatório esteve mais intenso e houve avanço deste para o centro dos implantes. Observou-se a presença de neovasos, caracterizando reação inflamatória crônica. As fibras da matriz extracelular mantiveram sua organização original, porém nas áreas com maior contato com o infiltrado inflamatório, pode-se evidenciar o rompimento de algumas das fibras.(Figura 4).

60 dias

Observou-se intenso infiltrado de células mononucleares. O infiltrado inflamatório penetrava cada vez mais para o centro dos implantes, danificando bastante o tecido.

Também observou-se a formação de neovasos, evidenciando reação inflamatória crônica. Nessa fase já se podia observar rompimento das fibras da matriz extracelular em áreas em contato com o infiltrado inflamatório. Pôde-se, também, evidenciar áreas mais pigmentadas, sugerindo calcificação.(Figura 5)

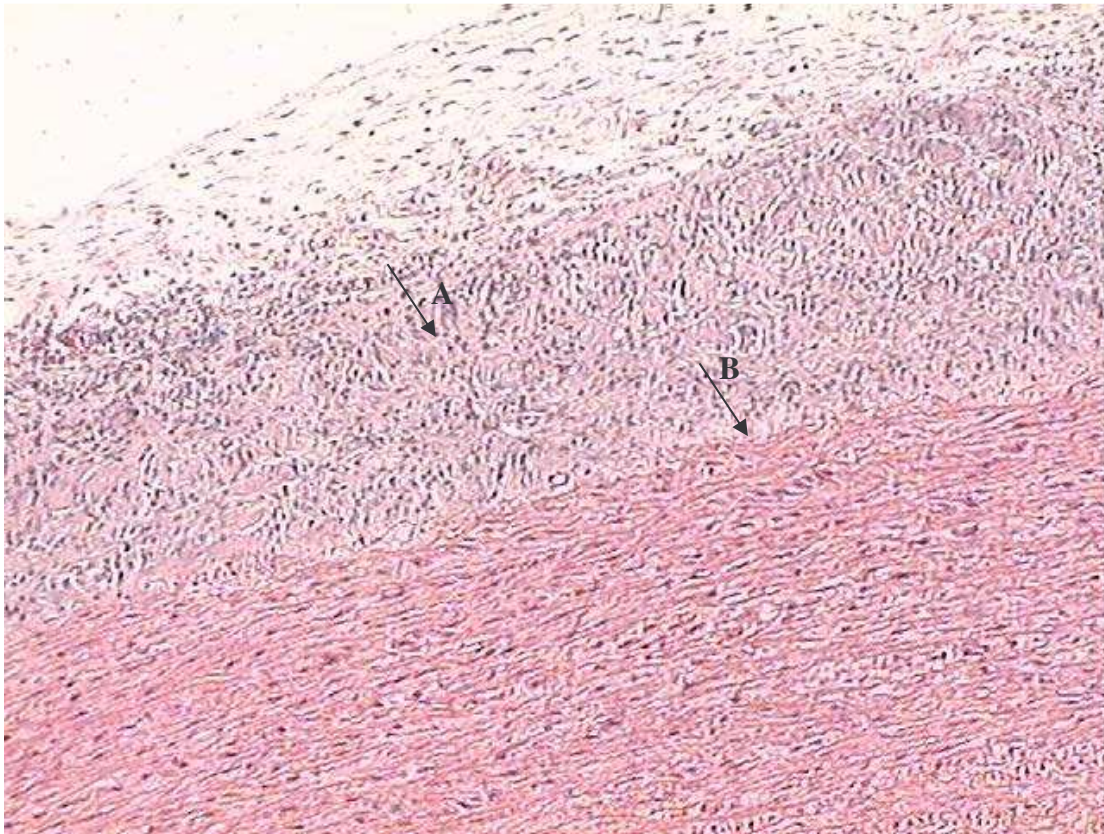


Figura 3- Fotomicrografia de conduto aortico do grupo I, com 15 dias de evolução. A seta A indica a região de infiltrado inflamatório evidenciada pela presença de células mononucleares. A seta B indica o início do conduto aórtico implantado. HE 100X

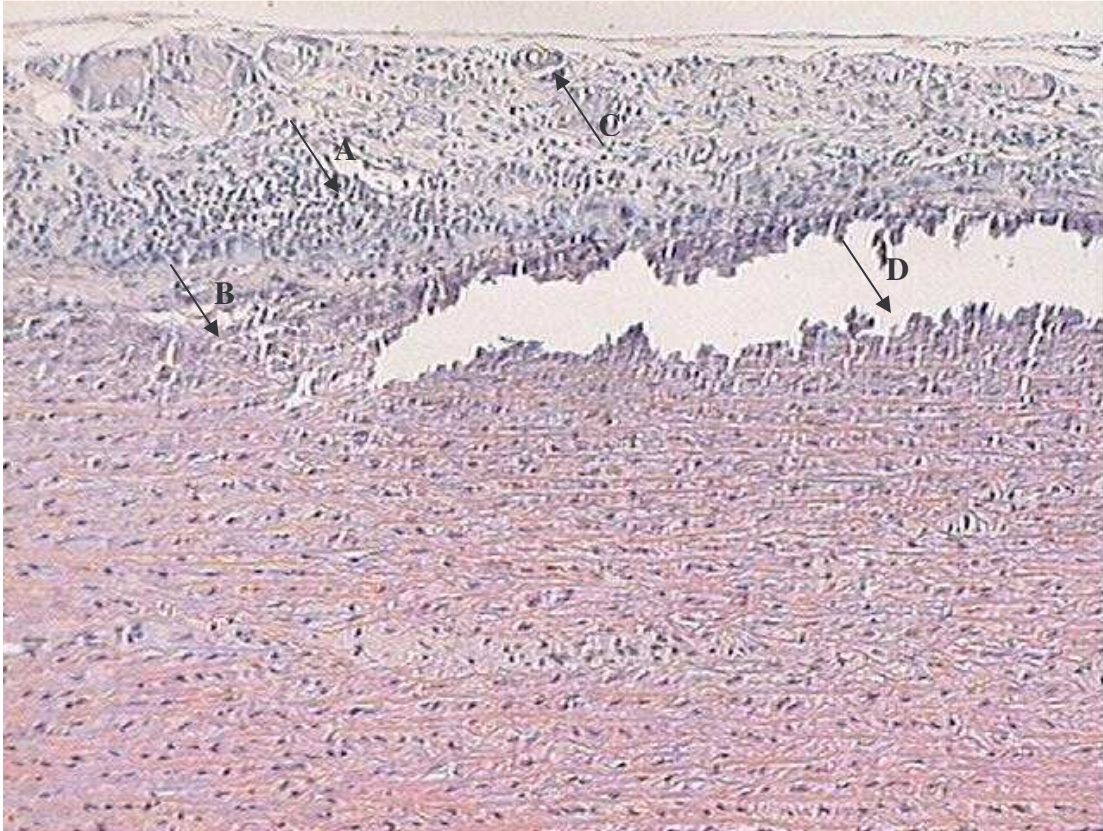


Figura 4- Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 30 dias de evolução. A seta A indica a região de infiltrado inflamatório evidenciada pela presença de células mononucleares. O infiltrado inflamatório está mais evidente e avança mais para o centro do implante. A seta B indica o início do conduto aórtico implantado. A seta C indica a formação de neovasos ao redor do implante que evidência um processo inflamatório crônico. A seta D, mostra região de rompimento das fibras da matriz extracelular por cristais de sais de cálcio. HE 100X

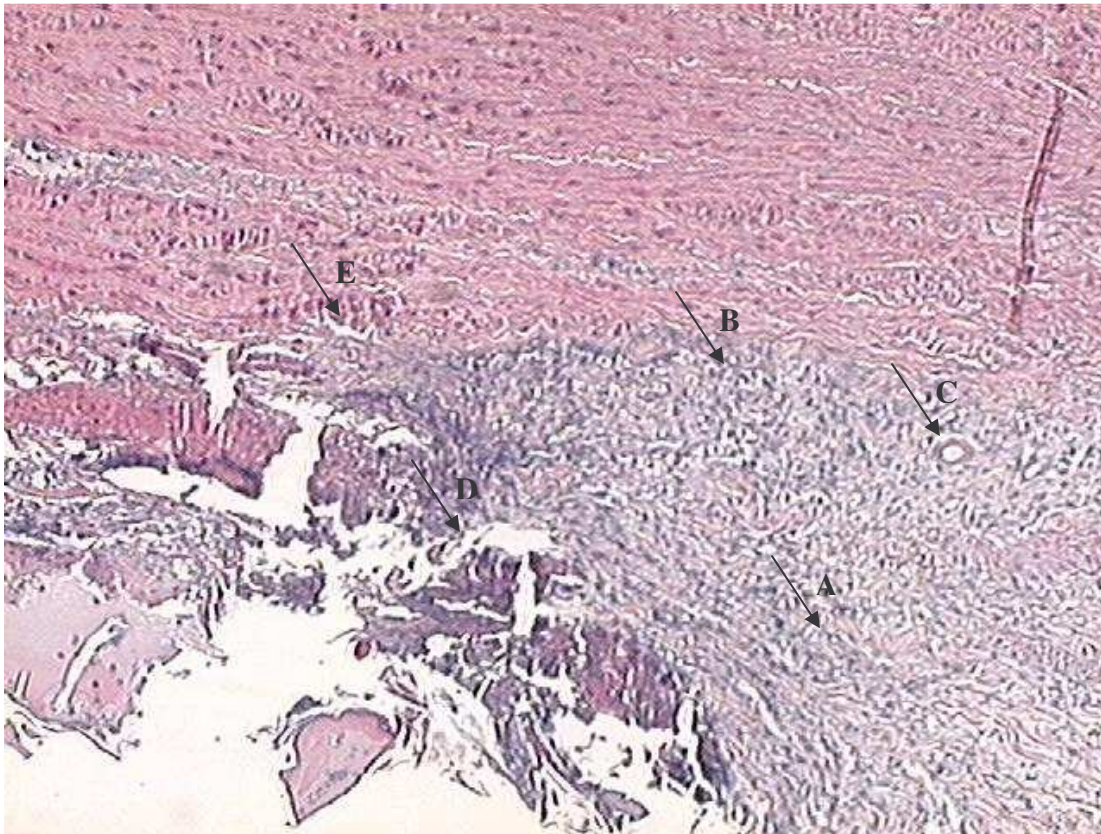


Figura 5-Fotomicrografia de conduto aortico do grupo I, com 60 dias de evoluçao. A seta A indica a região de infiltrado inflamatório evidenciada pela presença de células mononucleares. Nota-se que as células mudaram um pouco a morfologia devido ao tempo de reação. O infiltrado inflamatório avançou bastante para dentro do implante danificando uma grande área do tecido. A seta B indica o início do conduto aórtico implantado. A seta C indica a formação de neovasos ao redor do implante que evidência um processo inflamatório crônico. As fibras da matriz na área com contato com o infiltrado inflamatório apresenta uma região de rompimento, que se estendem ao redor do tecido, seta D. A seta E indica estruturas que sugerem uma calcificação no tecido, a calcificação que foi posteriormente confirmada na coloração com Alizarina. HE100X.

4.1.2 Grupo II

15 dias

No grupo II também observou-se a presença de células mononucleares, caracterizando reação inflamatória crônica. A organização das fibras da matriz extracelular estava preservada. Mesmo as fibras da matriz em contato com o infiltrado inflamatório permaneceram intactas.(Figura 6)

30dias

Mesmo com presença de reação inflamatória e formação de cápsula fibrótica, não houve avanço destas células para o interior dos implantes. Permaneceu a integridade organizacional das fibras da matriz extracelular, mesmo em contato com o infiltrado inflamatório.(Figura 7)

60 dias

As células mononucleares características de reação inflamatória crônica continuavam presentes, entretanto, ao contrário do que aconteceu no grupo I, não se evidenciou danos às fibras da matriz extracelular. (Figura 8)

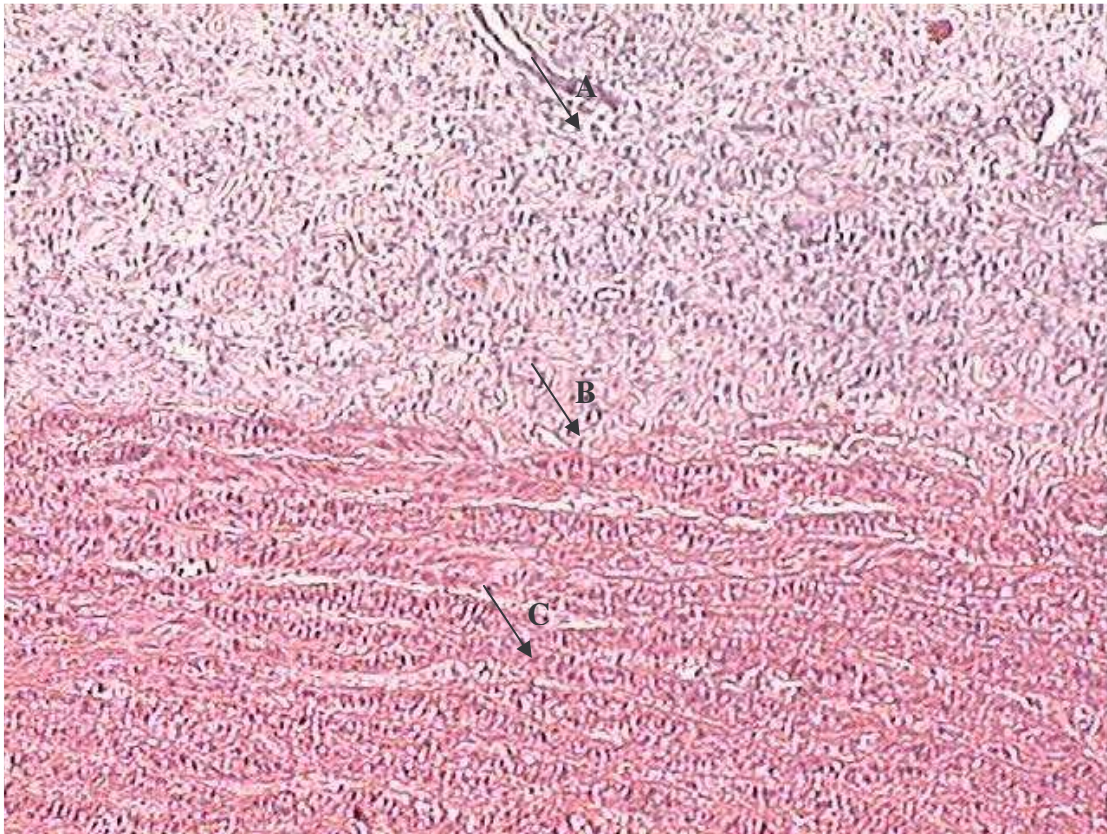


Figura 6. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 15 dias de evolução. A seta A indica a região de infiltrado inflamatório mononuclear. A seta B indica o início do conduto aórtico implantado. A seta C indica a organização das fibras da matriz integras. HE 100x.

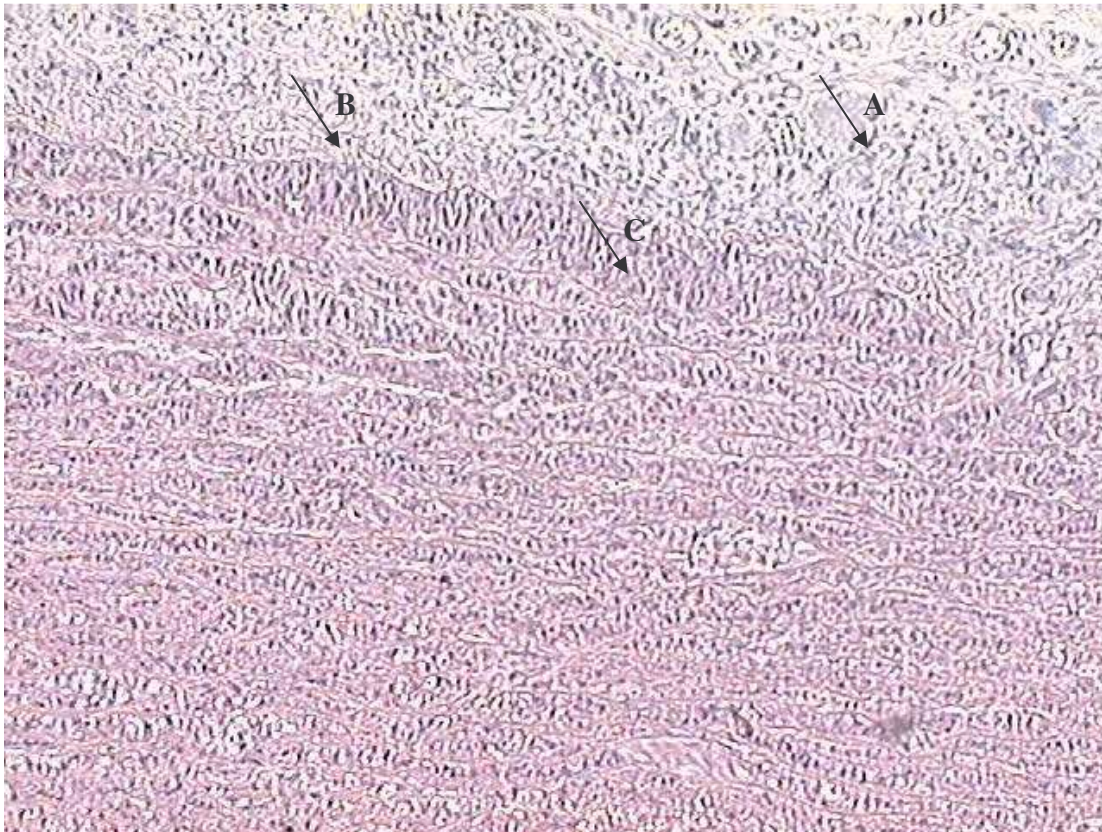


Figura 7. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 30 dias de evolução. A seta A indica a região de infiltrado inflamatório. Ao contrário daquilo observado nos condutos do grupo I, não houve um avanço de células do infiltrado para dentro do tecido. A seta B indica o início do conduto aórtico implantado. A seta C indica a organização das fibras da matriz integras. Nas fibras da matriz, na área com contato com o infiltrado inflamatório não se evidencia presença de dano. HE 100X.

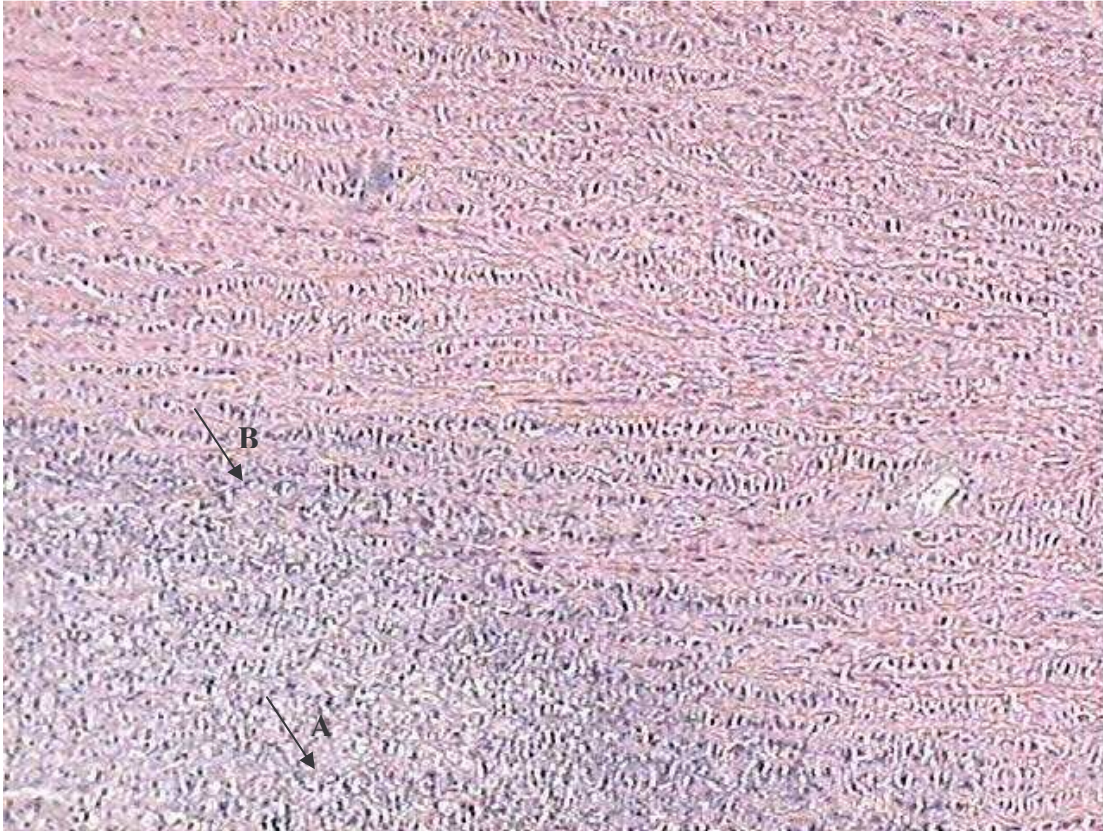


Figura 8. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 60 dias de evolução. A seta A indica a região de infiltrado inflamatório evidenciada pela presença de células mononucleares. Nota-se que as células mudaram e estão agrupadas formando um tecido que envolve o implante sem danificá-lo. A seta B indica o início do conduto aórtico implantado. HE 100X.

4.1.3 Grupo III

15dias

Ao contrário dos dois grupos anteriores, não foram observadas células inflamatórias. As fibras da matriz permaneceram organizadas e sem danos estruturais.(Figura 9).

30dias

Não houve evidência de infiltrado inflamatório. As fibras da matriz continuavam mantendo o padrão original de organização. Não foram observado sinais de calcificação.(Figura 10).

60dias

Mesmo após 60 dias, não houve presença de reação inflamatória. As fibras preservaram a sua organização original, mas em alguns implantes, foi possível observar pequenas áreas com rompimento, onde foram visibilizados pequenos agregados em forma de cristais e que eventualmente pudessem representar o início do processo de calcificação.(Figura 11).

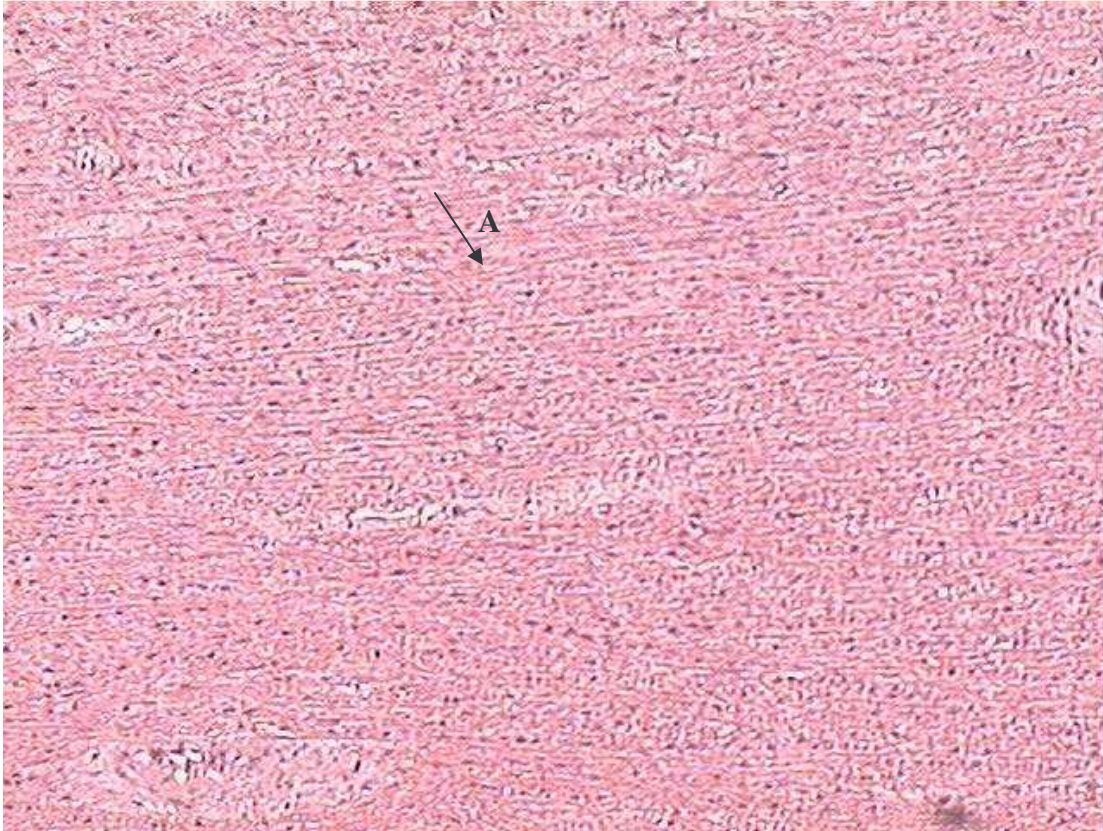


Figura 9- Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 15 dias de evolução. Não há presença evidente de infiltrado inflamatório. Nota-se que as fibras da matriz extracelular encontram-se organizadas e sem aparência de dano (seta A). HE 100X.



Figura 10- Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 30 dias de evolução. Não há presença evidente de infiltrado inflamatório. Nota-se que as fibras da matriz extracelular continuam mantendo o padrão original de organização e sem aparência de dano (seta A). Também não é possível visualizar focos de calcificação ou deposição de cristais de sais de cálcio. HE 100X

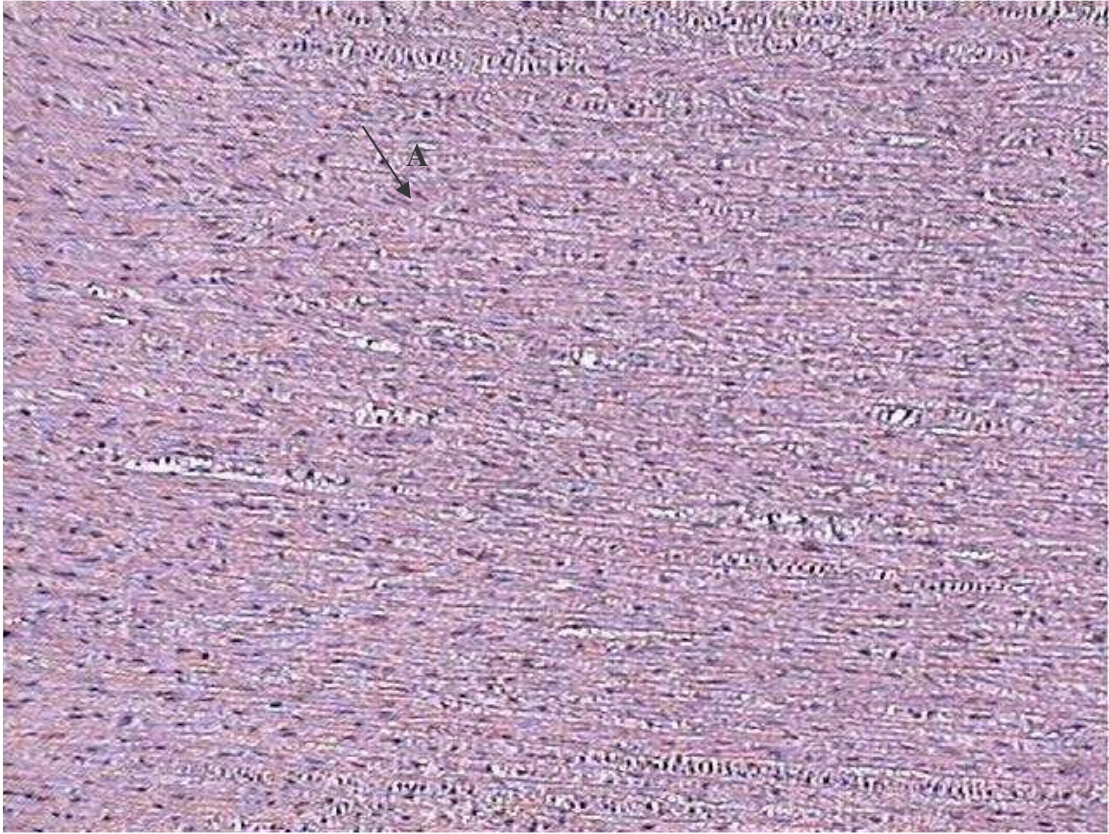


Figura 11- Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 60 dias de evolução. Não há presença evidente de infiltrado inflamatório. Nota-se que as fibras da matriz extracelular continuam mantendo o padrão original de organização (seta A), HE 100X

4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NOS CONDUTOS

Os resultados da quantificação da reação inflamatória nas paredes aórticas dos três grupos estudados, encontram-se relacionados na tabela 4 na figura 12.

Ficou evidente que as paredes aórticas do grupo III, provocaram uma resposta inflamatória menos intensa quando comparado com os grupos I e II.

Quando analisados do ponto de vista estatístico, não houve diferença entre os grupos I e II, porém o grupo III teve infiltrado inflamatório intenso significativamente menor que os outros dois (anexo 1).

Tabela 4- Quantificação do infiltrado inflamatório nos três grupos estudados ao longo do tempo

Grupos/tempo	Infiltrado	Infiltrado
	inflamatório 0 ou 1(%)	inflamatório 2(%)
I 15 dias	50%	50%
I 30 dias	0%	100%
I 60 dias	0%	100%
II 15 dias	0%	100%
II 30 dias	0%	100%
II 60 dias	0%	100%
III 15 dias	80%	20%
III 30 dias	100%	0%
III 60 dias	100%	0%

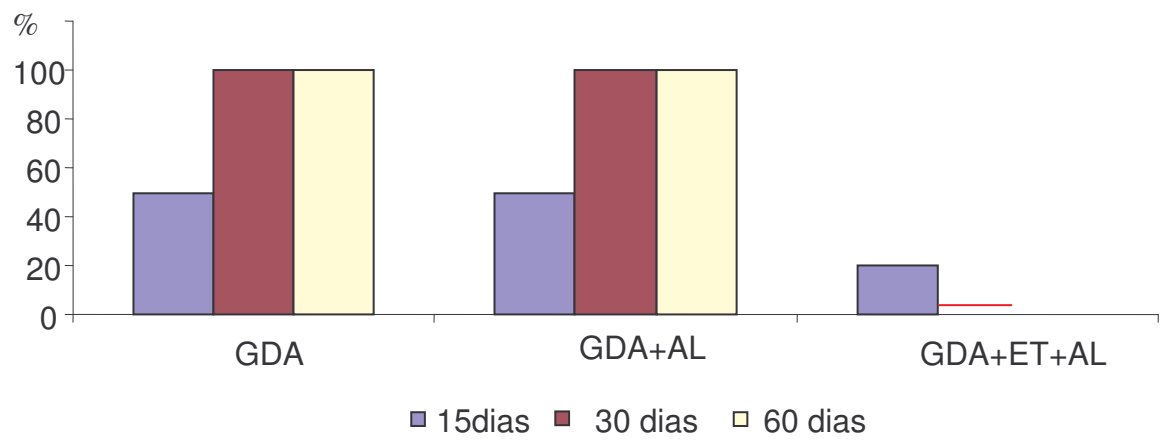


Figura 12-Gráfico da presença da reação inflamatória intensa nos três grupos estudados ao longo do tempo.

4.3 ANÁLISE DA CALCIFICAÇÃO DOS CONDUTOS PELA COLORAÇÃO ALIZARINA NO pH4,2

4.3.1 Grupo I

15 dias

Com 15 dias, já podia ser observada grande quantidade de cristais de fosfato de cálcio nas áreas com rompimento das fibras da matriz extracelular (Figura 13).

30 dias

Presença de grande quantidade de focos de calcificação iniciando na periferia e se estendendo por todo tecido.(Figura 14).

60 dias

O tecido encontra-se totalmente calcificado e com rompimento das fibras da matriz extracelular (Figura 15).

A calcificação progressiva observada no grupo I, encontra-se ilustrada nas figuras 13,14,15.

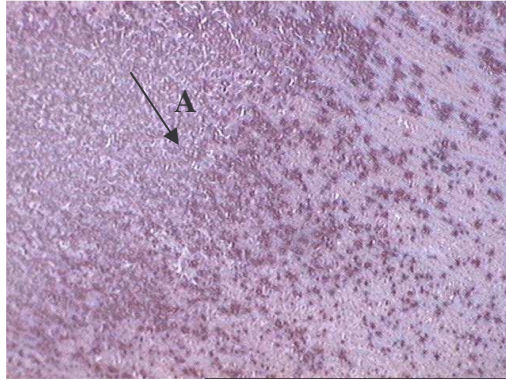


Figura 13. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 15 dias de evolução. A seta A indica um foco de calcificação, corado em vermelho, que ocorre sobre o rompimento das fibras da matriz extracelular. Nota-se acentuado número de focos de calcificação. Alizarina 100X

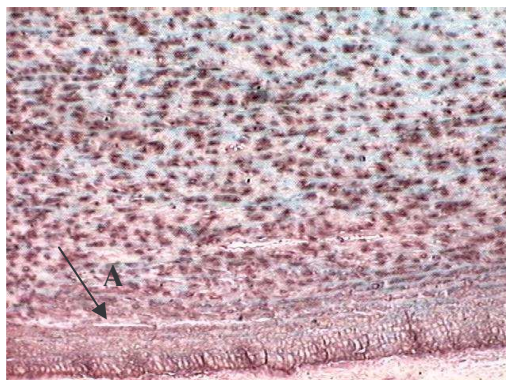


Figura 14. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 30 dias de evolução. A seta A indica uma região de calcificação extensa na borda inferior do corte histológico. Nota-se um grande número de focos de calcificação que distribuem-se sobre toda superfície do tecido. Alizarina 100X.

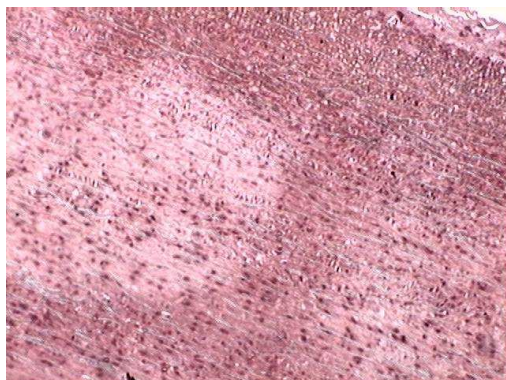


Figura 15. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 60 dias de evolução. A matriz extracelular encontra-se bastante danificada, e o tecido está completamente calcificado. Alizarina 100X.

4.3.2 Grupo II

15 dias

Observam-se focos de calcificação pequenos e dispersos corados em vermelho. Estes focos são associados ao rompimento das fibras da matriz extracelular.(Figura 16).

30dias

Neste período observou-se que os focos de calcificação eram maiores que no período anterior, porém continuavam pontuais. Estes focos ocorrem sobre o rompimento das fibras da matriz extracelular.(Figura 17).

60dias

Mesmo aos 60 dias, os focos de calcificação continuavam discretos, e se assestavam em regiões de rompimentos das fibras de matriz extracelular.(Figura 18).

A evolução da calcificação dos condutos do grupo II estão ilustradas nas figuras 16,17,18.

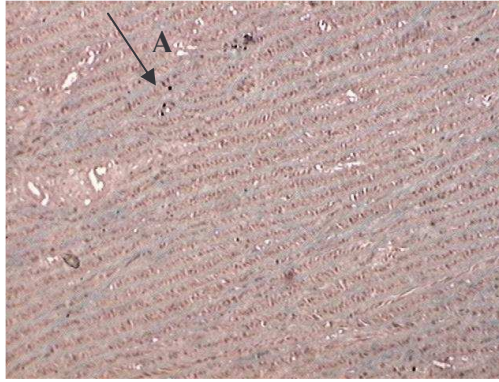


Figura 16. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 15 dias de evolução. A seta A indica pequenos focos de calcificação, corados em vermelho, que ocorre sobre o rompimento das fibras da matriz extracelular. Nota-se que os focos de calcificação estão dispersos e são pequenos se comparados com os focos de calcificação do grupo I. Alizarina 100X.

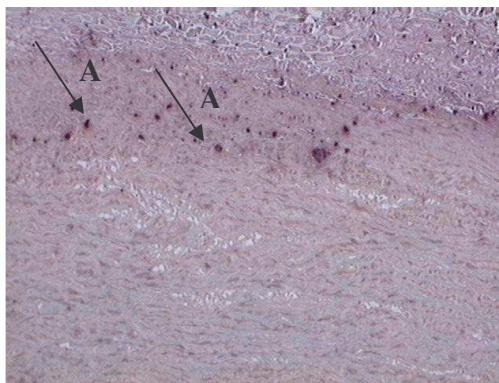


Figura 17. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 30 dias de evolução. A seta A indica focos de calcificação pontuais sobre áreas calcificadas, corados em vermelho, que ocorre sobre o rompimento das fibras da matriz extracelular. Nota-se que os focos de calcificação estão concentrados na borda do tecido e são maiores que os focos de 15 dias. Alizarina 100X

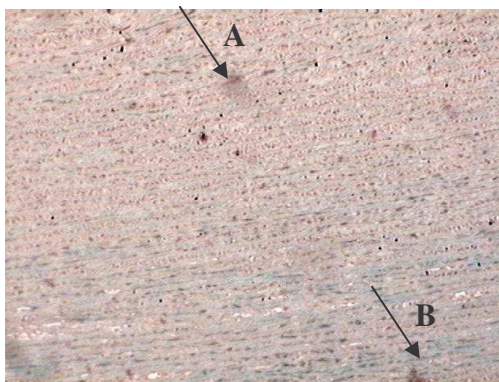


Figura 18. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 60 dias de evolução. A seta A indica um foco de calcificação, corados em vermelho, que ocorre sobre o rompimento das fibras da matriz extracelular. A seta B indica foco de calcificação menores mais ao centro do implante. Alizarina 100X

4.3.3 Grupo III

15dias

Aos 15 dias de evolução, a matriz extracelular esteve bem preservada em todas as lâminas analisadas, sem evidências de calcificação.(Figura 19).

30dias

Aos 30 dias, também não se observou calcificação, entretanto em alguns locais podia-se ver discretos focos de rompimento de matriz extracelular.(Figura 20).

60dias

Mesmo com 60 dias, não houve calcificação evidente nos condutos do grupo III. Ocasionalmente pode-se observar alguma calcificação pontual sobre o núcleo das células. A matriz extracelular apresentava-se praticamente intacta.(Figura 21).

A evolução de calcificação no grupo III, encontra-se ilustrada nas figura 19,20,21



Figura 19. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 15 dias de evolução. As setas indicam o núcleo das células corados em vermelho. Alizarina 100X.



Figura 20. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 30 dias de evolução. A seta indica foco de rompimento de fibras da matriz extracelular, corados em vermelho. Alizarina 100X.



Figura 21. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 60 dias de evolução. A seta A indica foco de calcificação pontual sobre o núcleo das células. Alizarina 100X.

4.3.4 Análise morfométrica da calcificação dos condutos (coloração Alizarina pH 4,2)

A morfometria da calcificação dos condutos aórticos nos três grupos, encontra-se ilustrada na figura 22.

O grupo I apresentou as maiores médias de calcificação. No grupo tratado com alumínio (grupo II), quando comparado ao grupo I, os níveis de cálcio não foram estatisticamente significantes ($p=0,0864$). O grupo tratado com etanol + alumínio(III), foi o que apresentou os menores índices de cálcio, sendo estatisticamente significativo quando comparado com os grupos I ($p=0,0143$) e II ($p=0,0090$).Ver anexo.

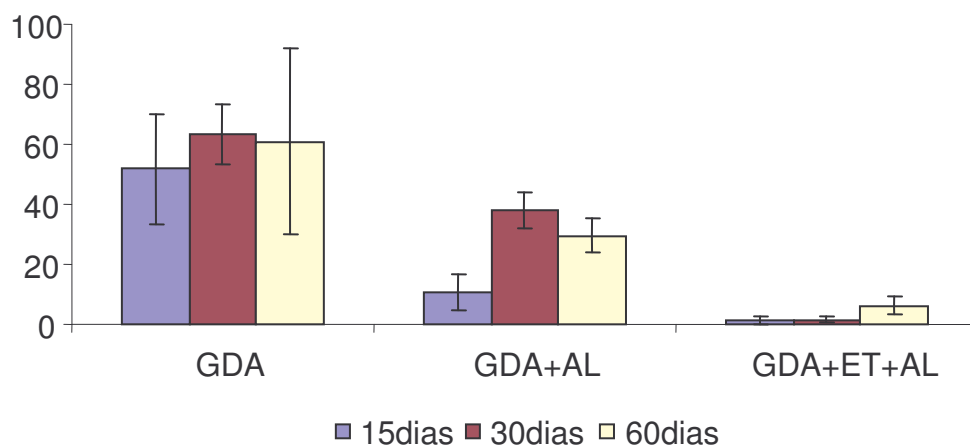


Figura 22-Gráfico da presença de calcificação nos três grupos estudados ao longo do tempo

4.4 ANÁLISE DA CALCIFICAÇÃO DOS CONDUTOS PELA COLORAÇÃO ALIZARINA NO pH7,0

4.4.1 Grupo I

15 dias

Observaram-se muitas áreas de calcificação finas e dispersas. Houve manutenção da organização das fibras da matriz extracelular, apenas com rompimento nas áreas de calcificação. Nota-se que diferente do fosfato, os outros sais de cálcio formam cristais pequenos.(Figura 23).

30dias

Foram observadas a presença de muitas áreas de calcificação, maiores que no período anterior e com rompimento das fibras da matriz extracelular.(Figura 24).

60dias

Os condutos estavam bastante calcificados, o que foi evidenciado pela deposição de cristais de oxalato de cálcio nas regiões com acentuado rompimento das fibras de matriz.(Figura 25).

A evolução da calcificação dos condutos do grupo I quando corados com Alizarina pH 7,0 encontra-se ilustrada nas figura 23,24,25.

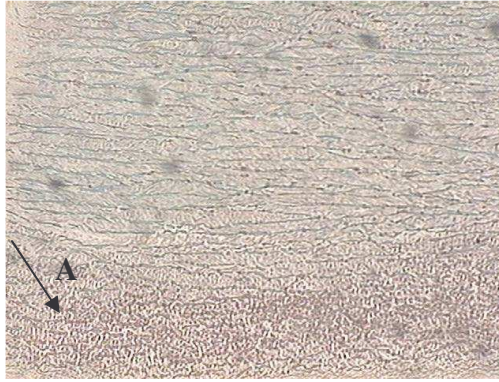


Figura 23. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 15 dias de evolução. A seta A indica um focos de calcificação, corados em vermelho,. Nota-se que diferente do fosfato os outros sais de cálcio formam cristais pequenos que distribuem-se por uma vasta área do tecido formando uma calcificação fina e dispersa. Alizarina 100X.



Figura-24. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 30 dias de evolução. A seta A indica focos de calcificação, corados em vermelho. Nota-se uma vasta área do tecido calcificada, na borda do implante, evidenciada pela deposição de cristais de oxalato de cálcio em regiões de rompimento das fibras de matriz. Se comparado ao implante retirado após 15 dias percebe-se que a calcificação é mais evidente e há um dano maior no tecido do conduto. Alizarina 100X.

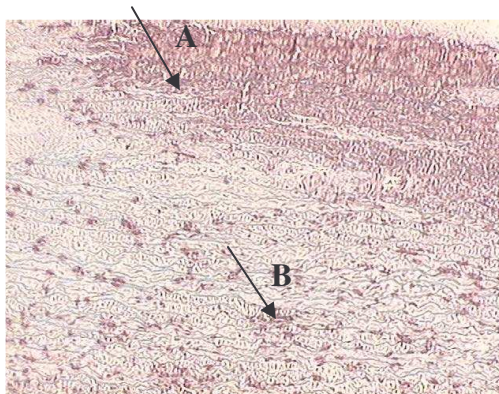


Figura 25. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo I, com 60 dias de evolução. A seta A indica uma vasta área do tecido calcificada, na borda do implante, evidenciada pela deposição de cristais de oxalato de cálcio em uma região com acentuado rompimento das fibras de matriz. Nota-se uma desorganização das fibras da matriz extracelular, que causam rompimento das fibras e pequenos focos de calcificação espalhados pela superfície do tecido do conduto, como indica a seta B. Se comparado aos implantes anteriores percebe-se uma calcificação disseminada e danos acentuados no tecido. Alizarina 100X.

4.4.2 Grupo II

15dias

Observou-se o início do processo de calcificação em áreas coradas em vermelho. A matriz extracelular se mantinha bem preservada em todas as lâminas (Figura 26).

30dias

Aos 30 dias foram observados poucos focos de calcificação. As fibras da matriz extracelular estavam íntegras e mantiveram a sua estrutura original.(Figura 27).

60dias

Já aos 60 dias, observaram-se focos de calcificação, formados por deposição de cristais muito pequenos de oxalato de cálcio. A organização das fibras da matriz extracelular estava mantida.(figura 28).

A evolução da calcificação encontra-se ilustrada nas figuras 26,27,28.

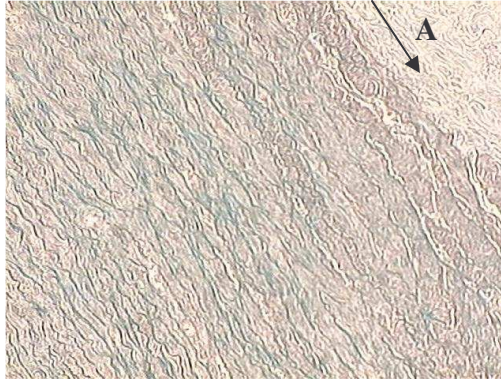


Figura 26. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 15 dias de evolução. A seta A indica uma região de calcificação pela coloração em vermelho com deposição de cristais muito pequenos de oxalato de cálcio. Alizarina 100X.

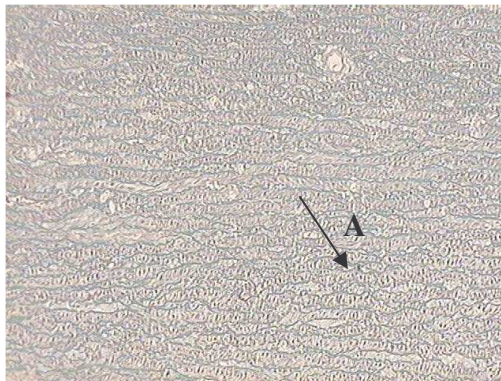


Figura 27. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 30 dias de evolução. A seta A indica foco de calcificação sobre o conduto. As fibras da matriz extracelular estão íntegras e mantendo a estrutura original. Alizarina 100X



Figura 28. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo II, com 60 dias de evolução. Nota-se que a coloração do corte histológico apresenta-se avermelhada indicando focos de calcificação formada por deposição de cristais muito pequenos de oxalato de cálcio. A organização das fibras da matriz extracelular está mantida. Alizarina 100X.

4.4.3 Grupo III

15 dias

Manteve-se a organização das fibras da matriz extracelular, com preservação de sua estrutura original e sem sinais de calcificação.(Figura 29).

30dias

As fibras da matriz extracelular permaneceram organizadas e com preservação da sua estrutura original e também sem sinais de calcificação.(Figura 30).

60dias

As fibras da matriz extracelular permaneceram organizadas. Ficou mantida a estrutura original e não observou-se nenhuma calcificação.(Figura 31).

A evolução deste grupo encontra-se ilustrada nas figuras 29,30,31.



Figura 29. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 15 dias de evolução. Nota-se a organização das fibras da matriz extracelular mantendo a sua estrutura original e ausência total de calcificação. Alizarina 100X.

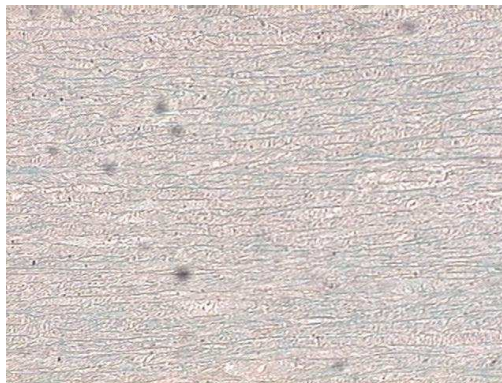


Figura 30. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 30 dias de evolução. Nota-se que a organização das fibras da matriz extracelular estão mantidas na estrutura original e observa-se ausência total de calcificação. Alizarina 100X.



Figura 31. Fotomicrografia de conduto aórtico do grupo III, com 60 dias de evolução. Nota-se que a organização das fibras da matriz extracelular estão mantidas sua na estrutura original e observa-se ausência total de calcificação. Alizarina 100X

4.4.4 Análise morfométrica da calcificação dos condutos (coloração Alizarina pH 7,0)

A morfometria da calcificação dos condutos aórticos nos três grupos, encontra-se ilustrada na figura 32.

O grupo I apresentou as maiores médias de calcificação. No grupo tratado com alumínio (grupo II), já se observa diminuição significativa dos níveis de cálcio quando comparado com o grupo I, sendo estatisticamente significante ($p=0,0143$). O grupo tratado com etanol + alumínio (III), foi o que apresentou os menores índices de cálcio, sendo estatisticamente significante quando comparado com o grupo I ($p=0,0143$) e quando comparado com o grupo II ($p=0,0090$). Ver anexo 1

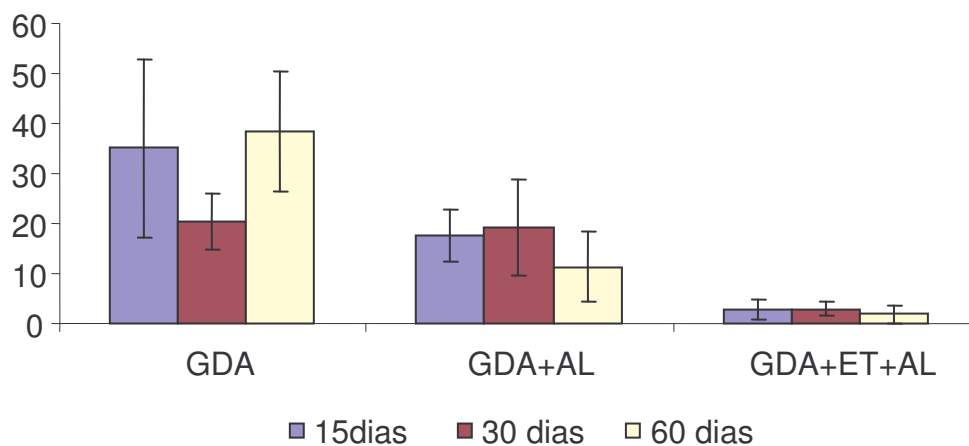


Figura 32-Gráfico da presença de calcificação nos três grupos estudados ao longo do tempo

4.5 ANÁLISE DA CALCIFICAÇÃO DOS CONDUTOS PELA ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

4.5.1 Grupo I

Neste grupo observamos que os níveis de calcificação aumentaram progressivamente. A quantidade de cálcio medida foi de $1,56\pm 0,64$ mg de cálcio por grama de tecido aos 15 dias, seguido de $2,93\pm 0,58$ mg/g aos 30 dias e $3,80\pm 0,79$ mg/g aos 60 dias.

4.5.2 Grupo II

Neste grupo os níveis de cálcio medidos foram $1,79\pm 0,20$ mg/g aos 15 dias, seguido de $1,07\pm 0,25$ mg/g aos 30 dias e $1,68\pm 0,40$ mg/g aos 60 dias.

4.5.3 Grupo III

Neste grupo os valores quantificados foram $1,56\pm 0,37$ mg/g, seguido de $1,01\pm 0,06$ mg/g aos 30 dias e $1,44\pm 0,52$ mg/g aos 60 dias.

Os níveis de cálcio observados pela espectroscopia por absorção atômica mostraram que houve significância estatística dos grupos III ($p=0,0143$) e II ($p=0,0143$) em relação ao I, mas não do grupo III em relação ao II ($p=0,3472$). Estes dados encontram-se ilustrado na figura 33.

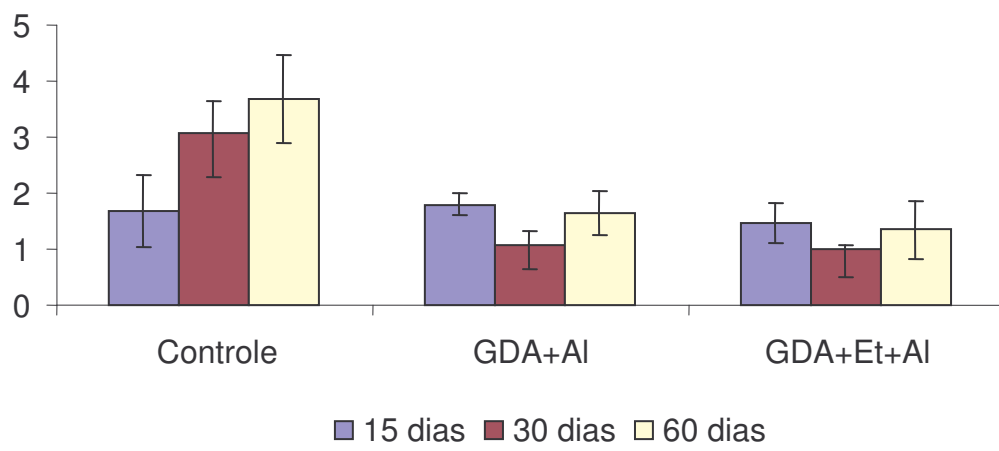


Figura 33-Gráfico da presença de calcificação nos três grupos estudados ao longo do tempo

5 DISCUSSÃO

É bem determinado, que novos tratamentos para a prevenção da calcificação de tecidos biológicos empregados na confecção de próteses valvares cardíacas devem ser adequadamente testados em animais de experimentação antes de serem utilizados clinicamente^(28,29,30,31,32,33,,35,43). Com essa finalidade, existem diversos modelos experimentais disponíveis, incluindo o implante de fragmentos teciduais em subcutâneo de ratos, de coelhos, cães ou ovinos, de remendos ou enxertos vasculares no sistema arterial ou venoso de coelhos, cães ou ovinos, assim como valvas ou condutos valvados que podem ser implantadas em posição ortotópica e/ou heterotópica, tanto do lado direito como do lado esquerdo da circulação de ovinos ou primatas^(,53,54,58).

Do ponto de vista prático, recomenda-se que a avaliação inicial seja feita em modelos mais simples e baratos, passando para os experimentos mais complexos em fases subseqüentes⁽²⁶⁾. Nosso estudo representa a avaliação inicial de eficácia de etanol combinado com o cloreto de alumínio na prevenção da calcificação de parede aórtica porcina, e por esse motivo foi realizado com o implante de fragmentos de tecidos na tela subcutânea de ratos.

Da mesma forma que outros autores, optamos pela utilização de ratos da raça Sprague-Dawley, visto que apresentam maior resposta inflamatória e calcificação mais intensa e acelerada quando comparados com ratos da linhagem Wistar⁽⁵⁹⁾. Além disso, foram empregados animais jovens de apenas três semanas de idade, pois seu metabolismo de cálcio é bem mais ativo do que em ratos velhos. Cumpre ressaltar que, em nosso meio, existem dificuldades para a obtenção de ratos dessa espécie, pelo limitado número de biotérios criadores e pelo seu custo elevado.

O mecanismo de ação do etanol como agente anticalcificante é multifatorial e ainda não completamente compreendido.

VYAVAHARE et al^(42,43) demonstraram que o tratamento com etanol 80% por 24 horas em cúspides valvares porcinas previamente fixadas pelo glutaraldeído, causaram mudanças na conformação das fibras colágenas que as tornaram mais resistentes à digestão pela colagenase assim como também alteraram a interação das cúspides valvares com proteínas e lipídeos plasmáticos, diminuindo de forma significativa a absorção de colesterol.

Quando implantadas na tela subcutânea de ratos por 60 dias, as cúspides valvares tratadas com GDA apresentaram níveis de cálcio muito elevados ($236 \pm 6, \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido), enquanto que as tratadas com GDA e etanol não calcificaram, com níveis de cálcio semelhantes aos observados antes do implante ($1,87 \pm 0,29 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido). Esses achados foram subsequentemente confirmados no modelo circulatório de ovinos, onde não se evidenciou calcificação das cúspides de próteses mitrais com até 150 dias de evolução⁽⁴²⁾.

Nosso grupo de pesquisa na PUC-PR vem estudando diversos tratamentos químicos alternativos na prevenção da calcificação de tecidos biológicos, incluindo o uso do etanol. Estudos realizados por SONCINI DA ROSA et al⁽¹²⁾ comprovaram que o etanol foi eficiente na prevenção da calcificação de cúspides valvares implantadas no tecido subcutâneo de ratos por até 60 dias de evolução, assim como nas cúspides de heteroenxertos pulmonares implantados na via de saída do ventrículo direito de ovinos com períodos de observação de até 210 dias⁽¹³⁾.

Além do etanol outras substâncias também se mostraram úteis como agentes anticalcificantes em cúspides valvares porcinas, entretanto, não foram eficientes para inibir a calcificação na parede aórtica. Isso se deve a grande quantidade de elastina presente na parede aórtica, cujo mecanismo de calcificação é diferente daquele observado nas cúspides valvares, onde o tecido é predominantemente constituído de fibras colágenas.

Mais recentemente, CLARK et al⁽⁵⁴⁾ demonstraram que o tratamento químico de paredes aórticas com AlCl_3 , foi eficiente para prevenção de sua calcificação. Os efeitos do alumínio se devem a sua ligação com a elastina, o que causa uma alteração estrutural permanente que resulta em resistência à calcificação.

Outros efeitos do alumínio incluem a inibição da atividade da fosfatase alcalina, da elastólise mediada pelas metaloproteinases além da regulação da proteína Tenascina C, presente na matriz extracelular das paredes aórticas.

Segundo BAILEY et al⁽⁵²⁾, as metaloproteinases da matriz são liberadas pela ação das células do infiltrado inflamatório, propiciando a digestão das fibras por elastólise. Isso por sua vez ocasiona a exposição de sítios de ligação carregados negativamente, onde ocorrerá a deposição de cálcio iônico.

Nosso estudo representa uma continuação do trabalho iniciado por SONCINI et al⁽¹²⁾ e visa obter uma combinação de tratamentos químicos que possam inibir a calcificação da parede aórtica porcina previamente fixada em GDA. Assim sendo, nosso objetivo primordial foi de testar a eficiência do $AlCl_3$, sozinho ou em combinação com o etanol, na parede arterial.

Confirmando os achados de CLARK et al⁽⁵⁴⁾ e OGLE et al⁽⁵³⁾, nossos resultados demonstraram que o uso isolado do $AlCl_3$, quando comparado com o grupo controle, foi eficiente em diminuir a calcificação da parede aórtica porcina. Isso pode ser evidenciado tanto pela medição dos níveis de cálcio por espectroscopia como pelas colorações de Alizarina nos pHs de 4,2 e 7,0. Entretanto, a análise detalhada dos achados histológicos assim como a morfometria dos depósitos de cálcio nas colorações de Alizarina demonstraram que a associação de $AlCl_3$ com etanol resultaram em menor infiltrado inflamatório e melhor preservação da matriz extracelular do que no grupo tratado somente com $AlCl_3$. Isso provavelmente se deveu a ação sinérgica dos dois agentes, que resulta em um tecido mais estável e biocompatível.

Apesar da maioria dos estudos sobre calcificação em próteses valvares empregar a coloração de Von Kossa, em nossos estudos fizemos a opção pela Alizarina, visto que esta pode ser empregada com pHs distintos e diferenciar a calcificação causada por cristais de oxalato de cálcio daquelas ocasionadas por carbonato ou fosfato de cálcio.

Sendo o processo de calcificação multifatorial, o uso de técnicas mais específicas poderão fornecer informações mais detalhadas para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos e para o desenvolvimento de métodos mais eficientes de sua prevenção.

Na literatura consultada, somente o estudo de VYAVAHARE et al⁽⁵⁰⁾ empregou a coloração Alizarina, mesmo assim somente com pH 7,0. Para nosso conhecimento, nosso estudo é o primeiro da literatura a utilizar essa coloração nos pHs de 4,2 e 7,0. Além disso, a morfometria das lâminas histológicas coradas pela Alizarina, foi importante para melhor quantificar a calcificação, quando comparado com o aspecto mais subjetivo da simples observação das lâminas.

Pela observação pormenorizada de nossos achados, podemos postular a presença de pelo menos duas vias importantes para a ocorrência da calcificação. A primeira seria decorrente dos efeitos deletérios do infiltrado inflamatório na matriz extracelular, e a segunda pela afinidade química do cálcio iônico em sítios de ligação nas moléculas da matriz. Dessa forma, pudemos evidenciar a deposição de cálcio tanto em áreas diretamente relacionadas com o infiltrado inflamatório em áreas danificadas da matriz, assim como em áreas distantes, onde a matriz estava bem preservada. A morfologia desses depósitos de cálcio diferem entre si, demonstrando a característica multifatorial do processo, e só puderam ser evidenciadas porque empregamos as colorações de Alizarina com pHs diferentes.

CARPENTIER et al⁽⁵⁾ realizaram estudo clássico avaliando as interações biológicas em pacientes submetidos a próteses valvares. Demonstraram que a presença de células inflamatórias dentro do tecido valvar estavam associadas com maior incidência de degeneração e calcificação. SCHOEN et al⁽⁶⁰⁾, também demonstraram que próteses valvares cardíacas induzem uma reação imunológica, e que as células presentes no tecido valvar são imunocompetentes e capazes de levar a destruição tecidual. Nosso estudo demonstra inequivocamente, que a associação de etanol com cloreto de alumínio foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório quando comparado com o grupo controle, o que certamente colaborou para os melhores resultados nesse grupo.

Apesar de nossos resultados serem bastante encorajadores, alguns aspectos ainda precisam ser elucidados antes que essa metodologia seja extrapolada para uso clínico.

Da mesma forma com o que aqui foi observado, OGLE et al⁽⁵³⁾ demonstraram excelentes resultados no modelo de ratos, entretanto, quando testados no modelo circulatório de ovinos, os resultados não corresponderam ao esperado, com calcificação acentuada das cúspides valvares. Posteriormente, foi demonstrado por CLARK et al⁽⁵⁴⁾, que quando as cúspides valvares eram submetidas a tempos de exposição muito prolongados ao alumínio, ocorreu a calcificação, entretanto, quando se limitou o tempo de exposição, as cúspides estiveram livres de calcificação. Por esses motivos, nossa linha de pesquisa deverá ser continuada e testada em ovinos com longos períodos de observação. Além disso, nossos achados demonstraram que ocasionalmente os depósitos de cálcio se iniciaram nos restos celulares presentes na matriz. Por isso, a descelularização pode, eventualmente ser um adjunto importante para a prevenção da calcificação dessas próteses, e também deverá ser avaliada no futuro.

Cumpramos ressaltar que o alumínio em altas concentrações pode ser tóxico, sendo portanto necessário incluir nesses estudos, a avaliação não somente os níveis plasmáticos de alumínio mas também dos seus eventuais efeitos deletérios nos diversos órgãos dos animais de experimentação.

Tendo em vista as vantagens do uso de próteses porcinas implantadas com a técnica de substituição total da raiz aórtica, torna-se fundamental o emprego de tratamentos químicos que retardem ou eliminem a calcificação não só das cúspides como também da parede arterial dos condutos. Os resultados aqui demonstrados sugerem que a combinação do etanol com o cloreto de alumínio possam representar uma excelente alternativa, e, eventualmente terem aplicação na prática clínica.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com cloreto de alumínio diminuiu a calcificação dos fragmentos de parede aórtica porcina preservada em GDA, implantados na tela subcutânea de ratos jovens. O uso combinado do etanol com cloreto de alumínio foi ainda mais eficiente em inibir a calcificação, e também em diminuir a reação inflamatória.

7 REFERÊNCIAS

1-Ross DN, Radley-Smith R, Somerville J. Pulmonary autograft replacement for severe aortic valve disease. *British Heart Journal*. 1969;31(6):797-8.

2-Cooley DA. In memoriam:Tribute to Ake Senning, pioneering cardiovascular surgeon. *Tex Heart Inst J*.2000;27(3):234-5.

3-Puig LB, Verginelli G, Kawabe L, Andrade e Silva U, Belioti G, Pillegi F, Zerbini EJ. Experiência em 776 pacientes portadores de valva de dura-máter. *Arq Bras de Cardiol*. 1976;29(6):501-7.

4-Binet JP, Carpentier A, Langlois J. Clinical use of heterografts for replacement of the aortic valve. *J Thorac Cardiovas Surg*. 1968;55(2):238-242.

5-Carpentier A, Lemaigre G, Robert I, Carpentier S, Dubost C. Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts. *J Thorac Cardiovas Surg*. 1969;58(4):467-83

6-Ionescu MI, Pakrahi BC, Mary DAS, Bartck IT, Wooler GH. Long-term evaluation of tissue valves. *J Thorac Cardiovas Surg*1974;68(3):361-79.

7-Braile DM, Bilaqui A, Ardito RV, Greco OT, Garzon SAC, Nicolau JC, Jacob JLB, Ayoub JCA, Fedozzi NM, Angeloni MA, Lorga AM. Bioprótese cardíaca de pericárdio bovino. *Arq Bras de Cardiol*. 1982;39(4):247-257.

8-Girardot MN, Torrianni M, Dillehay D, Girardot JM. Role of glutaraldehyde in calcification of porcine heart valves: comparing cusp and wall. *J Biomed Mater Res*. 1995;29:793-801.

9-Gott JP, Girardot MN, Girardot JM, Hall JD, Whitlark JD, Horsley S, Dorsey LMA, Levy RJ, Chen W, Schoen FJ, Guyton RA. Refinement of the alpha aminooleic acid bioprosthetic valve anticalcification technique. *Ann Thorac Surg*. 1997;64:50-58.

10-Abolhoda A, Yu S, Oyarzun R, McCormick J, Bogden JD, Gabbay S. Calcification of bovine pericardium: glutaraldehyde versus no-react biomodification. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:169-74.

11-Vyavahare N, Hirsch D, Lerner E, Baskin JZ, Zand R, Schoen FJ, Levy RJ. Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships. *J Biomed Mater Res.* 1998;40:577-85.

12-Soncini da Rosa GR, 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):148-59.

13-Soncini da Rosa GR. Utilização do etanol na prevenção da calcificação em heteroenxerto valvar pulmonar porcino: estudo experimental em ovinos. Tese apresentada como pré-requisito parcial à obtenção do grau de doutor. Programa Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR. 2005.

14-Scheld HH, Konertz W. The pathology of bioprosthetic heart valves and allografts. *Current Topics in Pathology.* 1994;86:87-123.

15-Carpentier A, Delochi A, Relland J, Fabiani JN, Forman J, Camilleri JP, Soyler R, Dubost C. Six-year follow-up of glutaraldehyde-preserved heterografts. *J Thorac Cardiovas Surg.* 1974;68(5):771-82.

16-Schoen FJ, LevyRJ. Tissue heart valves: Current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res.* 1999;47:439-465.

17-Vyavahare N, Ogle M, Schoen FJ, Zand R, Gloeckner DC, Sacks M, Levy RJ. Mechanisms of bioprosthetic heart valve failure: fatigue causes collagen denaturation and glycosaminoglycan loss. *J Biomed Mater Res.* 1999;46:444-50.

18-Ferrans VJ, Tomita Y, Hilbet SL, Jones M, Roberts WC. Pathology of bioprosthetic cardiac valves. *Human Pathology*. 1987;18(6):586-95.

19-Schoen FJ, Harasaki H, Kim KM, Anderson C, Levy RJ. Biomaterial-associated calcification: pathology, mechanisms, and strategies for prevention. *J Biomed Mater Res*. 1988;22(A1):11-36.

20-Schoen FJ, Levy RJ. Heart valve bioprostheses: antimineralization. *Eur J Cardio-Thorac Surg*. 1992;6(1):S91-S94.

21-Korossis SA, Fisher J, Ingham E. cardiac valve replacement: A bioengineering approach. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2000;10:83-124.

22-Vesely I, Barber E, Ratliff NB. Tissue damage and calcification may be independent mechanisms of bioprosthetic heart valve failure. *J Heart Valve Dis*. 2001;10:471-477.

23-Barnhart GR, Jones M, Ishihara T, Chavez AM, Rose DM, Ferrans VJ. Failure of porcine aortic and bovine pericardial prosthetic valves: An experimental investigation in young sheep. *Circulation*. 1982;66(1):150-3.

24-Human P, Zilla P. the possible role of immune responses in bioprosthetic heart valve failure. *J Heart Valve Dis*. 2001;10:460-466.

25-Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Levy RJ. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *Am J Pathol*. 1987;127:122-130.

26-Grabenwoger M, Sider J, Fitzal F, Zelenka C, Windberger U, Grimm M, Moritz A, Bock P, Wolner E. Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material. *Ann Thorac Surg*. 1996;62:772-7.

27-Zilla P, Weissenstein C, Human P, Dower T, Bscons, Von Oppel UO. High glutaraldehyde concentrations mitigate bioprosthetic root calcification in the sheep model. *Ann Thorac Surg* . 2000;70:2091-5.

26-Schoen FJ, Levy RJ, Hilbert SL, Bianco RW. Antimineralization treatments for bioprosthetic heart valves. *J Thorac Cardiac Surg*. 1992;104:1285-8.

27-Maranto AR, Schoen FJ. Alkaline phosphatase activity of glutaraldehyde-treated bovine pericardium used in bioprosthetic cardiac valves. *Circulation Research*. 1988;63:844-848.

28-Levy RJ, Schoen FJ, Flowers W, Staelin T. inhibition of mineralization in bioprosthetic heart valves: studies of alkaline phosphatase activity and its inhibition by $AlCl_3$ or $FeCl_3$.preincubations. *Journal of Biomaterials Research*. 1991;25:905-35.

29-Gott JP, Chih P, Dorsey LMA, Jay JL, Jett GK, Schoen FJ, Girardot JM, Guyton RA. Calcification of porcine valves: A successful new method of antimineralization. *Ann Thorac Surg*. 1992;53:207-16.

30-Chen W, Schoen FJ, Levy RJ. Mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves. *Circulation* . 1994;90:323-329.

31-Gott JP, Girardot MN, Girardot JM, Hall JD, Whitlark JD, Horsley S, Dorsey LMA, Levy RJ, Chen W, Schoen FJ, Guyton RA. Refinement of the alpha aminooleic acid bioprosthetic valve anticalcification technique. *Ann Thorac Surg*. 1997;64:50-58.

32-Flameng WJ, Ozaki S, Yperman J, Herijgers P, Meuris B, Van Lommel A, Verbeken E. Calcification characteristics of porcine stented valves in a juvenile sheep model. *Ann Thorac Surg*. 2001;71:S401-S405.

33-Duarte IG, MacDonald MJ, Cooper WA, Schumarkey SL, Gott JP, Brown M, Vincent-Johansen J, Guyton RA. In vivo hemodynamic, histologic, and antimineralization characteristics of the mosaicbioprosthesis. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:92-99.

34-Grimm M, Eybl E, Dipling, Grabenwoger M, Griesmacher A, Loset U, Bock P, Muller MM, Wolner E. Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991;102:195-201.

35-Grimm M, Grabenwoger M, Eybl E, Moritz A, Bock P, Muller MM, Wolner E. Improved biocompatibility of bioprosthetic heart valves by L-glutamic acid treatment. *J Cardiac Surg.* 1992;7(1):58-64.

36-Grabenwoger M, Grimm M, Eybl E, Leukauf C, Muller MM, Plenck H, Bock P. Decreased tissue reaction to bioprosthetic heart valve material after L-glutamic acid treatment. A morphological study. *J Biomed Mater Res.* 1992;26:1231-40.

37-Jorge-Herrero E, Fernandez P, Escudero C, Garcia-Paez JM, Castilllo-Olivares JL. Calcification of pericardial tissue pretreated with different amino acids. *Biomaterials.* 1996. 17:571-75.

38-Koutsopoulos S, kontogeorgou A, Petroheilios J, Dalas E. Calcification of porcine and human cardiac valves: testing of various inhibitors for antimineralization. *Journal of Materials Science.* 1998;9:421-24.

39-Levy RJ, Hawley MA, Schoen RJ, Lund SA, Liu PY. Inhibition by diphosphonate compounds of calcification of porcine bioprosthetic heart valve cusps implanted subcutaneously in rats. *Circulation.* 1985;71(2):349-56.

40-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;25:5523-30.

41-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;79:905-10.

42-Vyavahare N, Hirsch D, Lerner E, Baskin JZ, Schoen FJ, Bianco R, Kruth H, Zand R, Levy RJ. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation. *Circulation.* 1995;95:479-88.

43-Vyavahare N, Hirsch D, Lerner E, Baskin JZ, Zand R, Schoen FJ, Levy RJ. Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships. *J Biomed Mater Res.* 1998;40:577-85.

44-Lee CH, Vyavahare N, Zand R, Kruth H, Schoen FJ, Bianco R, Levy RJ. Inhibition of aortic wall calcification in bioprosthetic heart valves by ethanol pretreatment: biochemical and biophysical mechanisms. *J Biomed Mater Res.* 1998;42:30-7.

45-Pathak CP, Adams AK, Simpson T, Phillips RE, Moore MA. Treatment of bioprosthetic heart valve tissue with long chain solution to lower calcification potential. *J Biomed Res.* 2004;69A:140-44.

46-Webb CL, Nguyen NM, Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of allograft aortic wall in a rat subdermal model. *American of Pathology.* 1992;141(2):487-96.

47-Pathak YV, Boyd J, Levy RJ, Schoen FJ. Prevention of calcification of glutaraldehyde pretreated bovine pericardium through controlled release polymeric implants: studies of Fe^{3+} , Al^{3+} , protamine sulphate and levamisole. *Journal of Biomaterials.* 1990;11:718-23.

48-Webb CL, Flowers WE, Boyd J, Rosenthal E, Schoen FJ, Levy RJ. Al^{+++} binding studies and metallic cations effects on bioprosthetic heart valve calcification in the rat subdermal model. *Asaio Transactions.* 1990;36(2)56-9.

49-Webb CL, Schoen FJ, Flowers WE, Alfrey AC, Horton C, Levy RJ. Inhibition of mineralization of glutaraldehyde-pretreated bovine pericardium by AlCl₃. *American Journal of Pathology*. 1991;138(4):971-81.

50-Vyavahare N, Ogle M, Shoen FJ, Levy RJ. Elastin calcification and its prevention with aluminium chloride pretreatment. *American Journal of Pathology*. 1999;155(3):973-81.

51-Vasudev SC, Chandy T, Mohanty U, Sharma CP. Inhibition of bioprosthesis calcification due to synergistic effect of Fe/Mg ions to polyethylene glycol grafted bovine pericardium. *Journal of Biomaterials Applications*. 2001;16(2):93-100.

52-Bailey M, Xiao H, Ogle M, Vyavahare M. Aluminium chloride pretreatment of elastin inhibits elastolysis by matrix metalloproteinases and leads to inhibition of elastin –oriented calcification. *American Journal of Pathology*. 2001;159(6):1981-85.

53- Ogle MF, Kelly SJ, Bianco RW, Levy RJ. Calcification resistance with aluminium-ethanol treated porcine aortic valve bioprostheses in juvenile sheep. *Ann Thorac Surg*. 2003;75:1267-73.

54- Clark JN, Ogle MF, Ashworth P, Bianco RW, Levy RJ. Prevention of calcification of bioprosthetic heart valve cusp and aortic wall with ethanol and aluminium chloride. *Ann Thorac Surg*. 2005;79:897-904.

55-Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas. Normas para apresentação de artigos propostos para publicação em revistas médicas. *Rev Port Clin Geral*. 1997;14:159-74.

56-Nômina Anatômica Veterinária. Internacional Comitee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. *Nômina Anatômica Veterinária*. 3.ed.Ithaca,1983.

57- Pereira CEM, Silva JDM, Romeiro VRR. Aspectos éticos em experimentação animal. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 1998;13(2):123-8.

58-Ali ML, Kumar SP, Bjornstad K and Duran MG. The sheep as an animal model for heart valve research. *Cardiovascular Surgery*. 1996;4(4):543-9.

59-Daamen WF, Nillesen STM, Hafmans T, Veerkamp JH, Van Luyn MJA, Van Kuppevelt TH. Tissue response of defined collagen-elastin scaffolds in young and adults rats with special attention to calcification. *Biomaterials*. 2005;26:81-92.

60-Schoen FJ. Editorial: Are immune mechanisms important in tissue heart valve failure? A debate. *J Heart Valve Dis*. 2001;10(4):458-9.

ANEXOS

Anexo 1

Momento de avaliação: 15 dias

Para cada uma das variáveis de calcificação, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos três grupos de ratos, versus a hipótese alternativa de pelo menos um dos grupos com resultados diferentes dos demais. Na tabela abaixo são apresentados os resultados descritivos e os valores de p dos testes estatísticos.

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
Espectroscopia de absorção atômica do conduto	Controle	4	1,56	1,61	0,76	2,27	0,64	0,5515
	Alumínio	4	1,79	1,86	1,50	1,93	0,20	
	Etanol+alumínio	5	1,56	1,48	1,03	1,98	0,37	
Morfometria 4,2 conduto	Controle	4	51,75	57,26	25,76	66,71	18,50	0,0031
	Alumínio	5	10,72	8,77	4,68	19,83	6,16	
	Etanol+alumínio	5	1,58	1,74	0,13	3,00	1,31	
Morfometria 7 conduto	Controle	4	35,11	29,99	20,48	59,96	17,75	0,0059
	Alumínio	5	17,69	20,89	9,57	21,90	5,25	
	Etanol+alumínio	5	2,78	2,37	1,02	5,13	1,84	

Na tabela abaixo são apresentados os valores de p das comparações dos grupos dois a dois para as variáveis Morfo 4,2 conduto e Morfo 7 conduto.

Grupos comparados	Morfometria 4,2 conduto	Morfometria 7 conduto
Controle x alumínio	0,0143	0,0864
Controle x etanol-alumínio	0,0143	0,0143
Alumínio x etanol-alumínio	0,0090	0,0090

Valores de $p < 0,0167$ indicam significância estatística (correção de Bonferroni)

Na tabela abaixo são apresentadas, para parede e para cada grupo, as frequências (%) de ratos com as classificações de infiltrado inflamatório 0 ou 1 e a classificação 2.

Infiltrado inflamatório	Grupo	N	Classificação	
			0 ou 1	2
Conduto	Controle	4	2 (50%)	2 (50%)
	Alumínio	5	5(100%)	
	Etanol+alumínio	5	4 (80%)	1 (20%)

Para parede aórtica, testou-se a hipótese nula de proporções iguais de infiltrado inflamatório igual a 2 nos dois grupos sob comparação, versus a hipótese alternativa de proporções diferentes. Na tabela abaixo são apresentados os valores de p dos testes estatísticos.

Grupos comparados	Infiltrado inflamatório
	Conduto
Controle x alumínio	0,1667
Controle x etanol+alumínio	0,5238
Alumínio x etanol+alumínio	1

Momento de avaliação: 30 dias

Para cada uma das variáveis de calcificação, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos três grupos de ratos, versus a hipótese alternativa de pelo menos um dos grupos com resultados diferentes dos demais. Na tabela abaixo são apresentados os resultados descritivos e os valores de p dos testes estatísticos.

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
Espectroscopia de absorção atômica conduto	Controle	4	2,93	3,10	2,09	3,41	0,58	0,0171
	Alumínio	5	1,07	1,15	0,80	1,39	0,25	
	Etanol+alum	5	1,01	1,02	0,92	1,06	0,06	
Morfometria 4,2 conduto	Controle	4	63,26	59,96	55,78	77,37	9,94	0,0031
	Alumínio	5	37,99	37,18	31,54	48,13	6,24	
	Etanol+alum	5	1,44	1,91	0,25	2,45	0,97	
Morfometria 7 conduto	Controle	4	20,29	21,13	13,44	25,45	5,61	0,0106
	Alumínio	5	19,38	21,27	9,67	32,93	9,58	
	Etanol+alum	5	2,94	3,24	1,34	4,88	1,45	

Na tabela abaixo são apresentados os valores de p das comparações dos grupos dois a dois para as variáveis Espectroscopia de absorção conduto, Morfometria 4,2 conduto, Morfometria 7 conduto

Grupos comparados	Espectroscopia de absorção atômica conduto (v12)	Morfometria 4,2 conduto (v14)	Morfometria 7 conduto (v15)
Controle x alumínio	0,0143	0,0143	0,6242
Controle x etanol-alumínio	0,0143	0,0143	0,0143
Alumínio x etanol-alumínio	0,6015	0,0090	0,0090

Valores de p < 0,0167 indicam significância estatística (correção de Bonferroni)

Na tabela abaixo são apresentadas, para parede e para cada grupo, as frequências (%) de ratos com as classificações de infiltrado inflamatório 0 ou 1 e a classificação 2.

Infiltrado inflamatório	Grupo	n	Classificação	
			0 ou 1	2
Conduto	Controle	4	5 (100%)	4 (100%)
	Alumínio	5		5 (100%)
	Etanol+alumínio	5		

Para parede, testou-se a hipótese nula de proporções iguais de infiltrado inflamatório igual a 2 nos dois grupos sob comparação, versus a hipótese alternativa de proporções diferentes. Na tabela abaixo são apresentados os valores de p dos testes estatísticos.

Grupos comparados	Infiltrado inflamatório
	Conduto
Controle x alumínio	1
Controle x etanol+alumínio	0,0079
Alumínio x etanol+alumínio	0,0079

(*) Teste exato de Fisher, agrupando-se as classificações 0 e 1.

Momento de avaliação: 60 dias

Para cada uma das variáveis de calcificação, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos três grupos de ratos, versus a hipótese alternativa de pelo menos um dos grupos com resultados diferentes dos demais. Na tabela abaixo são apresentados os resultados descritivos e os valores de p dos testes estatísticos.

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
Espectroscopia absorção atômica conduto	Controle	4	3,80	3,57	3,12	4,93	0,79	0,0145
	Alumínio	5	1,68	1,89	1,10	2,06	0,40	
	Etanol+alumínio	5	1,44	1,52	0,84	2,01	0,52	
Morfometria 4,2 conduto	Controle	4	60,99	59,09	25,76	100,00	31,02	0,0059
	Alumínio	5	29,62	28,30	23,55	37,29	5,79	
	Etanol+alumínio	5	6,08	5,89	3,56	11,09	3,04	
Morfometria 7 conduto	Controle	4	38,38	36,18	27,40	53,77	12,14	0,0031
	Alumínio	5	11,38	8,55	4,59	21,82	7,16	
	Etanol+alumínio	5	1,83	0,99	0,33	4,00	1,71	

Na tabela abaixo são apresentados os valores de p das comparações dos grupos dois a dois para as variáveis Espectroscopia absorção atômica conduto, Morfometria 4,2 conduto, Morfometria 7 conduto

Grupos comparados	Espectroscopia absorção atômica conduto	Morfo 4,2 conduto	Morfo 7 conduto
Controle x alumínio	0,0143	0,0864	0,0143
Controle x etanol-alumínio	0,0143	0,0143	0,0143
Alumínio x etanol-alumínio	0,3472	0,0090	0,0090

Valores de $p < 0,0167$ indicam significância estatística (correção de Bonferroni)

Na tabela abaixo são apresentadas, para aórtica e para cada grupo, as frequências (%) de ratos com as classificações de infiltrado inflamatório 0 ou 1 e a classificação 2.

Infiltrado inflamatório	Grupo	n	Classificação	
			0	2
Conduto	Controle	4		4 (100%)
	Alumínio	5		5 (100%)
	Etanol+alumínio	5	5 (100%)	

Para parede, testou-se a hipótese nula de proporções iguais de infiltrado inflamatório igual a 2 nos dois grupos sob comparação, versus a hipótese alternativa de proporções diferentes. Na tabela abaixo são apresentados os valores de p dos testes estatísticos.

Grupos comparados	Infiltrado inflamatório
	Conduto
Controle x alumínio	1
Controle x etanol+alumínio	0,0079
Alumínio x etanol+alumínio	0,0079

Amostra Condutos	Peso em g	mg de Ca	Relação
Controle 1 15dias	0,1647	0,125	0,758955677
Controle 2 15dias	0,3099	0,705	2,274927396
Controle 3 15dias	0,2879	0,41	1,424105592
Controle 4 15dias	0,2878	0,515	1,789437109
Média	0,262575	0,43875	1,670951157
Controle 1 30 dias	0,2478	0,76	3,066989508
Controle 2 30 dias	0,3501	1,195	3,413310483
Controle 3 30 dias	0,4119	1,29	3,131828114
Controle 4 30 dias	0,16	0,335	2,09375
Média	0,29245	0,895	3,060352197
Controle 1 60dias	0,1694	0,835	4,929161747
Controle 2 60dias	0,2563	0,895	3,492001561
Controle 3 60dias	0,3243	1,18	3,638606229
Controle 4 60dias	0,2723	0,85	3,121557106
Média	0,255575	0,94	3,677981023

GDA + AI 1 15dias	0,2157	0,415	1,923968475
GDA + AI 2 15dias	0,2023	0,39	1,927829956
GDA + AI 3 15dias	0,2361	0,425	1,80008471
GDA + AI 4 15dias	0,1697	0,255	1,502651738
GDA + AI 5 15dias	*****	*****	*****
Média	0,20595	0,37125	1,802621996
GDA + AI 1 30 dias	0,237	0,19	0,801687764
GDA + AI 2 30dias	0,1825	0,21	1,150684932
GDA + AI 3 30dias	0,1688	0,235	1,392180095
GDA + AI 4 30dias	0,32	0,38	1,1875
GDA + AI 5 30dias	0,2637	0,22	0,83428138
Média	0,2344	0,247	1,053754266
GDA + AI 1 60dias	0,229	0,325	1,419213974
GDA + AI 2 60dias	0,1118	0,23	2,057245081
GDA + AI 3 60dias	0,186	0,205	1,102150538
GDA + AI 4 60dias	0,201	0,38	1,890547264
GDA + AI 5 60dias	0,2017	0,39	1,9335647
Média	0,1859	0,306	1,646046261

GDA+Etanol + AI 1 15dias	0,1033	0,205	1,984511133
GDA+Etanol + AI 2 15dias	0,1115	0,165	1,479820628
GDA+Etanol + AI 3 15dias	0,0895	0,165	1,843575419
GDA+Etanol + AI 4 15dias	0,204	0,21	1,029411765
GDA +Etanol+ AI 5 15dias	0,0796	0,115	1,444723618
Média	0,11758	0,172	1,462833815
GDA +Etanol+ AI 1 30 dias	0,4306	0,44	1,021830005
GDA +Etanol+ AI 2 30dias	0,1549	0,16	1,032924467
GDA +Etanol+ AI 3 30dias	0,2012	0,205	1,01888668
GDA +Etanol+ AI 4 30dias	0,1581	0,145	0,91714105
GDA+Etanol + AI 5 30dias	0,2113	0,225	1,064836725
Média	0,23122	0,235	1,016348067
GDA +Etanol+ AI 1 60dias	0,1118	0,225	2,012522361
GDA +Etanol+ AI 2 60dias	0,256	0,25	0,9765625
GDA+Etanol + AI 3 60dias	0,267	0,405	1,516853933
GDA +Etanol+ AI 4 60dias	0,2455	0,205	0,83503055
GDA+Etanol + AI 5 60dias	0,1854	0,345	1,860841424
Média	0,21314	0,286	1,341841043