

MARCOS ALEXANDRE VIEIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DA BIOCMPATIBILIDADE
ENTRE ARTÉRIA BOVINA DESCELULARIZADA E
PRÓTESE DE POLITETRAFLUORETILENO EXPANDIDO
COMO ENXERTO ARTERIOVENOSO EM OVINOS**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

CURITIBA

2013

MARCOS ALEXANDRE VIEIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DA BIOCAMPATIBILIDADE
ENTRE ARTÉRIA BOVINA DESCELULARIZADA E
PRÓTESE DE POLITETRAFLUORETILENO EXPANDIDO
COMO ENXERTO ARTERIOVENOSO EM OVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Carlos Riella

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Diniz
Affonso da Costa

Curitiba

2013

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

Vieira, Marcos Alexandre
V658e Estudo comparativo da biocompatibilidade entre artéria bovina
2013 descelularizada e prótese de politetrafluoretileno expandido como enxerto
arteriovenoso em ovinos / Marcos Alexandre Vieira ; orientador, Miguel Carlos
Riella ; coorientador, Francisco Diniz Affonso da Costa. -- 2013.
95 f. ; il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2013
Bibliografia: 83-89

1. Insuficiência renal crônica. 2. Hemodiálise. 3. Biocompatibilidade.
I. Riella, Miguel Carlos. II. Costa, Francisco Diniz Affonso da. III. Pontifícia
Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 610

À minha família,

AGRADECIMENTOS

À minha esposa **Rita e meu filho Joaquim**, motivos de eu viver.

Ao meu orientador, **Prof.Dr. Miguel Carlos Riella**, pelo exemplo, conhecimento, apoio, orientação e espírito inovador.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa**, pelo apoio, orientação e profundo conhecimento na área da descelularização.

Aos meus grandes amigos neste mestrado, **João Gabriel Roderjan, Eduardo Vieira e Galvani Boch**.

Aos meus pais **Sônia e José Aluísio**, pelo eterno apoio.

Ao apoio dos meus familiares **Cristóvão, Carlos, Sr.Nelson e Sra. Jane e família**.

Aos meus **amigos** de trabalho da Fundação Pró-Rim, especialmente **Dr. José Aluísio Vieira e Dr.Hercílio Alexandre da Luz Filho** que me apoiam todos os dias e representam esta instituição que é um modelo para todos.

Aos patologistas **Dr.Hercílio Fronza Júnior, Dra. Arlete Benta de Souza e Dra. Lúcia Noronha** que me ensinaram muito neste estudo.

Ao meu amigo **Dr.Ademar Regueira**, que me ajudou prontamente a realizar as ultrassonografias.

Ao amigo **Sung Park e professora Márcia Olandoski** que realizaram a análise estatística do estudo.

Aos residentes de Medicina Veterinária e ao grupo do Laboratório de patologia.

À **Fundação Pró-Rim, Fundação Pró-Renal e Núcleo de Enxertos Cardiovasculares do Laboratório de Engenharia de Tecidos e Cultivo Celular da PUC-PR**, fundamentais para que a pesquisa pudesse ser realizada.

Obrigado.

RESUMO

A disfunção precoce do enxerto de politetrafluoretileno expandido (PTFEe) é um dos desafios a serem superados quanto ao acesso vascular para hemodiálise. A artéria torácica interna bovina descelularizada (ATIBD) pode ser uma opção. O estudo comparou dois grupos de ovinos, um com ATIBD e outro com PTFEe implantados entre a artéria carótida e a veia jugular. A ATIBD foi descelularizada com dodecil sulfato de sódio. O comportamento biológico dos enxertos foi avaliado através da análise histológica considerando repovoamento celular, reendotelização, trombose, neovascularização, calcificação, hiperplasia neointimal, infiltrado inflamatório e funcionalmente pelo estudo com ecodoppler ultrassonografia. O repovoamento celular ocorreu nos dois grupos. A matriz extracelular da ATIBD se mostrou preservada com repovoamento por células do ovino. Células endoteliais foram expressas através da análise imunohistoquímica com anticorpo anti-CD34. A ATIBD se mostrou mais organizada. O grupo ATIBD não apresentou trombose. Trombose foi identificada em cinco animais do grupo PTFEe. Não houve diferença estatística entre os grupos considerando infiltrado inflamatório, neovascularização, calcificação, reendotelização, repovoamento celular e hiperplasia neointimal. O diâmetro interno do enxerto descelularizado foi maior na análise ultrassonográfica. O grupo ATIBD apresentou resultados semelhantes ao PTFEe em diversas variáveis, porém não apresentou trombose e demonstrou adaptabilidade com maior diâmetro do enxerto e fluxo adequado.

Descritores: 1 doença renal crônica 2 acesso vascular para hemodiálise 3 biocompatibilidade 4 enxerto arteriovenoso 5 descelularização 6 PTFEe

ABSTRACT

Early dysfunction is a major problem when expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) grafts are utilized for hemodialysis. Another graft option may be a decellularized bovine artery (DBA). Our objective was to assess the biocompatibility of the DBA and to compare it with that of ePTFE. We compared 2 groups of sheep with DBA and ePTFE grafts implanted between the carotid artery and the jugular vein. The DBA was decellularized by a method utilizing sodium dodecyl sulfate. The biological behavior of the grafts was analyzed, taking into consideration cellular growth, re-endothelialization, thrombosis, neovascularization, calcification, neointimal hyperplasia, inflammatory infiltration, and Doppler results. Cellular in-growth was present in both groups. The DBA extracellular matrix was preserved and appeared repopulated by local tissue. Endothelial cells were expressed by CD34+ cells. The DBA was more organized and structured. A lower rate of thrombosis was identified in the DBA group. There were no differences between the groups regarding inflammatory infiltration, calcification, re-endothelialization, angiogenesis, or neointimal hyperplasia. A larger internal diameter of the bovine artery graft was identified by Doppler. The DBA group exhibited a lower rate of thrombosis, adequate flow, and adaptability of the decellularized graft tissue.

Keywords: chronic kidney disease; hemodialysis access; hemodialysis biocompatibility; arteriovenous graft; decellularization; ePTFE

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE QUADROS, FIGURAS E TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA E HEMODIÁLISE	17
2.2 ACESSO VASCULAR PARA HEMODIÁLISE: FAV E PTFEE	20
2.3 TÉCNICA CIRÚRGICA.....	22
2.4 BIOCOMPATIBILIDADE E DISFUNÇÕES RELACIONADAS AO ACESSO VASCULAR	24
2.5 ENXERTO DESCELULARIZADO	26
3. OBJETIVO	29
3.1 OBJETIVO GERAL:	30
4. MATERIAL E MÉTODO	31
4.1 MODELO ANIMAL	32
4.2 DESCELULARIZAÇÃO	32
4.3 PREPARO DA ARTÉRIA BOVINA DESCELULARIZADA E PRÓTESE DE POLITETRAFLUORETILENO PARA IMPLANTE CIRÚRGICO	34
4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	35
4.4.1 <i>Cuidados Pré-Operatórios</i>	35
4.4.2 <i>Técnica Operatória no implante dos enxertos:</i>	36
4.4.3 <i>Cuidado pós-operatório</i>	39
4.5 ECODOPPLER	39
4.6 EUTANÁSIA E EXPLANTE DO ENXERTO:	40
4.7 ANÁLISE MACROSCÓPICA	44
4.8 CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA	45

4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5.	RESULTADOS	49
5.1	MODELO ANIMAL E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	50
5.2	AVALIAÇÃO POR ECODOPPLER	50
5.3	ANÁLISE MACROSCÓPICA	53
5.4	CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA	54
5.4.1	<i>Quanto ao Repovoamento celular.....</i>	<i>54</i>
5.4.2	<i>Quanto à Reendotelização.....</i>	<i>57</i>
5.4.3	<i>Quanto à Trombose.....</i>	<i>59</i>
5.4.4	<i>Quanto à Neovascularização.....</i>	<i>62</i>
5.4.5	<i>Quanto à Calcificação</i>	<i>64</i>
5.4.6	<i>Quanto ao Infiltrado Inflamatório</i>	<i>67</i>
5.4.7	<i>Quanto à Camada Neointimal</i>	<i>68</i>
5.4.8	<i>Pentacrômico de Russel Movat´s.....</i>	<i>71</i>
5.4.9	<i>Imuno-histoquímica</i>	<i>72</i>
6.	DISCUSSÃO	74
7.	CONCLUSÕES.....	81
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9.	ANEXOS.....	90
10.	APÊNDICE	93

LISTA DE QUADROS, FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: DEMONSTRAÇÃO DO PROCESSO DE HEMODIÁLISE	20
FIGURA 2: FÍSTULA ARTERIOVENOSA COM A DEMONSTRAÇÃO DA ANASTOMOSE VENOSA E ARTERIAL.....	21
FIGURA 3: ENXERTO ARTERIOVENOSO COM PTFEE ENTRE A ARTÉRIA BRAQUIAL E A VEIA AXILAR NO BRAÇO. ...	22
FIGURA 4: SUTURA TERMINO-LATERAL PARA CONFECÇÃO DE FAV / PTFEE.	24
FIGURA 5: ARTÉRIA TORÁCICA INTERNA BOVINA.....	32
FIGURA 6: ANÁLISE HISTOLÓGICA DA ARTÉRIA TORÁCICA BOVINA ANTES E APÓS DESCELULARIZAÇÃO.....	33
FIGURA 7: ENXERTO SINTÉTICO DE PTFEE	34
FIGURA 8: ENXERTO DE ARTÉRIA TORÁCICA INTERNA BOVINA DESCELULARIZADA	34
FIGURA 9: FOTO DO SÍTIO ANATÔMICO ANTES DO IMPLANTE.	38
FIGURA 10: IMPLANTE DA ATIBD COMO ENXERTO ARTERIOVENOSO	38
FIGURA 11: IMPLANTE DA PRÓTESE DE PTFEE COMO ENXERTO ARTERIOVENOSO.....	39
FIGURA 12: LOCAL DO IMPLANTE DE PTFEE, RECOBERTO POR TECIDO CELULAR SUBCUTÂNEO E CÁPSULA DE TECIDO FIBRÓTICO ANTES DO EXPLANTE	41
FIGURA 13: ENXERTO ARTERIOVENOSO BOVINO DESCELULARIZADO	42
FIGURA 14: ENXERTO PTFEE.	43
FIGURA 15: MACROSCOPIA APÓS SECÇÃO DO ENXERTO.....	44
FIGURA 16: CORTES HISTOLÓGICOS REALIZADOS NOS TERÇOS ARTERIAL, VENOSO E MÉDIO	46
FIGURA 17: ULTRASSONOGRÁFIA DO ENXERTO ARTERIOVENOSO DEMONSTRANDO VEIA JUGULAR INTERNA, ENXERTO DESCELULARIZADO E ARTÉRIA CARÓTIDA.....	51
FIGURA 18: DOPPLER ULTRASSONOGRÁFIA COM AUSÊNCIA DE FLUXO NO PTFEE	51
FIGURA 19: DIÂMETRO INTERNO DA ATIBD	52
FIGURA 20: DOPPLER ULTRASSONOGRÁFIA	52
FIGURA 21: ANÁLISE MACROSCÓPICA	54
FIGURA 22: REPOVOAMENTO. ARTÉRIA BOVINA DESCELULARIZADA.....	55
FIGURA 23: REPOVOAMENTO. PTFEE	56
FIGURA 24: REENDOTELIZAÇÃO DA ATIBD.	58

FIGURA 25: REENDOTELIZAÇÃO DO PTFEE	58
FIGURA 26: TROMBOSE DO ENXERTO DE PTFEE	60
FIGURA 27: NEOVASCULARIZAÇÃO	62
FIGURA 28: CALCIFICAÇÃO. ALIZARINA RED PH 4,2 100x.....	64
FIGURA 29: INFILTRADO INFLAMATÓRIO.....	67
FIGURA 30: HIPERPLASIA DA CAMADA NEOINTIMAL NA REGIÃO DA ANASTOMOSE DA ATIBD.....	70
FIGURA 31: HIPERPLASIA NEOINTIMAL EM PRÓTESE DE PTFEE	70
FIGURA 32: PENTACRÔMICO DE RUSSEL- MOVAT 40X	71
FIGURA 33: ATIBD. PENTACRÔMICO DE RUSSEL- MOVAT'S 40X.....	72
FIGURA 34: IMUNO-HISTOQUÍMICA ATIBD	73
FIGURA 35: IMUNO-HISTOQUÍMICA PTFEE.....	73
QUADRO 1: ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	17
TABELA 1: ECODOPPLER.....	53
TABELA 2: REPOVOAMENTO CELULAR	57
TABELA 3: REENDOTELIZAÇÃO.....	59
TABELA 4: TROMBOSE.....	61
TABELA 5: NEOVASCULARIZAÇÃO	63
TABELA 6: CALCIFICAÇÃO PH 4,2.....	65
TABELA 7: CALCIFICAÇÃO PH 7.0.....	66
TABELA 8: INFILTRADO INFLAMATÓRIO	68
TABELA 9: HIPERPLASIA NEOINTIMAL	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ATIBD	Artéria torácica interna bovina descelularizada
DRC	Doença renal crônica
ED	Enxerto descelularizado
FAV	Fístula arteriovenosa
GTA	Guia de Trânsito de Animais
HD	Hemodiálise
HE	Hematoxilina – eosina
HN	Hiperplasia neointimal
MO	Microscopia Óptica
NKF	National Kidney Foundation
PTFEe	Politetrafluoretileno expandido
SIF	Serviço de Inspeção Federal

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é um problema de saúde pública crescente, um quadro epidêmico mundial [1]. A prevalência estimada de pacientes com doença renal crônica no Brasil era de 540 pacientes pmp, estimando uma população com a doença em torno de 15 milhões de pessoas[2]. Em 2011 o último censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia estimou 91.314 pacientes em tratamento dialítico[3].

O acesso vascular é conhecido como a linha de vida do paciente em hemodiálise[4-6]. As duas principais formas de acesso vascular para hemodiálise são fístula arteriovenosa e a prótese de politetrafluoretileno expandido (PTFEe)[7]. As recomendações da National Kidney Foundation para acesso vascular são fístula arteriovenosa (FAV) radiocefálica e braquiocefálica [8]. Conhecidamente a perviedade da FAV é superior à do PTFEe [9]. Mesmo assim, alguns pacientes não têm condições de confeccionar uma fístula por dificuldades como diabetes melito, tamanho adequado dos vasos, lesão dos vasos ou encaminhamento tardio[10]. Neste caso, a opção de acesso vascular definitivo mais utilizado é o PTFEe [7]. Os índices de perviedade do PTFEe são baixos, seja por infecção, hiperplasia neointimal ou trombose com consequente estenose do acesso principalmente no local da anastomose do vaso com o enxerto[11, 12]. Outras opções de acesso já foram estudadas no passado, como enxertos criopreservados com complicações como aneurisma e calcificação do enxerto. Além disso, estes enxertos criopreservados podem estar relacionados à alosensibilização do paciente renal pela presença de células do doador [13-15].

A técnica de descélularização com posterior repovoamento do tecido autólogo apresentou bons resultados em válvulas cardíacas[16]. A descélularização pode ser realizada através de processos químico, enzimático ou físico e tem o objetivo de eliminar as células e preservar os demais componentes do tecido mantendo as propriedades biomecânicas[17-21].

Enxertos descélularizados são promissores como opção para os pacientes que necessitam de um acesso arteriovenoso para hemodiálise. O conhecimento do enxerto descélularizado, seu comportamento como achados histológicos e funcionais, são importantes para sua utilização como acesso para hemodiálise.

Existe a necessidade de um acesso alternativo com fluxo adequado, baixos índices de infecção, pequeno comprometimento da sua estrutura e ausência de trombose, adaptando-se ao receptor, isto é, biocompatível. Define-se biocompatibilidade como a capacidade de um biomaterial em ter uma adequada resposta do hospedeiro em uma aplicação específica[22].

Com os critérios adotados para análise histológica e funcional, o objetivo do estudo foi realizado a partir da hipótese que o grupo ATIBD teria menos trombose do que o grupo PTFEe e sua estrutura seria mais organizada, com melhor reendotelização e repovoamento celular.

O estudo experimental tem como objetivo estudar o comportamento biológico da artéria torácica interna bovina descelularizada e compará-la com PTFEe como enxerto arteriovenoso em ovinos através da análise funcional por Doppler ultrassonografia e histológica dos enxertos. Este é um estudo que dá continuidade a diversos projetos que acontecem no Núcleo de Enxertos Cardiovasculares do Laboratório de Engenharia de Tecidos e Cultivo Celular da PUC-PR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insuficiência Renal Crônica e Hemodiálise

A DRC é definida pela presença de anormalidades da estrutura renal ou função presente por mais de 3 meses com implicações para saúde e é classificada baseada na causa e em estágios conforme a taxa de filtração glomerular e grau de albuminúria (Quadro 1).

Quadro 1: Estágios da doença renal crônica

Prognóstico de DRC pela TFG e grau de albuminúria: KDIGO 2012				Graus de albuminúria persistente		
				Descrição e variação		
				Normal a leve aumento	Aumento moderado	Aumento severo
				<30mg/g <3mg/mmol	30 – 300mg/g 3 - 30mg/mmol	>300mg/g >30mg/mmol
TFG – categorias (ml/min/1.73m ²) Descrição e variação	G1	Normal	90			
	G2	Redução leve	60 – 89			
	G3a	Redução leve a moderada	45 – 59			
	G3b	Redução moderada a severa	30 – 44			
	G4	Redução severa	15 – 29			
	G5	Falência renal	<15			

Verde: baixo risco (se não houver outro marcador de doença renal, sem DRC). Amarelo: risco moderado.

Laranja: risco elevado. Vermelho: risco muito elevado.

Fonte: KDIGO 2012. www.kdigo.org

A doença renal crônica terminal é definida quando o paciente apresenta TFG < 15ml/min/1,73m², e usualmente neste estágio é acompanhada de sinais e sintomas de uremia. Classicamente é neste momento que o paciente necessita de terapia renal substitutiva. Os métodos existentes para substituição da função renal são três: hemodiálise, diálise peritoneal e transplante renal.

A hemodiálise é um tratamento que inicialmente foi utilizado para pacientes com insuficiência renal aguda e a partir de 1960 passou a ser utilizado em pacientes com insuficiência renal crônica terminal. Apesar do tratamento mais indicado para a maioria dos pacientes, ser o transplante renal, muitos não tem condição clínica, desejo ou acesso ao transplante em consequência da escassez de órgãos para realizar este tratamento. Sendo assim os pacientes necessitam realizar hemodiálise como terapia crônica e de manutenção da vida.

As indicações clássicas de hemodiálise para pacientes crônicos são estágio 5 da doença (TGF < 15ml/min/73m²), sinais e sintomas de uremia como náuseas, vômitos, soluços, hiperpotassemia, hipervolemia, pericardite urêmica e acidose metabólica.

A hemodiálise é um processo de troca de solutos e solventes através de uma membrana semipermeável, o filtro de hemodiálise. O filtro separa as duas soluções, sangue e solução de troca e ocorre um movimento bidirecional através da membrana. O movimento de solutos, definido como difusão, tem como principal característica a passagem de partículas do local mais concentrado para o menos concentrado e o movimento de água do local de menor concentração para o local de maior concentração, este definido como convecção que ocorre até se estabelecer um equilíbrio. A adsorção também é um mecanismo que retira moléculas maiores quando ocorre o contato do sangue com a membrana do filtro. Para que se faça o tratamento de hemodiálise alguns componentes são fundamentais, como água tratada por um sistema que inclui a passagem da água por um filtro de sedimentação, carvão ativado com objetivo de retirar cloro e cloraminas, um sistema para remoção de íons, um sistema de remoção de partículas e osmose reversa. Esta água é utilizada com a solução de troca para através das membranas ou dialisadores entrar em contato com o sangue e fazer as trocas. Para que isto ocorra é necessária uma máquina de hemodiálise, que consiste em uma bomba que promove a circulação sanguínea extracorpórea e um sistema responsável pelo fluxo de solução de diálise que vai ao filtro. Isto é realizado com o objetivo de realizar as trocas e retirar líquido do organismo. Para que todo este processo com segurança ocorra, as máquinas são dotadas de alarmes e sensores[23].

Todo este processo exige que exista a saída de sangue do paciente, passagem pela membrana de diálise e troca com a solução de tratamento. O circuito de saída de sangue do paciente, passagem pelo filtro e retorno exige que se tenha um acesso vascular. O processo está apresentado esquematicamente na Figura 1.

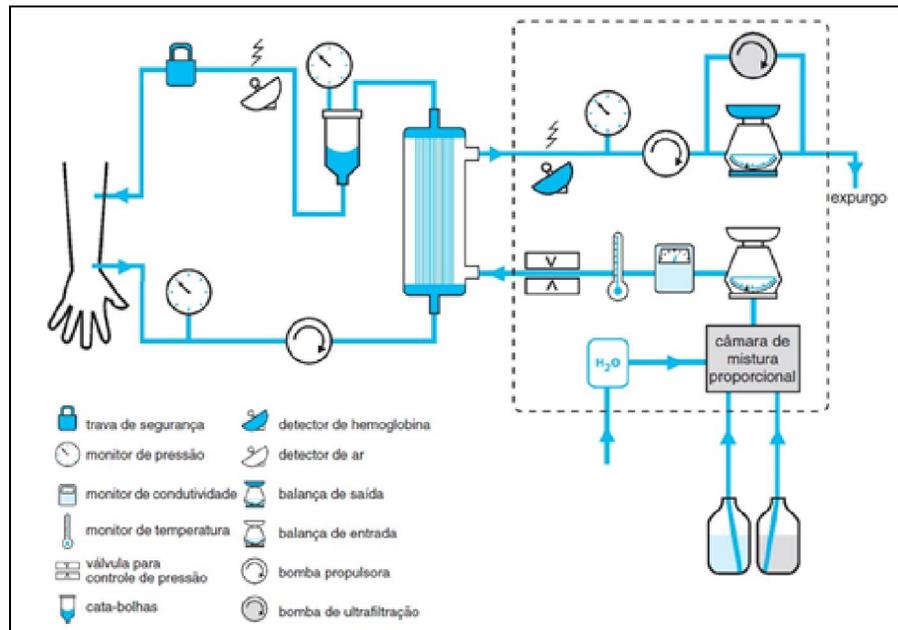


Figura 1: Demonstração do processo de hemodiálise

Fonte: Riella, M.C., *Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos. Quarta Edição, RJ, 2003, Editora Guanabara Koogan*

2.2 Acesso Vascular para Hemodiálise: FAV e PTFE

O acesso vascular é fundamental para realizar uma sessão de hemodiálise. Necessita ser durável, com baixo índice de infecção e com fluxo de sangue adequado.

O primeiro acesso vascular para hemodiálise foi fruto do trabalho de três profissionais, Belding Scribner, Wayne Quinton e David Dillard. Scribner teve a ideia de realizar um shunt entre a artéria e veia do antebraço, Quinton usou uma cânula de teflon para fazer a conexão entre os vasos e Dillard foi o cirurgião que implantou o primeiro shunt arteriovenoso no dia 09 de março de 1960[24]. Esta inovação da época possibilitou o início da terapia dialítica para pacientes crônicos.

Em 1966, Brescia, Cimino, Appel e Hurwich publicaram no *New England Journal of Medicine* uma nova técnica para confecção de um acesso vascular para hemodiálise, denominada fístula arteriovenosa (FAV), que possibilitou punções venosas repetidas por inúmeras vezes para realizar o tratamento dialítico[25]. Hoje a diretriz do *Kidney Disease*

Outcomes Quality Initiative (KDOQI) orienta que se considere a confecção de FAV (Figura 2) como a primeira escolha de acesso permanente para realização de hemodiálise[26]. Além disso, é um acesso de baixa morbidade, mortalidade e baixo custo de manutenção[27].

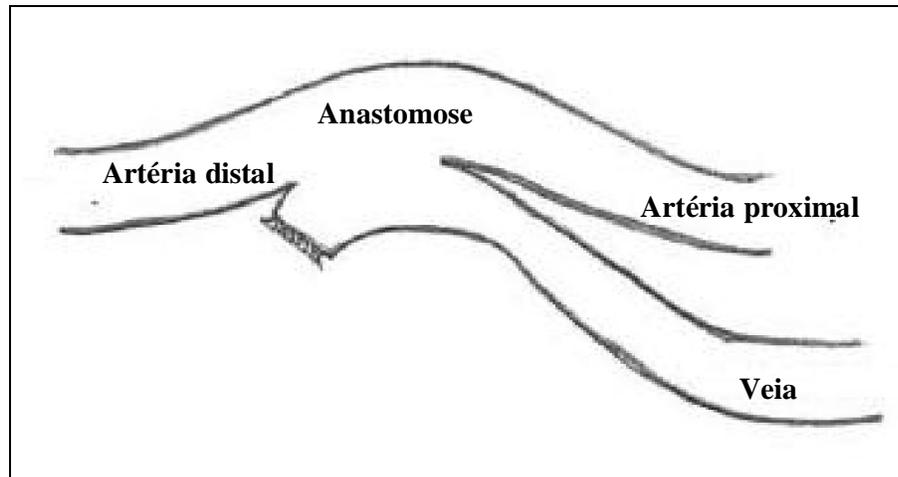


Figura 2: Fístula arteriovenosa com a demonstração da anastomose venosa e arterial

Apesar desta orientação, muitos pacientes não têm a possibilidade de confecção da FAV devido à anatomia venosa ou arterial inadequada e necessitam de um acesso alternativo. O acesso vascular mais utilizado para solução destes casos é a cirurgia com enxerto sintético de politetrafluoretileno expandido (PTFEe), que é definido como o acesso não autólogo de escolha. Este acesso é realizado através da anastomose da artéria e da veia com uma prótese de PTFEe, criando uma comunicação, um shunt arteriovenoso, como demonstrado na Figura 3.

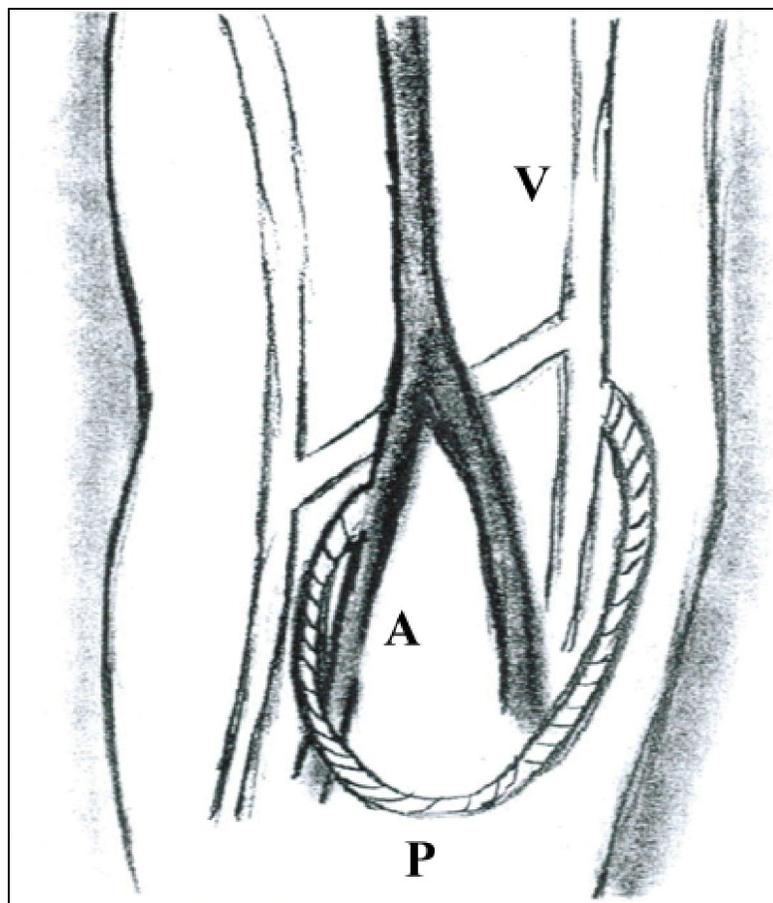


Figura 3: Enxerto arteriovenoso com PTFEe (P) entre a artéria braquial (A) e a veia axilar no braço(V).

Fonte: Carlos José de Brito. Cirurgia Vascul: cirurgia vascular e angiologia. Volume II, 2002, Livraria e Editora Revinter

No Brasil a porcentagem de pacientes com este acesso está em torno de 3%[28]. O enxerto arteriovenoso de politetrafluoretileno expandido, PTFEe, é comumente utilizado para confecção do acesso para hemodiálise, principalmente nos EUA.

2.3 Técnica Cirúrgica

A técnica cirúrgica para confecção da FAV e do PTFEe é semelhante.

Inicialmente se realiza uma incisão de 4 a 5 cm longitudinal na pele entre a veia e a artéria. Usualmente, no homem o primeiro acesso vascular é uma anastomose radiocefálica.

Dissecção do tecido em torno da veia e isolamento desta é realizado, assim como da artéria. Cuidado com as estruturas nervosas é fundamental, além de evitar qualquer lesão dos vasos durante a dissecção. A veia precisa durante a cirurgia ser mobilizada e ocasionalmente dilatada.

Quatro tipos de anastomose podem ser realizados. Anastomose latero-lateral (campo lateral da veia e da artéria) termino-lateral (campo terminal da veia e lateral da artéria), latero-terminal (campo lateral da veia e terminal da artéria) e termino-terminal (campo terminal da veia e da artéria). Para confecção do PTFEe a anastomose latero-terminal é usualmente realizada, isto é, campo lateral da veia com terminal do PTFEe e lateral da artéria com terminal do PTFEe, conforme Figura 3 e Figura 4.

Após a individualização dos vasos e clampeamento destes, uma incisão de 4 a 7 mm com lâmina número 11 é feita tanto na artéria como na veia. Um fio é passado em cada extremidade da incisão venosa e na extremidade do PTFEe ou arterial para manter a orientação para anastomose. Do centro do vaso, a anastomose é iniciada em direção às extremidades. Outra forma é utilizando os fios das extremidades para a anastomose. Usualmente após o termino da anastomose se irriga a porção venosa com solução salina e se retiram os clampes venoso e arterial, sentindo um frêmito na anastomose. Solução de heparina pode ser utilizada na tentativa de evitar complicações como trombose. Após o termino da anastomose e sem evidência de sangramentos é realizada uma sutura da pele com fio monylon[29].

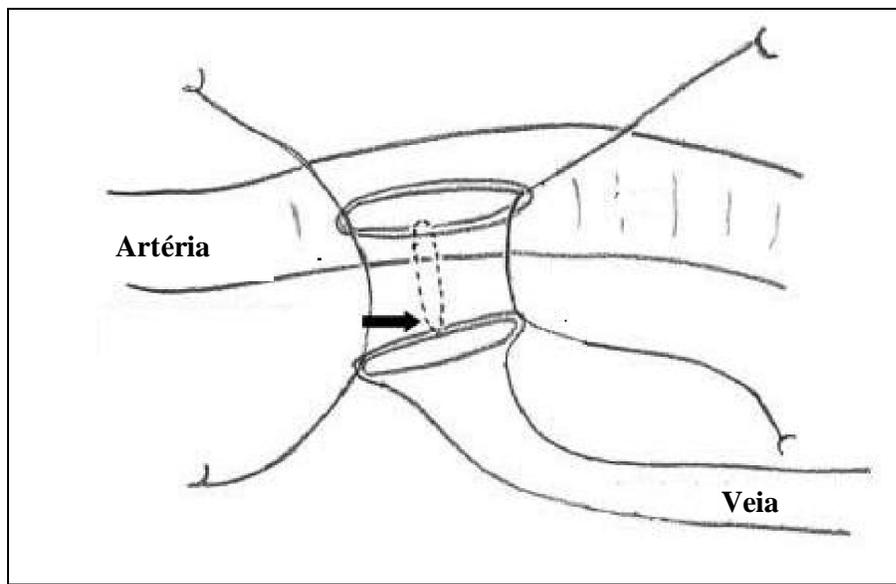


Figura 4: Sutura termino-lateral para confecção de FAV / PTFE.

2.4 Biocompatibilidade e Disfunções Relacionadas ao Acesso Vascular

. O termo biocompatibilidade vem sendo utilizado desde os anos 50 para análise da reação tecidual frente a um biomaterial[30]. O conceito mais utilizado de biocompatibilidade é definido como a habilidade de um material em gerar uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica[22]. Este conceito foi ampliado pelo mesmo autor: "Biocompatibilidade refere-se à capacidade de um biomaterial em desempenhar a função desejada, sem suscitar efeitos locais ou sistêmicos indesejados para o hospedeiro, gerando a mais apropriada resposta celular ou tecidual em situação específica, melhorando o desempenho da terapia de forma relevante"[31].

A análise do comportamento biológico de homoenxertos valvares pulmonares descelularizados implantados em ovinos pode ser um exemplo do conceito de biocompatibilidade. Este estudo relatou a integridade das válvulas descelularizadas, repovoamento celular organizado, sinais de remodelamento, sem sinais de degeneração ou calcificação relevante após o implante, demonstrando um excelente comportamento biológico [32]. A submucosa de intestino delgado descelularizada tem sido utilizada com sucesso, inicialmente como prótese vascular e posteriormente em outros tecidos. A descrição do

comportamento biológico após o implante demonstrou repovoamento celular do tecido e um processo de remodelamento associado à neovascularização, migração e diferenciação celular e deposição de matriz extracelular com uma resposta em que este tecido remodelado permanece estrutural e funcionalmente semelhante ao tecido que necessitava ser substituído[33-35]. Estes exemplos demonstram o conceito de biocompatibilidade de um tecido frente ao hospedeiro.

O PTFEe é o principal biomaterial utilizado como opção de acesso vascular quando a FAV não apresenta um desenvolvimento adequado. Mesmo sendo uma das escolhas, apresenta pior resultado que a FAV, seja por complicações infecciosas ou por trombose[9, 36, 37].

Assim como todo biomaterial, o PTFEe apresenta uma resposta adaptativa após o seu implante. Seu principal fator limitante é sua disfunção em um curto tempo após sua confecção. Cerca de 50% destes acessos não tem função após um ano da sua confecção e 75% após dois anos. Diversas são as causas para a possível disfunção, como distúrbios de coagulação, sangramentos, aterosclerose, estenose e trombose do acesso[38].

A trombose é causa de 80% das disfunções relacionadas à prótese. Este é um importante problema para o paciente renal, pois inviabiliza o uso do acesso vascular para hemodiálise. A principal patologia que acompanha os pacientes com trombose é a hiperplasia venosa neointimal no local da anastomose proximal à prótese[39]. Outras etiologias estão presentes nos eventos trombóticos do acesso vascular[40]. A lesão vascular, ausência de endotélio com exposição das estruturas subendoteliais e consequente aderência plaquetária no subendotélio faz parte do processo relacionado à trombose do acesso[41]. A proliferação de células musculares lisas, diferenciação de fibroblastos, processo inflamatório crônico são alterações encontradas na disfunção do enxerto[42].

A hiperplasia venosa neointimal é caracterizada pela presença de células musculares lisas, miofibroblastos, microvasos neointimais e adventícios, macrófagos e componentes da matriz extracelular [43], [44], [45]. Isto pode ocorrer em resposta a uma lesão endotelial após o implante da prótese, com reação ao corpo estranho, alterações da propriedade elástica da artéria e veia, estresse secundário ao fluxo de sangue e canulação do acesso[46]. A lesão endotelial apresenta uma exposição da membrana basal endotelial e matriz extracelular ou da própria prótese que ativam as plaquetas e conseqüentemente ocorre secreção de serotonina, tromboxane A2 e PDGF, promotores da proliferação de células musculares lisas[47].

Estudos da investigação da fisiopatologia da trombose do acesso vascular sugerem que estas respostas de reparo da lesão endotelial como secreção de promotores da proliferação de células musculares, estresse oxidativo e processo inflamatório promovem um meio propício à trombose[48].

Assim, uma ação tecidual reparativa, degenerativa, com fibrose, hiperplasia intimal, disfunção do enxerto e trombose pode ocorrer, sendo que esta complicação impossibilita o uso da prótese para hemodiálise.

2.5 Enxerto Descelularizado

Acessos alternativos ao PTFEe, que sejam resistentes e semelhantes à FAV estão sendo estudados[49, 50].

Na década de setenta o uso da artéria bovina como acesso vascular para hemodiálise (HD), foi descrito por Chinitz et al, porém com o advento dos enxertos de PTFEe deixou de ser utilizado, apesar do uso do PTFEe não ser consenso de superioridade quando comparado ao heteroenxerto naquela época[51, 52].

A utilização, de homoenxertos e heteroenxertos, não demonstraram bons resultados para fins de cirurgia coronariana, vascular periférica ou para acesso vascular para hemodiálise no passado [13]. Com a introdução de novas técnicas de criopreservação, as veias criopreservadas demonstraram um maior potencial de resistência à infecção e melhor perviedade, pois uma grande quantidade de células endoteliais se mantém viáveis no momento do implante nesse método[15], [53].

Materiais como veia femoral criopreservadas, veia mesentérica bovina (Procol^R), veia do cordão umbilical e ureter (Synergraft^R) foram desenvolvidos e utilizados[54]. Veia umbilical humana e veia bovina fixada com glutaraldeído foram testadas e descartadas devido à elevada incidência de aneurismas após o implante. [55, 56]

O emprego de enxertos com veia femoral criopreservada para pacientes com dificuldade de acesso vascular se mostrou benéfico em determinados casos, como em áreas infectadas ao redor do implante [56]. Matsura e colaboradores demonstraram que a taxa de perviedade da veia femoral criopreservada e do enxerto de PTFEe foram similares.

Veia femoral cadavérica criopreservada foi utilizada como acesso vascular para hemodiálise e comparada com PTFEe. O grupo com veias criopreservadas (CRY, SYN) foi mais resistente à infecção, porém com um número maior de aneurismas[57].

Apesar dos resultados favoráveis, enxertos criopreservados podem causar alosensibilização no receptor devido às células do doador, que até então se acreditava serem benéficas para o resultado do enxerto. Esta sensibilização pode dificultar o transplante em pacientes com doença renal crônica em diálise[15]. A maior resposta imunogênica que ocorre pela permanência de células endoteliais viáveis no método de criopreservação clássica, também foi relatada quando utilizado para próteses valvares em cirurgia pediátrica, podendo contribuir para degeneração do enxerto[58].

Uma alternativa ao uso das próteses de PTFEe como FAV indireta são os enxertos descelularizados (ED). Esta técnica foi inicialmente proposta em 1998 por Bader et al[59].

A técnica de descelularização com posterior repovoamento do tecido autólogo é conhecida e estabelecida para válvulas cardíacas. O'Brien demonstrou com sucesso implante de válvulas descelularizadas em carneiro com posterior repovoamento podendo oferecer maior durabilidade do enxerto[60].

A descelularização de enxertos vasculares tem por objetivo remover antígenos; preservação da membrana basal para facilitar reendotelização; preservação dos elementos estruturais, colágeno e elastina, para manter as propriedades biomecânicas similares aos vasos nativos e diminuir a calcificação do enxerto associada a restos celulares.

Estudos experimentais com ED demonstraram ausência de rejeição, de degeneração, boa perviedade e repovoamento do enxerto com células do hospedeiro. Estes resultados histológico e funcional positivo sugerem que enxertos descelularizados poderiam, no futuro, ser utilizados em cirurgias de vasos de pequeno diâmetro, em territórios infectados e como enxerto para hemodiálise[15], [58], [60].

O uso de ED como acesso vascular para hemodiálise realizado em modelo canino, utilizando ureter bovino descelularizado obteve uma perviedade primária em 12 meses, similar nos dois grupos comparados (58% para ED e 57% para PTFEe) [61].

O ureter bovino descelularizado (SynerGraft, SGVG 100) também foi utilizado para pacientes em que o acesso vascular convencional não foi possível. A perviedade primária (enxerto funcionante sem necessidade de intervenção) e a primária assistida (enxerto

funcionante submetido à intervenção) foram de 29% e 45% e a secundária de 81%, livres de infecção em 95% em um ano, demonstrando a possibilidade de utilização deste enxerto [62].

Um estudo prospectivo randomizado comparando artéria bovina (Artegraft®) e PTFEe como acesso para hemodiálise demonstrou diferenças entre os grupos. Apesar de não ocorrer diferença quanto à perviedade secundária, a perviedade primária e primária assistida foi significativamente melhor no grupo da artéria bovina. A principal complicação em ambos os grupos foi trombose que ocorreu em maior número no grupo PTFEe. [63].

Sendo assim, são necessários estudos de enxertos descelularizados para conhecimento do comportamento biológico de um tecido, que conserva as características funcionais de um vaso, como enxerto arteriovenoso para hemodiálise.

3. **OBJETIVO**

3.1 Objetivo Geral:

- Estudar a artéria torácica bovina interna descelularizada e avaliar sua biocompatibilidade através do estudo histológico e funcional por Doppler ultrassonografia, comparando à prótese de politetrafluoretileno expandido (PTFEe) como enxerto arteriovenoso em ovinos.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Modelo Animal

Após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUC-PR sob o número 368, a utilização dos animais seguiu todas as determinações legais e foram comprados em locais certificados. Adquiridos os animais, estes passaram a ser cuidados na Unidade Hospitalar para Animais da Fazenda do Hospital Veterinário da PUC-PR, situado na Fazenda Experimental Gralha Azul, no município de Fazenda Rio Grande.

Foram utilizados no projeto 21 ovinos da raça Suffolk, com idade entre cinco e seis meses e peso de 22 ± 3 kg.

Em 11 carneiros foram implantados enxertos de PTFEe (grupo controle), e nos 10 restantes, a artéria torácica interna bovina descelularizada (ATIBD).

4.2 Descelularização

Os enxertos vasculares bovinos foram obtidos de abatedouro da Região Metropolitana de Curitiba-PR, credenciado ao SIF (Serviço de Inspeção Federal) de animais saudáveis. O processo de explante da artéria torácica interna bovina ocorreu por dissecação com tesoura Metzemaum da artéria e de seus ramos. Os enxertos foram transportados até o Laboratório de Engenharia e Transplante Celular da PUC-PR em solução fisiológica a 4 °C, devidamente armazenados.

O preparo dos vasos foi realizado em bancada, com retirada do tecido adiposo, dissecação e anastomose dos ramos com fio polipropileno 6-0 (Figura 5).



Figura 5: Artéria torácica interna bovina

Os enxertos foram submetidos ao processo de descclularização com SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,1%, seguindo a metodologia conforme patente Brasileira PI0800603-2 “MÉTOD0 PARA TORNAR UM TECIDO BIOLÓGICO ACELULAR E RECEPTIVO A NOVAS CELULAS, POU00 IMUNOGÊNICO” realizado no laboratório do Núcleo de Enxertos Cardiovasculares do Laboratório de Engenharia de Tecidos e Cultivo Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Os enxertos foram imersos em frascos individuais contendo 250 ml de solução descclularizante composto por SDS 0.1% e submetidos a um processo de agitação constante a 185 rotações por minuto a temperatura ambiente por um período de 24 horas. A artéria torácica bovina foi submetida a um enxague com etanol 70% e agitado por 10 vezes com solução de cloreto de sódio 0,9% para garantir a completa remoção de resíduos e da solução de descclularização em um período de 24 horas. A efetividade do processo de descclularização foi comprovada por amostragem e análise histológica utilizando coloração HE (Figura 6)[32].

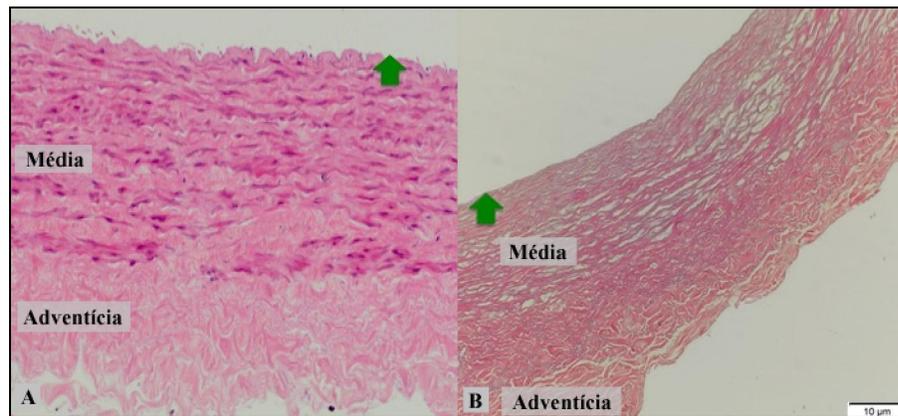


Figura 6: Artéria torácica bovina (A) apresentando as três camadas, íntima (flecha verde), média e adventícia. Artéria torácica interna bovina descclularizada (B) – camada íntima (flecha verde), média com fibras separadas em sua estrutura e adventícia . HE 200x

Os enxertos foram mantidos e imersos em meio nutriente Roswel Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma®), contendo antibióticos cefoxitina 240µg/ml, lincomicina 120µg/ml, polimixina 100µg/ml e vancomicina 50µg/ml seguindo protocolo da Instituição.

4.3 Preparo da artéria bovina descelularizada e prótese de politetrafluoretileno para implante cirúrgico

Em cirurgia de bancada a ATIBD e a prótese PTFEe foram preparadas para o implante no carneiro. Todos os vasos e enxertos foram preparados e selecionados, sendo definido o tamanho de 50,0mm de extensão e 6,0mm de diâmetro da prótese de PTFEe e da ATIBD para o implante nos animais (Figura 7; Figura 8).

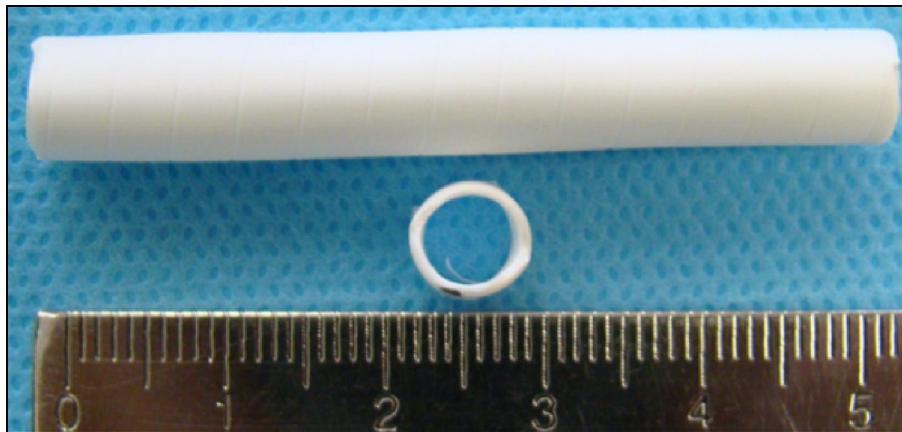


Figura 7: Enxerto sintético de PTFEe, JOTEC® - Vascular Prosthesis; REF 10SW8006N, Lote 927349

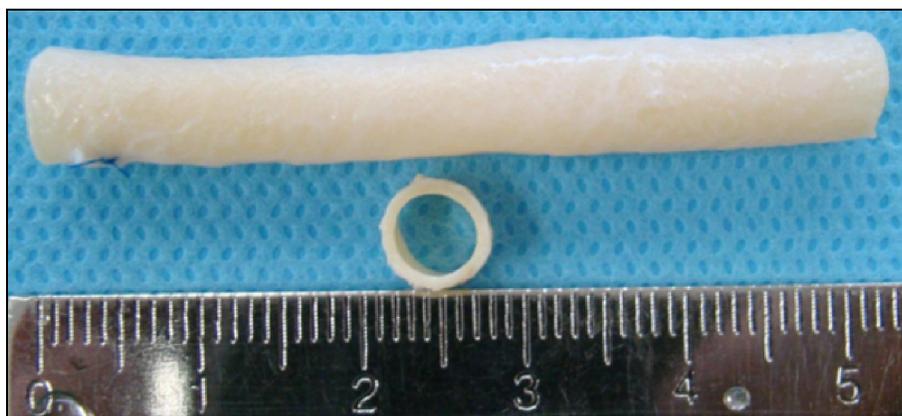


Figura 8: Enxerto de artéria torácica interna bovina descelularizada

4.4 Procedimento cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no hospital veterinário da PUC-PR em São José dos Pinhais, que apresenta estrutura para procedimento cirúrgico em animais de médio porte. Os seguintes materiais permanentes e de consumo para a realização do projeto foram utilizados:

Materiais Permanentes:

- Respirador mecânico a volume da marca Oxigel 1722.
- Monitor para aferição de pressão invasiva e monitorização de eletrocardiograma, marca Datascope.
- Capnógrafo para aferição do pCO₂ expirado.
- Bandeja cirúrgica para cirurgia cardiovascular.

Materiais de consumo para cirurgia: tubo orotraqueal, propofol, diazepam, butorfanol, lidocaína, halotano, ketamina, ceftiofur, gentamicina, heparina, flumexil meglumine, ácido acetilsalicílico, dipiridamol, soro fisiológico 0,9%, luvas estéreis, fios cirúrgicos de polipropileno 6-0 e 5-0, poligalactina 2-0 e mononylon 3-0.

4.4.1 Cuidados Pré-Operatórios

Foram respeitados os princípios éticos no manejo do modelo animal.

O cuidado pré-operatório foi realizado na Fazenda Gralha Azul da PUC-PR por médicos veterinários e submetidos à avaliação clínica geral. Foram aceitos somente animais saudáveis.

Vacinação e desvermifugação indicada para a espécie.

Os animais ficaram em jejum pré-operatório de 36 horas para alimentos sólidos e 12 horas para líquidos.

Na véspera da operação foi feito antibiótico profilático com cloridrato de ceftiofur 1 mg/kg e sulfato de gentamicina 4 mg/kg. Administração de AAS e dipiridamol 75mg no dia do implante do enxerto.

4.4.2 Técnica Operatória no implante dos enxertos:

Todas as cirurgias foram realizadas por um médico especializado em cirurgia vascular[64, 65].

Na sala cirúrgica, foi realizada tricotomia cervical e puncionado a veia cefálica do membro anterior esquerdo para acesso venoso. Foi feita a monitorização contínua com eletrocardiograma de cinco canais e da saturação arterial de oxigênio com oxímetro de pulso colocado na língua do animal.

A medicação pré-anestésica consistiu de diazepam 0,5 mg/Kg e tartarato de butorfanol 0,4mg/Kg. Neste tempo, foi administrada a dose profilática de antibiótico, por via intravenosa com ceftiofur 1mg/kg e sulfato de gentamicina 4 mg/kg.

A indução anestésica foi feita com 4mg/Kg de propofol, seguida de intubação oro-traqueal com sonda de 7 mm com balonete. O oxigênio foi provido por um circuito fechado de oxigenação com ventilação por pressão positiva intermitente através de respirador a volume oxigel 1722 (OxigelMats. Hosps. Ind. e Com. Ltda®). A manutenção anestésica foi realizada com propofol 0,6mg/Kg/min.

4.4.2.1 Descrição cirúrgica do implante da ATIBD:

- a) Animal anestesiado com propofol, em decúbito ventral, com tricotomia cervical.
- b) Anti-sepsia com povidine-iodo da região cervical do animal.
- c) Incisão longitudinal sobre a artéria carótida e veia jugular.
- d) Dissecção e reparo com fita cardíaca da artéria e veia (Figura 9).
- e) Heparinização do animal com 250 UI/Kg de heparina sódica.
- f) Pinçamento proximal e distal da artéria carótida.

- g) Arteriotomia e anastomose com fio de polipropileno 6-0, sutura contínua, término-lateral do enxerto descelularizado.
- h) Pinçamento da veia e venotomia.
- i) Anastomose com fio de polipropileno 6-0, sutura contínua, término-lateral do enxerto descelularizado com a veia jugular (Figura 10).
- j) Sutura com ponto contínuo do subcutâneo com fio de poligalactina 2-0.
- k) Sutura do couro com fio mononylon 3-0.

4.4.2.2 Descrição cirúrgica do implante do PTFEe:

- a) Animal anestesiado com propofol, em decúbito ventral, com tricotomia cervical.
- b) Anti-sepsia com povidine-iodo.
- c) Incisão longitudinal sobre a artéria carótida e veia jugular.
- d) Dissecção e reparo com fita cardíaca da artéria e veia (Figura 9).
- e) Heparinização do animal com 250 UI/Kg de heparina.
- f) Pinçamento proximal e distal da artéria carótida.
- g) Arteriotomia e anastomose com fio de polipropileno 6-0, sutura contínua, término-lateral com PTFEe.
- h) Pinçamento da veia e venotomia.
- i) Anastomose com fio de polipropileno 6-0, sutura contínua, término-lateral do PTFEe com a veia jugular (Figura 11).
- j) Sutura com ponto contínuo do subcutâneo com fio de poligalactina 2-0.
- k) Sutura do couro com fio mononylon 3-0.

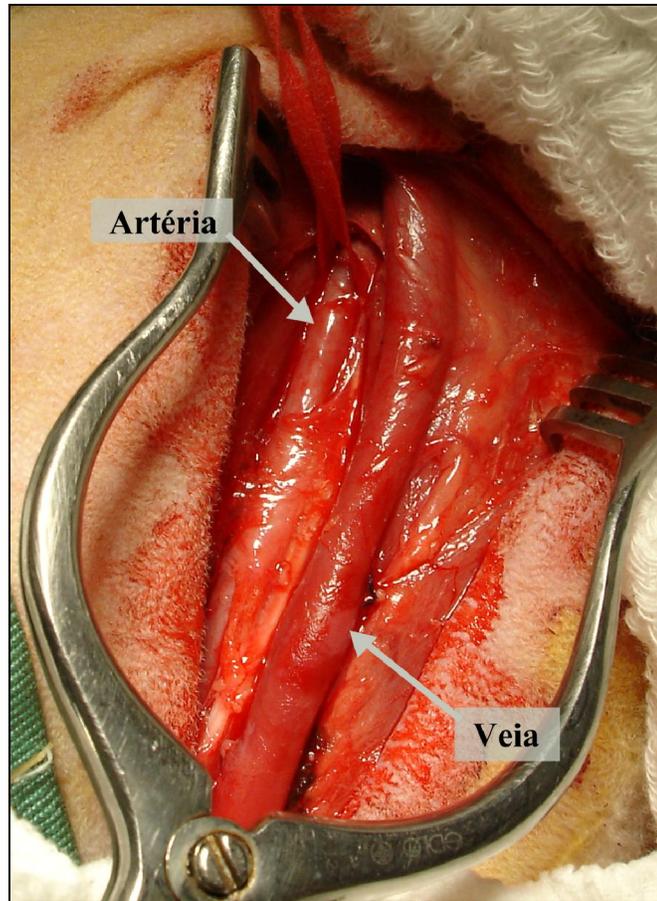


Figura 9: Foto do sítio anatômico antes do implante. Observa-se a artéria carótida e veia jugular interna



Figura 10: Implante da ATIBD como enxerto arteriovenoso



Figura 11: Implante da prótese de PTFEe como enxerto arteriovenoso

4.4.3 Cuidado pós-operatório

Os animais receberam analgesia com flumexil meglumine 1,5mg/Kg endovenoso e cuidados pós-operatórios. Após, foram encaminhados para o Hospital Veterinário na Fazenda Galha Azul - PUCPR, onde ficaram confinados com alimentação adequada. Antibioticoterapia com ceftiofur 1mg/Kg ao dia, gentamicina 4mg/Kg de 12/12 horas e medicações com efeitos anti-agregantes plaquetários, ácido acetil salicílico 100mg/dia e dipiridamol 75mg/dia, foram administrados por cinco dias conforme protocolo utilizado no laboratório. Avaliação periódica dos animais foi realizada pelos profissionais da Fazenda.

4.5 Ecodoppler

Os animais foram submetidos à ecodoppler vascular (GE LogiqBook XP, transdutor SL10MHz) realizado por angiologista certificado para este procedimento para avaliar a presença de fluxo no enxerto arteriovenoso e de alterações sugestivas de trombose antes do explante. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) Velocidade de pico sistólico (VPS) da artéria carótida.

- b) Velocidade diastólica mínima (VDM) da artéria carótida.

c) Velocidade de pico sistólico (VPS) do enxerto.

d) Velocidade diastólica mínima (VDM) do enxerto.

e) Diâmetro interno do enxerto (distância íntima-íntima do enxerto ou do lúmen interno da prótese).

4.6 Eutanásia e Explante do Enxerto:

O explante foi realizado por cirurgião vascular após 180 dias. A eutanásia dos animais foi realizada no centro cirúrgico do Hospital Veterinário da PUC-PR em São José dos Pinhais, com técnica asséptica, após indução anestésica com Ketamina e manutenção com Halotano. Realizada cervicotomia e dissecação do enxerto (Figura 12). Após heparinização sistêmica, o carneiro recebeu a infusão de cloreto de potássio 19,1%, e posteriormente, o enxerto foi removido. Na peça o explante era composto de: segmento arterial, anastomose arterial, o enxerto propriamente dito, a anastomose venosa e um segmento da veia (Figura 13; Figura 14). Após a eutanásia, os animais foram suturados e enviados para o departamento de anatomia patológica do mesmo hospital para o descarte da carcaça. As peças foram fixadas com formalina 10% para o estudo.



Figura 12: Local do implante de PTFEe, recoberto por tecido celular subcutâneo e cápsula de tecido fibrótico antes do explante

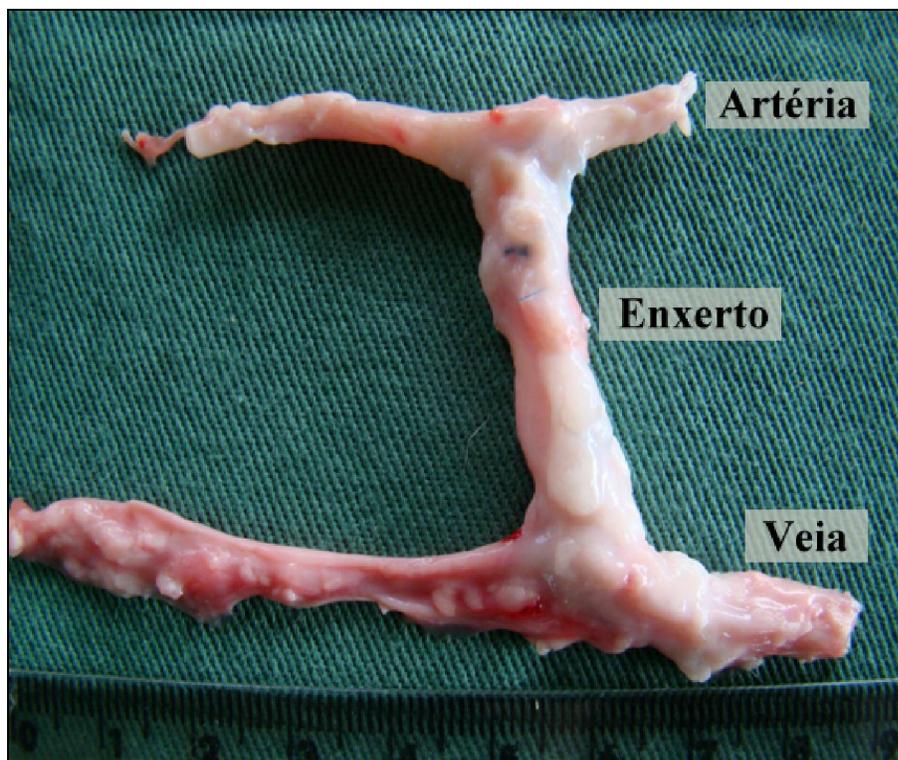


Figura 13: Enxerto arteriovenoso bovino descelularizado

Artéria carótida, enxerto descelularizado ou terço médio e veia jugular interna

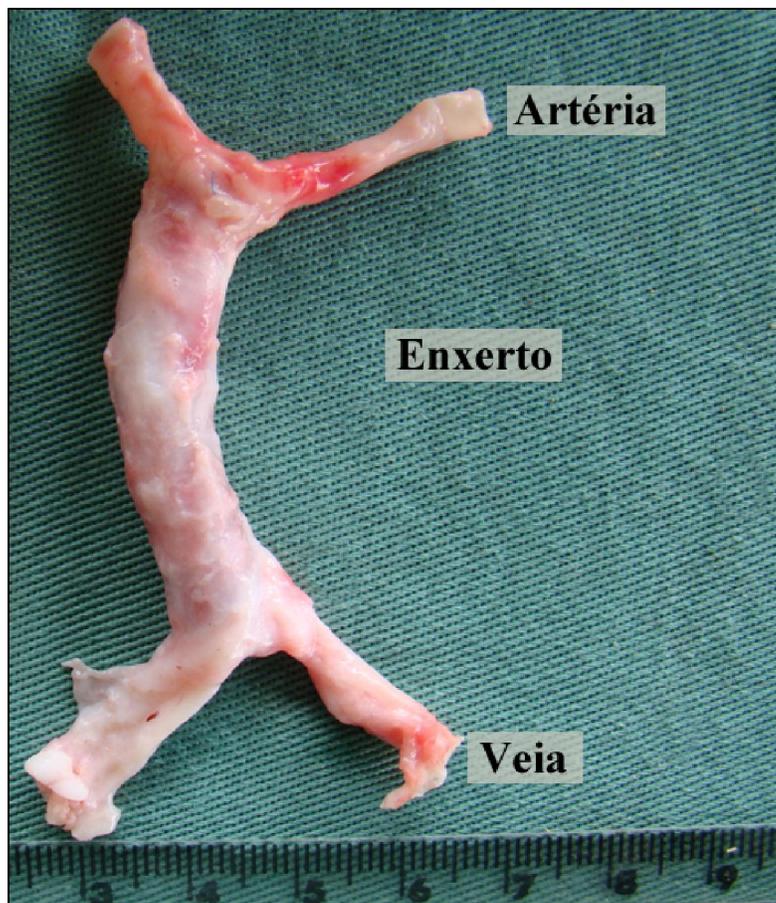


Figura 14: Enxerto PTFEe.

Artéria carótida, prótese de PTFEe (Enxerto) e veia jugular interna

4.7 Análise Macroscópica

Para a caracterização anatômica macroscópica e avaliação da sua integridade as peças foram avaliadas conforme abaixo (Figura 15):

- Integridade: presença de aneurismas e rupturas.
- Presença de trombose.



Figura 15: Macroscopia após secção longitudinal do enxerto. Luz do enxerto evidenciada na seta verde

4.8 Caracterização Histológica

Inicialmente o enxerto foi seccionado em sua porção venosa e arterial. Um corte longitudinal foi realizado em toda a extensão do enxerto. O enxerto foi dividido em três porções através de duas secções transversais que foram realizadas 5,0mm após a anastomose arterial com o enxerto e a 5,0mm da anastomose venosa. Assim se obteve três segmentos do enxerto para análise (Figura 16):

Terço arterial: Artéria nativa e segmento do enxerto proximal à anastomose arterial

Terço médio ou enxerto propriamente dito.

Terço venoso: Veia nativa e segmento do enxerto proximal à anastomose venosa.

Após a secção foram separadas e emblocadas com parafina para análise microscópica. Com o micrótomo Leica RM 2145 os blocos foram cortados seriadamente a 4 µm de espessura. Em seguida foram corados com hematoxilina–eosina (HE) e analisados em seis campos no terço arterial e venoso e em quatro campos no terço médio ao microscópico óptico Olympus BX 51 e microscópio Nikon eclipse E 200 (Figura 16). A análise foi realizada por um patologista quanto ao repovoamento celular, reendotelização, infiltrado inflamatório, neovascularização, hiperplasia neointimal e calcificação. Os diversos campos avaliados tiveram o objetivo de realizar ampla avaliação do enxerto, gerando informações das diferentes regiões como da anastomose arterial, venosa e terço médio do enxerto. A coloração por hematoxilina-eosina (HE) foi utilizada para avaliação histológica do tecido conjuntivo, células, núcleos, citoplasma e delimitação das estruturas dos vasos. As colorações Alizarina red pH 4.2 e pH 7.0 foram utilizadas para análise da presença de calcificação, especificamente pH 4,2 para fosfato de cálcio e pH 7.0 para oxalato de cálcio. A coloração pentacrômico de Russel Movat's foi utilizada para auxiliar na avaliação da arquitetura da matriz extracelular, presença de fibras elásticas e de colágeno.

Imuno-histoquímica foi utilizada para análise da expressão de CD34 nas células dos tecidos dos dois grupos (anticorpo anti-CD34[EP373Y], RabMAbs®;Abcam®) Anticorpo monoclonal de coelho com reação cruzada para ovinos, suínos, humanos e *Loxodonta Africana*. A técnica incluiu desparafinização em xilol (37 ° C), uso de álcool etílico absoluto e álcool etílico 80%. Para o primeiro bloqueio da peroxidase endógena foi utilizado solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5%, seguido de água destilada. A recuperação antigênica

foi realizada utilizando Imuno Retrifer ,Dako®, em banho-maria a 99 ° C durante 40 minutos. As lâminas foram lavadas em solução TBS tris pH 7.3 evitando a secagem do corte. Os anticorpos foram incubados durante a noite nas diluições recomendadas. As lâminas foram lavadas novamente em solução tampão, secas e utilizado solução Advance Ink e Advance enzyme (Dako®). Coloração foi desenvolvida pela adição de cromógeno e substrato DAB para as lâminas, que foram contrastadas com Hematoxilina de Harris. Os controles positivos e negativos foram utilizados para todas as reações[66].

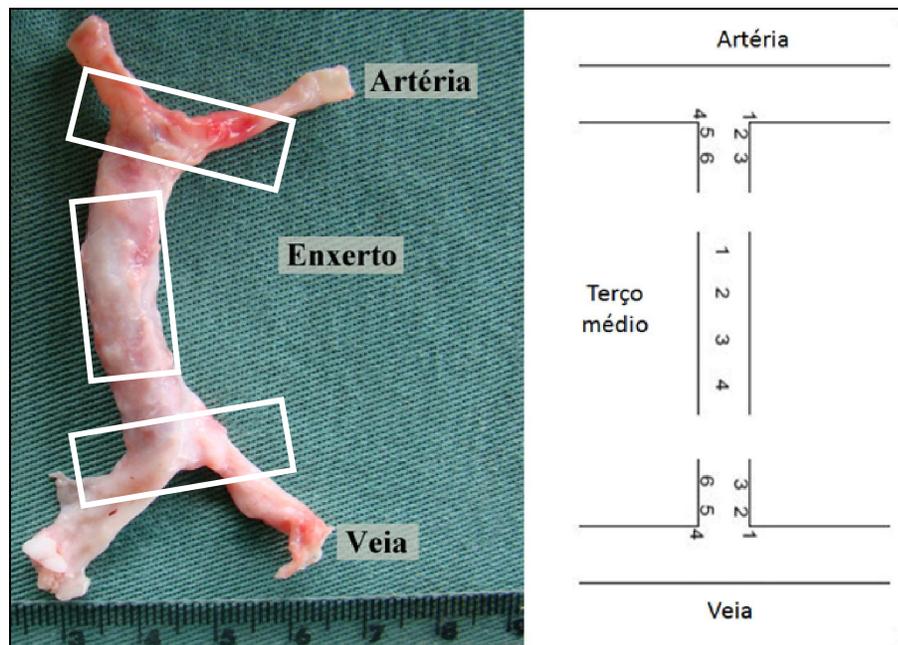


Figura 16: Cortes histológicos realizados nos terços arterial, venoso e médio

Além da análise subjetiva pelo patologista, a avaliação do repovoamento celular, infiltrado inflamatório, neovascularização, reendotelização, calcificação, hiperplasia neointimal e trombose receberam graduação histológica com escalas elaboradas conforme descrição abaixo[32, 44]:

Repovoamento celular e reendotelização

1-Ausente

2-Focal

3-Multifocal

4-Completo

Neovascularização, calcificação, infiltrado inflamatório,

1-Ausente

2-Focal

3-Multifocal

4-Acentuada

Trombose

1-Sim: Presença de trombo

2-Não: Ausência de trombo

Hiperplasia neointimal

1-Ausente (sem hiperplasia neointimal)

2-Discreta +

3-Moderada ++

4- Acentuada +++

4.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos por frequências e percentuais. Para a comparação dos grupos (tratamentos) em relação às variáveis qualitativas dicotômicas foi considerado o teste exato de Fisher. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0. Para cada uma das variáveis, testou-se a hipótese nula de que a distribuição sobre as classificações da variável é igual nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de distribuições diferentes. Em função do pequeno número de casos nos dois grupos, as classificações de cada variável foram agrupadas em apenas duas.

Para cada uma das variáveis do ultrassom (quantitativas), testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Para estas variáveis foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Quatro animais do grupo PTFEe tiveram ausência de fluxo por trombose. Outros dois animais deste mesmo grupo foram excluídos do exame. Do grupo ATIBD um animal foi excluído do exame.

5. RESULTADOS

5.1 Modelo Animal e procedimento cirúrgico

Durante o tempo de seguimento ocorreram três óbitos de animais, sendo um do grupo PTFEe por infecção da prótese confirmada pela presença de secreção purulenta e consequente septicemia. Os outros dois animais pertenciam ao grupo ATIBD, sendo um óbito precoce em consequência a um trauma cervical e outro por quadro de disfunção vesical com evolução para óbito. A ATIBD foi descrita pelo cirurgião como mais maleável e de fácil manipulação durante a cirurgia. Não ocorreram complicações como sangramento ou falta de frêmito do enxerto bovino descelularizado e do PTFEe durante o ato cirúrgico.

5.2 Avaliação por Ecodoppler

Os resultados da análise realizada antes do explante estão demonstrados na Tabela 1. Não houve achado de aneurisma em ambos os enxertos com identificação da veia jugular interna, anastomose e artéria carótida (Figura 17). No grupo ATIBD não foi identificado sinal de trombose. No grupo PTFEe foi identificado ausência de fluxo em quatro animais (Figura 18). Na escala de cinza a parede arterial mostrou duas linhas ecogênicas separadas por uma fina faixa anecóica, identificando assim a camada adventícia, média e íntima do vaso da artéria descelularizada (Figura 19). O diâmetro médio da ATIBD foi de 0,67cm e do PTFEe de 0,44cm com diferença estatisticamente significativa ($p=0,024$). As curvas de velocidade registradas no enxerto indicam um leito de baixa resistência, isto é, de acordo com um exame normal relacionado para análise de uma fístula arteriovenosa (Figura 20). Nas outras análises realizadas, como velocidade de pico sistólico da artéria carótida, velocidade diastólica mínima da artéria carótida, velocidade de pico sistólico do enxerto, velocidade diastólica mínima do enxerto, não ocorreu diferença estatística entre os grupos.

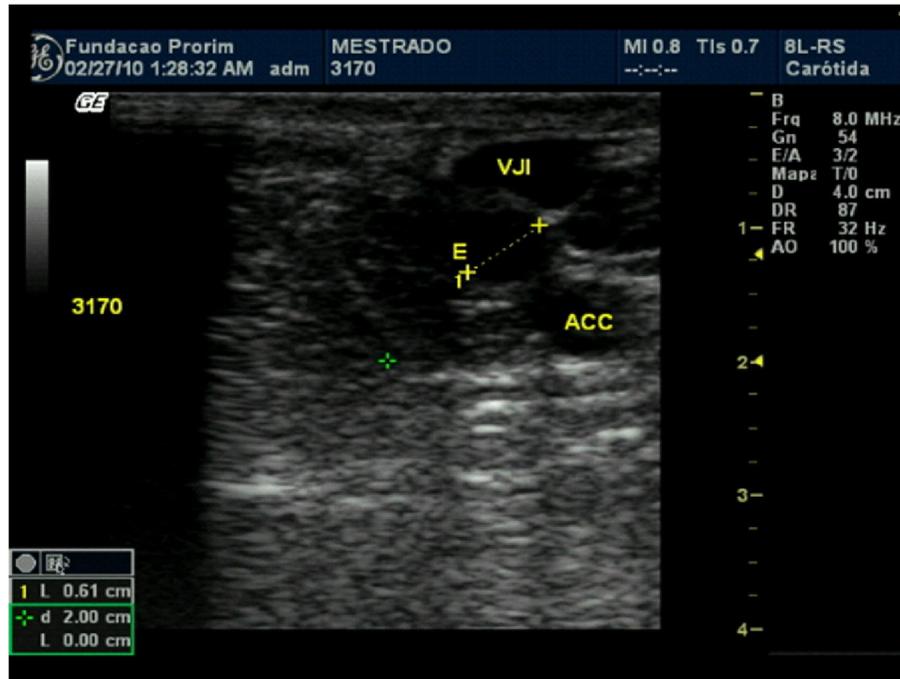


Figura 17: Ultrassonografia do enxerto arteriovenoso demonstrando veia jugular interna (VJI), enxerto descelularizado (E) e artéria carótida (ACC)

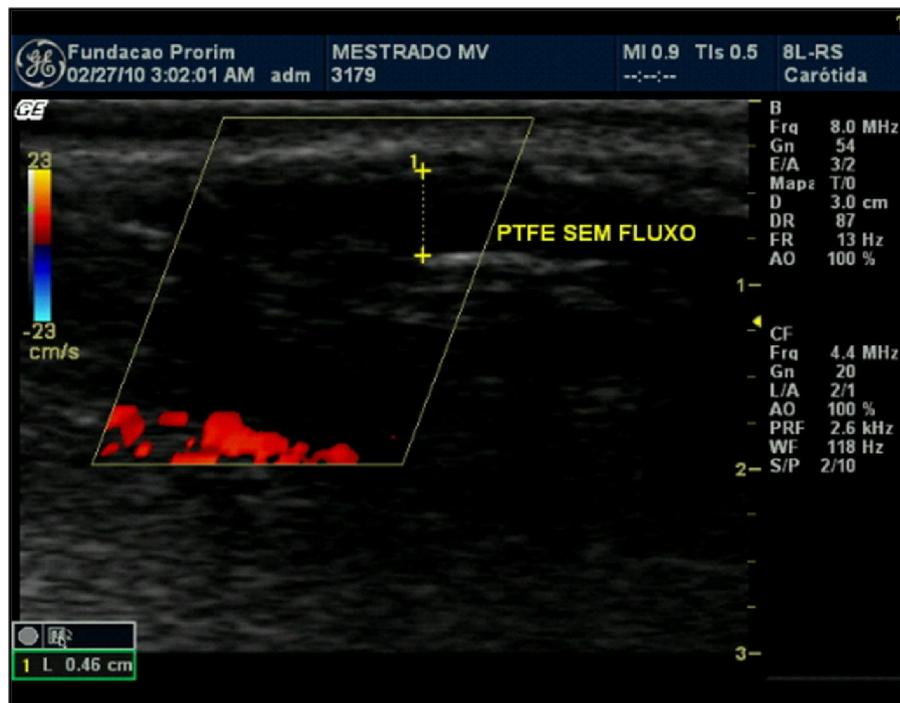


Figura 18: Doppler ultrassonografia com ausência de fluxo no PTFEe



Figura 19: Diâmetro interno da ATIBD (E). Identificação de camada íntima, média e adventícia. ACC- artéria carótida

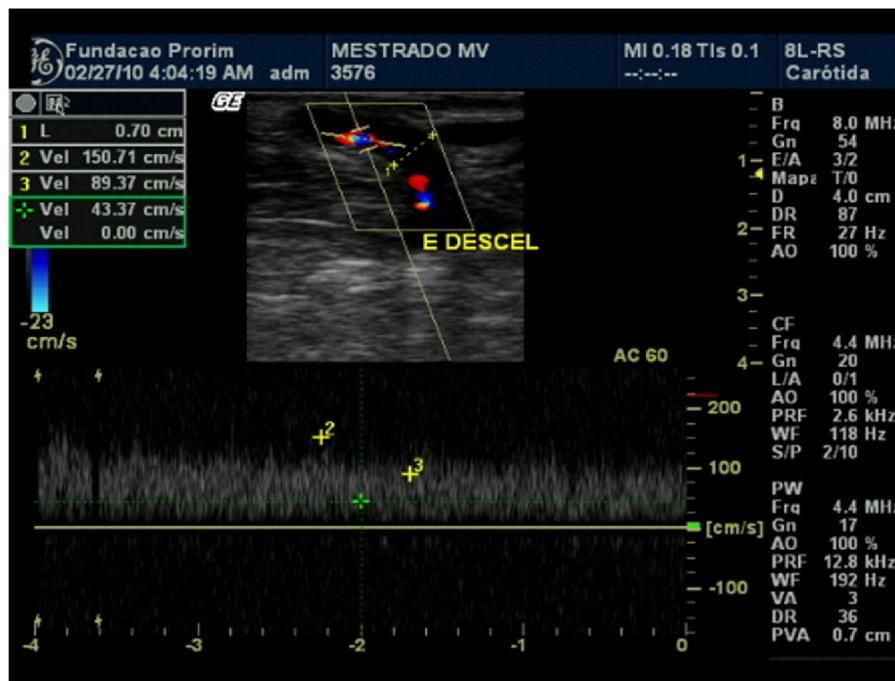


Figura 20: Doppler ultrassonografia com demonstração do enxerto descelularizado, seu diâmetro interno (1), velocidade de pico sistólico (2), velocidade diastólica mínima (3) sem alterações identificadas

Tabela 1: Ecodoppler

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor P*
VPS Carótida	ATIBD	8	100.9	100.6	59.9	161.1	35	0.073
	PTFEe	10	146.2	143.2	115.2	183.2	31.6	
VDF Carótida	ATIBD	8	54	47.2	33.1	94.6	22.7	0.527
	PTFEe	10	68.6	62.5	38.8	110.4	32.7	
VPS enxerto	ATIBD	8	150.9	134.7	73.4	267.5	58.7	0.927
	PTFEe	10	168.9	173.5	64	264.7	100.9	
VDF enxerto	ATIBD	8	79.9	85.1	34.7	138.2	32.9	0.927
	PTFEe	10	94.8	97.6	28.9	155	68	
Diâmetro interno	ATIBD	8	0.67	0.68	0.48	0.89	0.13	0.024
	PTFEe	10	0.44	0.47	0.32	0.5	0.08	

**Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$.*

Obs: Doppler ultrassonografia. Houve diferença quanto ao diâmetro interno do enxerto entre os grupos. VPSC: Velocidade de pico sistólico da artéria carótida; VDMC: velocidade diastólica mínima da artéria carótida; VPSenx: Velocidade de pico sistólico do enxerto; VDMenx: Velocidade diastólica mínima no enxerto.

5.3 Análise Macroscópica

Os enxertos explantados apresentavam-se íntegros, sem sinais de aneurisma e ruptura dos enxertos. Macroscopicamente o grupo ATIBD não apresentou sinais de trombose. No grupo PTFEe, a prótese não apresentava sinais de aneurisma ou ruptura, porém foram identificadas aderências e fibrose em torno da prótese e em cinco animais a presença de trombo (Figura 21).

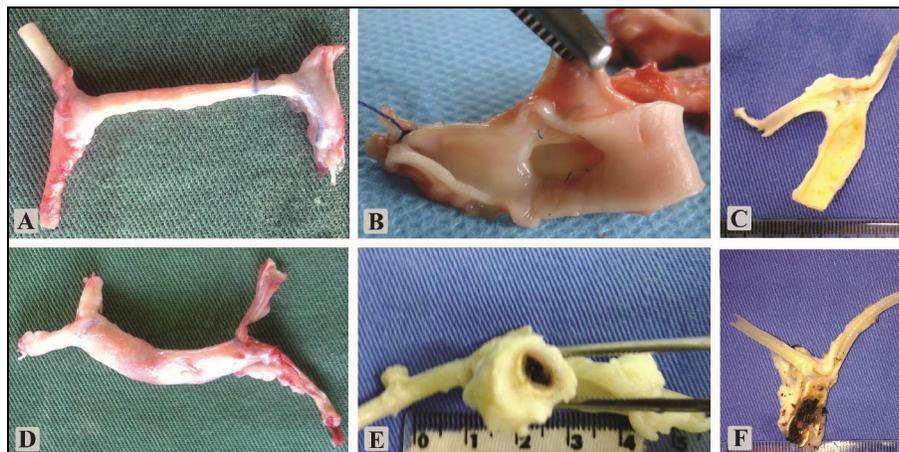


Figura 21: Análise macroscópica: A: ATIBD; B: Enxerto descelularizado. C: Porção interna da ATIBD ; D: PTFEe; E: PTFEe com fibrose em torno da prótese; F: Corte longitudinal da prótese com trombo

5.4 Caracterização Histológica

5.4.1 Quanto ao Repovoamento celular

A artéria torácica interna bovina descelularizada apresentava em sua estrutura as camadas ou túnicas íntima, média e adventícia (Figura 22). A túnica íntima apresentava uma camada de células endoteliais sob uma camada de tecido conjuntivo subendotelial. A camada média era composta por células musculares lisas, fibroblastos e miofibroblastos. Entre as fibras musculares encontrava-se a matriz extracelular composta de fibras elásticas, colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas visualizadas de forma organizada na coloração de Russel Movat. A neoformação da adventícia foi identificada e também a presença de neovascularização em sua extensão. Na ATIBD, o repovoamento celular ocorreu em maior graduação no terço arterial, venoso e médio respectivamente. O crescimento celular foi identificado em maior grau nos campos próximos à adventícia e da camada neointima, com algumas áreas sem celularidade em parte da camada média. Estes achados sugerem que o repovoamento celular do enxerto ocorreu a partir da camada adventícia e do segmento arterial e venoso do animal. A ATIBD apresentou características semelhantes à artéria nativa do receptor, sugerindo um repovoamento celular e substituição parcial das fibras elásticas da artéria bovina pelas do hospedeiro. As fibras elásticas descelularizadas se apresentavam curtas, separadas e desestruturadas. Após seis meses, as fibras elásticas se apresentaram íntegras, uniformes e unidas, demonstrando um remodelamento da matriz extracelular com estrutura do próprio hospedeiro.

A formação de uma camada adventícia e neointima também ocorreu no grupo PTFEe (Figura 23), porém a ausência de camada neointima foi evidenciada em metade dos animais no terço médio. A prótese serviu como arcabouço para neoformação tecidual e migração de células, porém de forma desorganizada quando comparado ao grupo ATIBD. O repovoamento

celular da artéria torácica interna bovina descelularizada e da prótese de PTFEe ocorreu na maioria dos segmentos estudados, sem diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

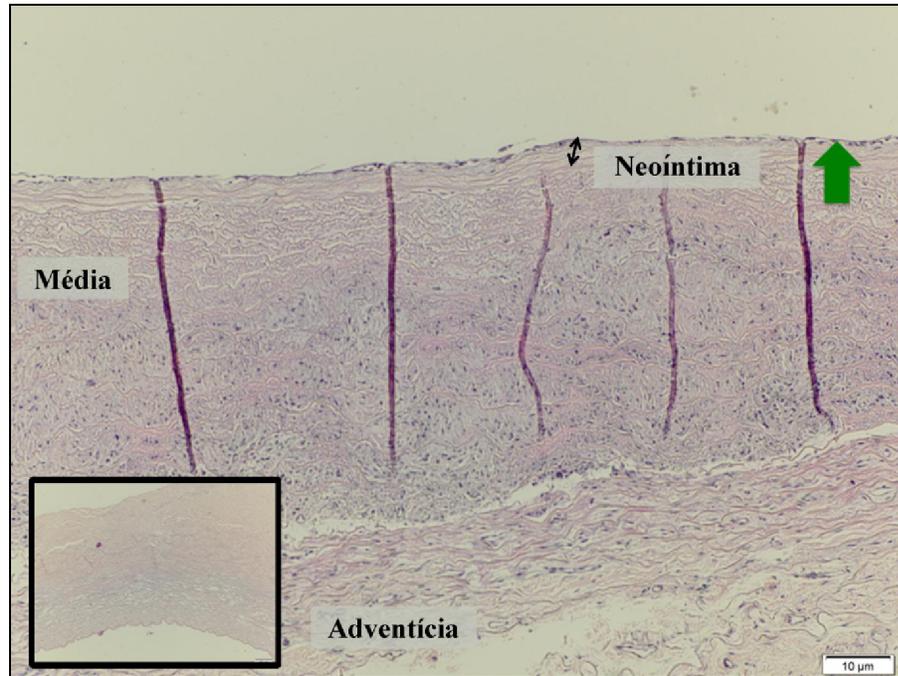


Figura 22: Terço médio da artéria bovina descelularizada. Repovoamento celular completo e organizado da ATIBD. Camada neointimal (seta preta) com células endoteliais sobre todo o tecido subendotelial na luz do vaso (Flecha verde). Camada média com crescimento celular e adventícia neoformada em toda a extensão da artéria. Na imagem inferior esquerda, demonstração da artéria descelularizada. HE 200x

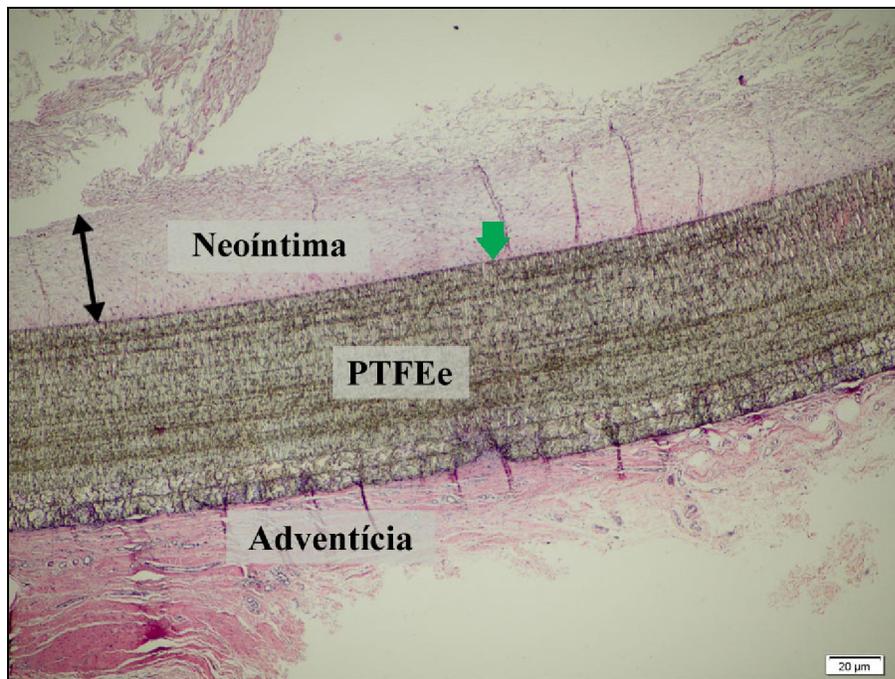


Figura 23: PTFEe demonstrando camada neointimal com sinais de hiperplasia neointimal (seta preta) e ausência de células endoteliais. Camada adventícia rarefeita em toda a extensão da prótese. Seta verde demonstra a luz da prótese. HE 40x

Tabela 2: Repovoamento celular

Classificação	Grupo		Grupo		Valor P
Repopoamento celular	PTFEe terço arterial		ATIBD terço arterial		
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente-focal	1	10	1	12.5	
Multifocal-completo	9	90	7	87.5	
Total	10	100	8	100	P = 1
	PTFEe terço venoso		ATIBD terço venoso		
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente-focal	7	70	4	50	
Multifocal-completo	3	30	4	50	
Total	10	100	8	100	P = 0.631
	PTFEe terço médio		ATIBD terço médio		
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente-focal	7	70	5	62.5	
Multifocal-completo	3	30	3	37.5	
Total	10	100	8	100	P = 1

**Frequência: Número de animais com repovoamento ausente/focal ou multifocal/completo em cada terço do enxerto arteriovenoso estudado*

5.4.2 Quanto à Reendotelização

A reendotelização foi mais completa próximo dos locais da anastomose arterial e venosa nos dois grupos. Os resultados demonstraram um menor grau de reendotelização do terço médio. A análise do terço arterial da ATIBD identificou a presença de endotélio na maioria dos animais analisados, assim como no grupo PTFEe (Figura 24 e Figura 25). A análise subjetiva da reendotelização foi melhor no grupo ATIBD, principalmente no terço médio. No entanto, não ocorreu diferença estatisticamente significativa quando as distribuições ausente e focal foram classificadas em conjunto conforme a Tabela 3. A presença de células progenitoras endoteliais foi confirmada através da análise por imunohistoquímica com células CD34+ na luz da artéria torácica interna e do PTFEe.

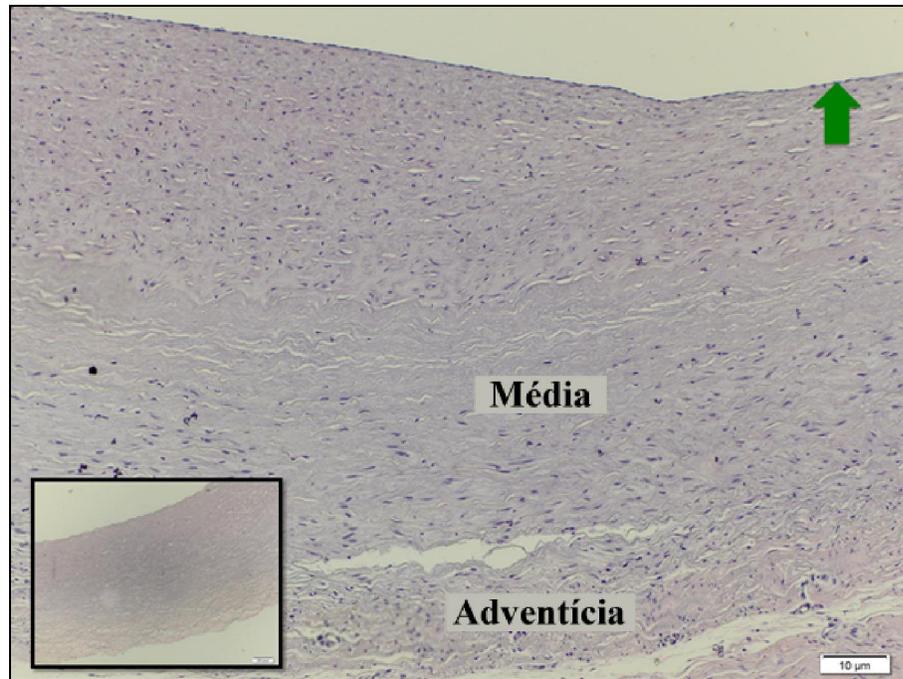


Figura 24: Reendotelização da ATIBD. Notam-se células sedimentadas em toda a extensão da camada neointima. Flecha verde indica a camada íntima completa com células. Centro da camada média apresenta regiões com poucas células, sugerindo que o repovoamento ainda não foi completo. HE 200x

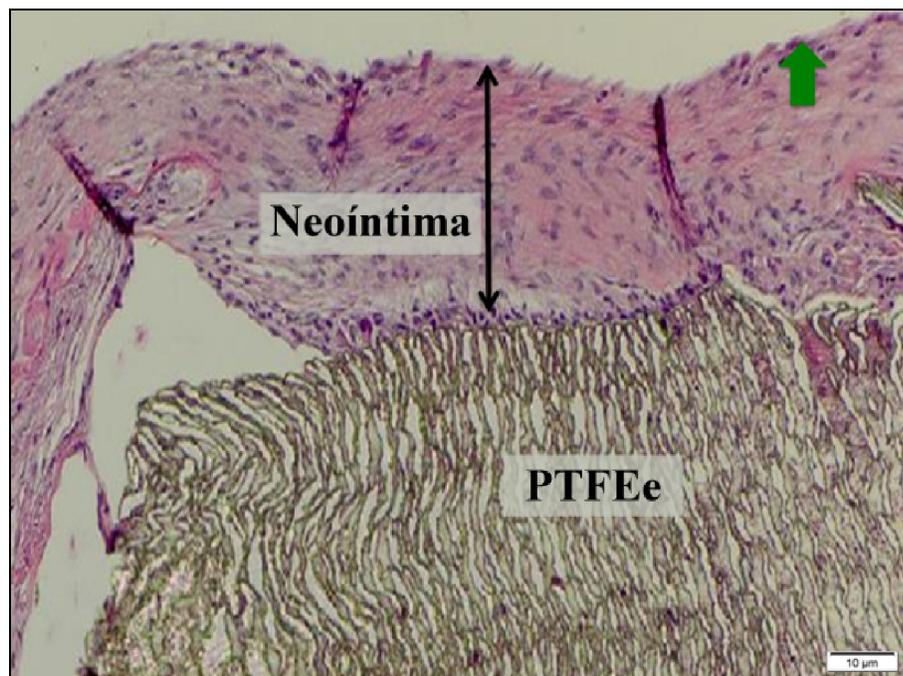


Figura 25: Reendotelização do PTFEe. Flecha verde indica presença multifocal de células endoteliais. HE 200x

Tabela 3: Reendotelização

Classificação	Grupo		Grupo		Valor P
	PTFEe terço arterial		ATIBD terço arterial		
Reendotelização					
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente-focal	4	40	1	12.5	
Multifocal-completo	6	60	7	87.5	
Total	10	100	8	100	P = 0.314
	PTFEe terço venoso		ATIBD terço venoso		
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente-focal	5	50	2	25	
Multifocal-completo	5	50	6	75	
Total	10	100	8	100	P = 0.367
	PTFEe terço médio		ATIBD terço médio		
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente-focal	8	80	6	75	
Multifocal-completo	2	20	2	25	
Total	10	100	8	100	P = 1

*Obs: Exposição da prótese foi um importante achado no grupo PTFEe no terço médio. *Frequência: Número de animais com reendotelização ausente/focal ou multifocal/completo em cada terço do enxerto arteriovenoso estudado*

5.4.3 Quanto à Trombose

Não foi evidenciado trombose na artéria, veia e ou terço médio do grupo ATIBD. No grupo PTFEe foi observado na luz do vaso a presença de trombo caracterizado por fibrina, leucócitos e hemácias em cinco animais (Figura 26). Em um animal do grupo foi identificado trombo no terço arterial e médio. Em dois animais foi evidenciado trombo nos terços arterial, médio e venoso. Em dois, somente trombo no terço venoso foi identificado, resultando em cinco animais acometidos. Nos dois grupos não ocorreu diferença estatisticamente significativa para cada segmento analisado conforme a Tabela 4. Quando comparamos a variável independente do segmento acometido encontramos uma diferença estatisticamente significativa com maior número de trombos no grupo PTFEe.

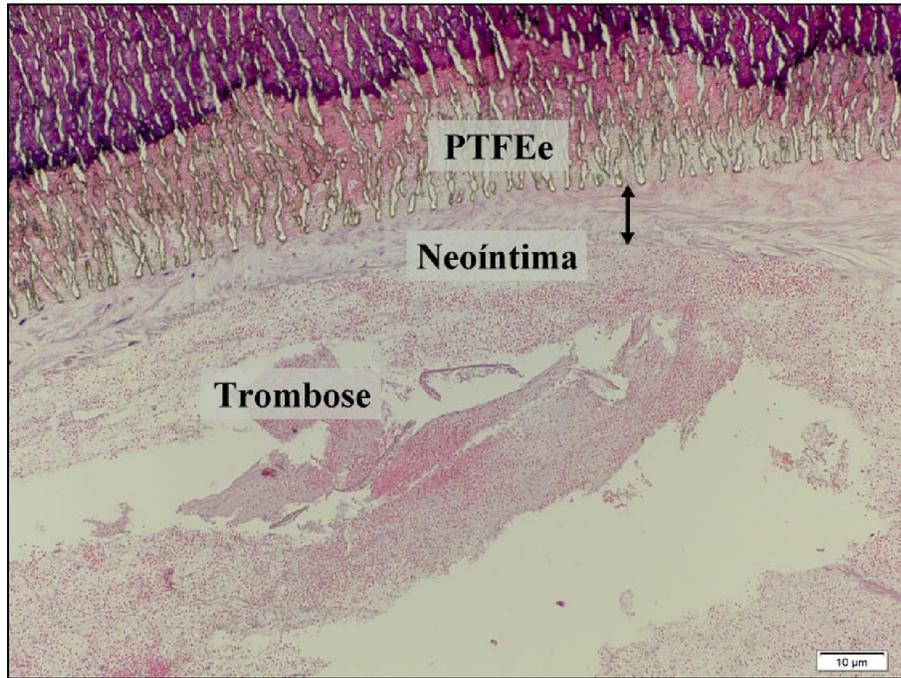


Figura 26: Trombose do enxerto de PTFEe. Flecha indica camada neoíntima. HE 100x

Tabela 4: Trombose

Classificação	Grupo		Grupo		Valor P
Trombose	PTFEe terço arterial		ATIBD terço arterial		
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente	7	70	8	100	
Presente	3	30	0	0	
Total	10	100	8	100	<i>P</i> = 0.216
	PTFEe terço venoso		ATIBD terço venoso		
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente	6	60	8	100	
Presente	4	40	0	0	
Total	10	100	8	100	<i>P</i> = 0.091
	PTFEe terço médio		ATIBD terço médio		
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente	7	70	8	100	
Presente	3	30	0	0	
Total	10	100	8	100	<i>P</i> = 0.216
	PTFEe		ATIBD		
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente (3 terços)	5	50	8	100	
Presente (1 terço)	5	50	0	0	
Total	10	100	8	100	<i>P</i> = 0.036

*Obs. Ausência de trombose no grupo ATIBD em oito enxertos avaliados. Foram identificados trombo em cinco animais com PTFEe. *Frequência: Número de animais com trombo ausente ou presente em cada terço do enxerto arteriovenoso estudado*

5.4.4 Quanto à Neovascularização

A formação de neovasos ocorreu nos dois grupos (Figura 27). A presença de angiogênese nos segmentos, arterial, venoso e médio foi identificada na coloração por hematoxilina – eosina. A formação de neovasos foi maior nos terços arterial e venoso do que no terço médio, tanto na ATIBD quanto no PTFEe e pode se notar maior neovascularização nas regiões próximas à área de anastomose nos terços arterial e venoso. O resultado entre os grupos não identificou diferença estatisticamente significativa conforme a Tabela 5.

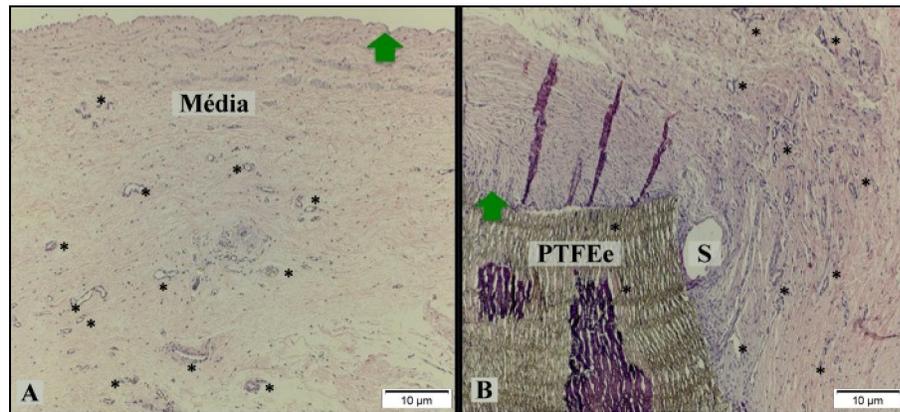


Figura 27: Neovascularização na anastomose da ATIBD (A) e PTFEe (B). Neovasos *: local de sutura(S).
Flecha verde indica a camada íntima. HE 100x

Tabela 5: Neovascularização

Classificação	Grupo		Grupo		Valor P
Neovascularização	PTFEe terço arterial		ATIBD terço arterial		
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente-focal	0	0	0	0	
Multifocal-acentuado	10	100	8	100	
Total	10	100	8	100	<i>P</i> = 1
	PTFEe terço venoso		ATIBD terço venoso		
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente-focal	1	10	1	12.5	
Multifocal-acentuado	9	90	7	87.5	
Total	10	100	8	100	<i>P</i> = 1
	PTFEe terço médio		ATIBD terço médio		
	Frequencia*	Percentagem	Frequencia*	Percentagem	
Ausente-focal	3	30	1	12.5	
Multifocal-acentuado	7	70	7	87.5	
Total	10	100	8	100	<i>P</i> = 0.588

**Frequência: Neovascularização ausente/focal ou multifocal/acentuada em cada terço do enxerto arteriovenoso estudado*

5.4.5 Quanto à Calcificação

Os grupos não apresentaram diferença estatística quanto à calcificação nas colorações estudadas (Tabela 6 e Tabela 7). Houve um predomínio de ausência de calcificação e de depósito focal de cálcio nas amostras analisadas (Figura 28). A análise histológica identificou calcificação focal, porém com maiores depósitos em seis animais do grupo PTFEe e em três animais do grupo ATIDB. Um animal do grupo PTFEe apresentou calcificação ao longo de todo o terço arterial e médio da prótese.

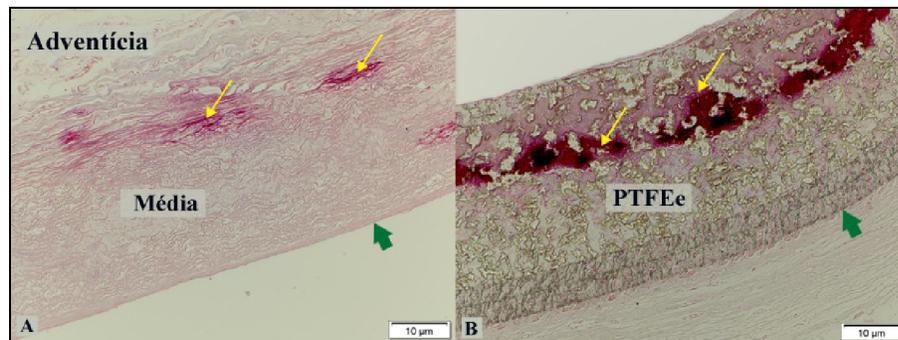


Figura 28: Calcificação focal no enxerto descelularizado, ATIDB (A) e acentuada no PTFEe (B). Setas amarelas indicam calcificação. Flecha verde indica camada íntima. Alizarina red pH 4,2 100x

Tabela 6: Calcificação pH 4,2

Classificação	Grupo		Grupo		Valor P
Calcificação pH 4.2	PTFEe terço arterial		ATIBD terço arterial		<i>P</i> = 0.444
		Frequencia* Percentagem		Frequencia* Percentagem	
	Ausente-focal	10 100	7	87.5	
	Multifocal-acentuado	0 0	1	12.5	
	Total	10 100	8	100	
	PTFEe terço venoso		ATIBD terço venoso		
		Frequencia* Percentagem		Frequencia* Percentagem	
	Ausente-focal	10 100	8	100	
	Multifocal-acentuado	0 0	0	0	
	Total	10 100	8	100	
PTFEe terço médio		ATIBD terço médio		<i>P</i> = 1	
	Frequencia* Percentagem		Frequencia* Percentagem		
Ausente-focal	9 90	8	100		
Multifocal-acentuado	1 10	0	0		
Total	10 100	8	100		

*Obs: Ausência e calcificação focal na maioria dos animais. *Frequência: Número de animais com calcificação ausente/focal ou multifocal/acentuada em cada terço do enxerto arteriovenoso estudado*

Tabela 7: Calcificação pH 7.0

Classificação	Grupo		Grupo		Valor P	
Calcificação pH 7.0	PTFEe terço arterial		ATIBD terço arterial		<i>P</i> = 1	
		Frequência*	Percentagem	Frequência*		Percentagem
	Ausente-focal	9	90	7		87.5
	Multifocal-acentuado	1	10	1		12.5
	Total	10	100	8		100
	PTFEe terço venoso		ATIBD terço venoso			
		Frequência*	Percentagem	Frequência*		Percentagem
	Ausente-focal	10	100	8		100
	Multifocal-acentuado	0	0	0		0
	Total	10	100	8		100
PTFEe terço médio		ATIBD terço médio		<i>P</i> = 1		
	Frequência*	Percentagem	Frequência*		Percentagem	
Ausente-focal	9	90	8		100	
Multifocal-acentuado	1	10	0		0	
Total	10	100	8		100	

*Obs: Ausência e calcificação focal na maioria dos animais. *Frequência: Número de animais com calcificação ausente/focal ou multifocal/acentuada em cada terço do enxerto arteriovenoso estudado*

5.4.6 Quanto ao Infiltrado Inflamatório

O infiltrado inflamatório foi ausente e focal na maioria dos campos analisados, sendo na ATIBD classificado como focal na maioria dos animais. No grupo PTFEe houve predomínio de ausência de infiltrado inflamatório. A análise histológica se caracterizou pela presença de macrófagos, linfócitos e células granulomatosas com células gigantes multinucleadas próximas ao fio de sutura de ambos os enxertos (Figura 29). A análise comparativa não identificou diferença significativa nos três segmentos analisados conforme a Tabela 8.

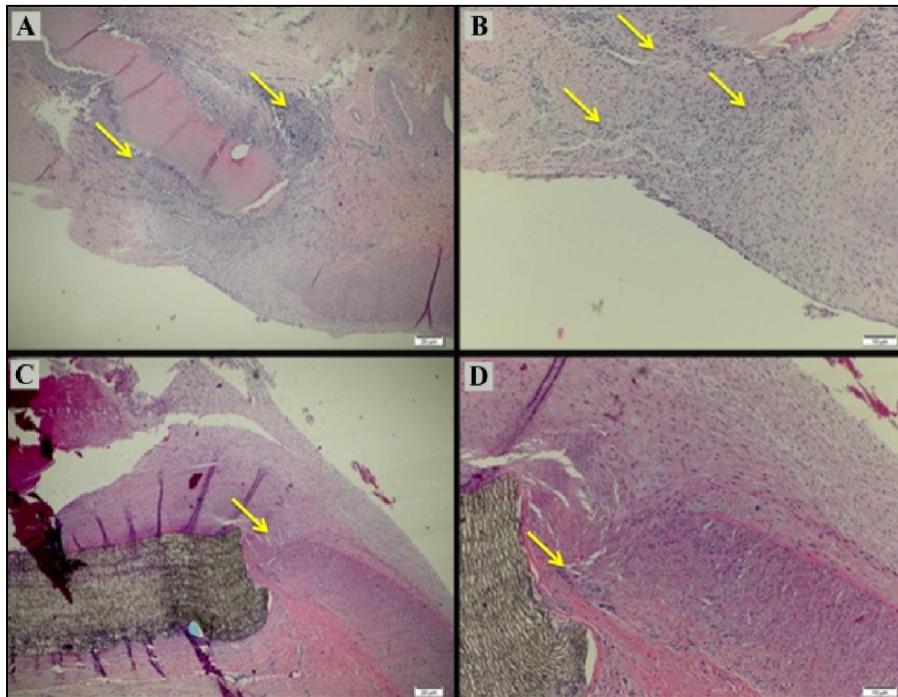


Figura 29: Setas indicam áreas com infiltrado inflamatório. A – ATIBD na região da anastomose arterial com infiltrado inflamatório focal - HE 40x. B – ATIBD na região da anastomose arterial – HE 100x. C – PTFEe na região da anastomose arterial - HE 40x. D – PTFEe na região da anastomose arterial com infiltrado inflamatório focal – HE 100x

Tabela 8: Infiltrado Inflamatório

Classificação	Grupo		Grupo		Valor P	
Infiltrado Inflamatório	PTFEe terço arterial		ATIBD terço arterial		<i>P</i> = 0.444	
		Frequência*	Percentagem	Frequência*		Percentagem
	Ausente-focal	10	100	7		87.5
	Multifocal-acentuado	0	0	1		12.5
	Total	10	100	8		100
	PTFEe terço venoso		ATIBD terço venoso			
		Frequência*	Percentagem	Frequência*		Percentagem
	Ausente-focal	10	100	6		75
	Multifocal-acentuado	0	0	2		25
	Total	10	100	8		100
PTFEe terço médio		ATIBD terço médio		<i>P</i> = 0.183		
	Frequência*	Percentagem	Frequência*		Percentagem	
Ausente-focal	10	100	6		75	
Multifocal-acentuado	0	0	2		25	
Total	10	100	8		100	

*Obs: Infiltrado inflamatório focal ou ausente na maioria dos animais. Não houve diferença estatística entre os grupos. *Frequência: Número de animais com infiltrado inflamatório ausente/focal ou multifocal/acentuado em cada terço do enxerto arteriovenoso estudado*

5.4.7 Quanto à Camada Neointimal

Hiperplasia neointimal foi o achado principal no terço arterial do grupo PTFEe, porém sem diferença quando comparado ao grupo ATIBD, assim como no terço venoso (Figura 30 e Figura 31). O grupo PTFEe apresentou hiperplasia neointimal moderada a acentuada no terço médio. A avaliação do terço médio do grupo ATIBD evidenciou camada neointimal com ausência de hiperplasia e HN leve em todos os animais do grupo. No terço médio não houve diferença estatística entre os grupos conforme a Tabela 9. A ausência de formação de camada neointimal recobrindo a prótese também foi evidenciada no terço médio do grupo PTFEe.

Tabela 9: Hiperplasia Neointimal

Classificação	Grupo		Grupo		Valor P
Hiperplasia neointimal	PTFEe terço arterial		ATIBD terço arterial		<i>P</i> = 1
		Frequência* Percentagem		Frequência* Percentagem	
	Ausente-leve (+)	3 30	3	37.5	
	Moderado ++/HN +++	7 70	5	62.5	
	Total	10 100	8	100	
	PTFEe terço venoso		ATIBD terço venoso		
		Frequência* Percentagem		Frequência* Percentagem	
	Ausente-leve (+)	5 50	3	37.5	
	Moderado ++/HN +++	5 50	5	62.5	
	Total	10 100	8	100	
				<i>P</i> = 0.664	
PTFEe terço médio		ATIBD terço médio		<i>P</i> = 0.216	
	Frequência* Percentagem		Frequência* Percentagem		
Ausente-leve (+)	7 70	8	100		
Moderado ++/HN +++	3 30	0	0		
Total	10 100	8	100		

*Obs: Hiperplasia neointimal. *Frequência: Número de animais com hiperplasia neointimal ausente/leve ou moderado/acentuada-HN em cada terço do enxerto arteriovenoso estudado*

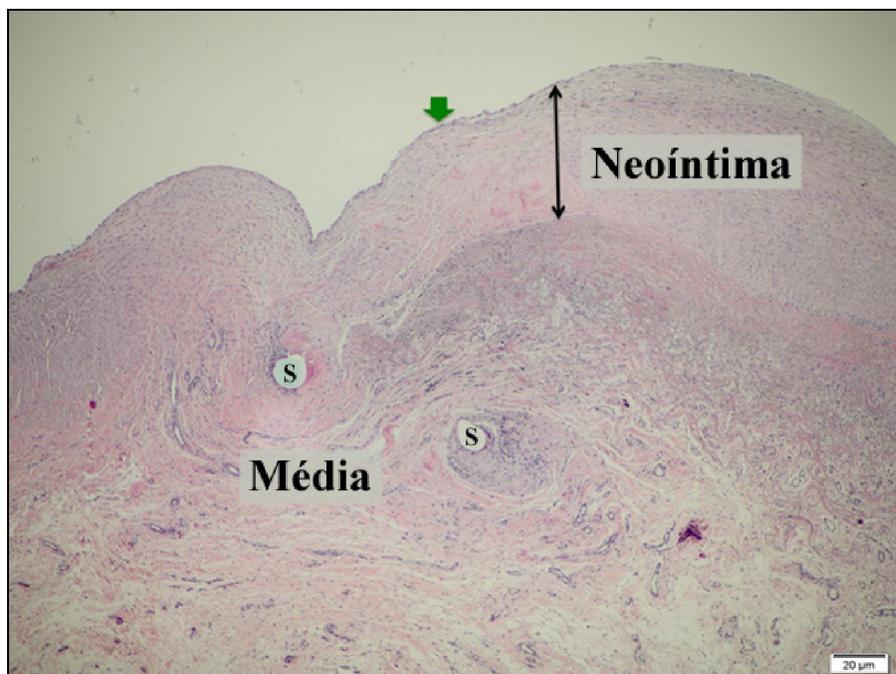


Figura 30: Hiperplasia da camada neointimal na região da anastomose da ATIBD (seta). S – pontos de sutura; Flecha verde indica células endoteliais na camada íntima. HE 40x

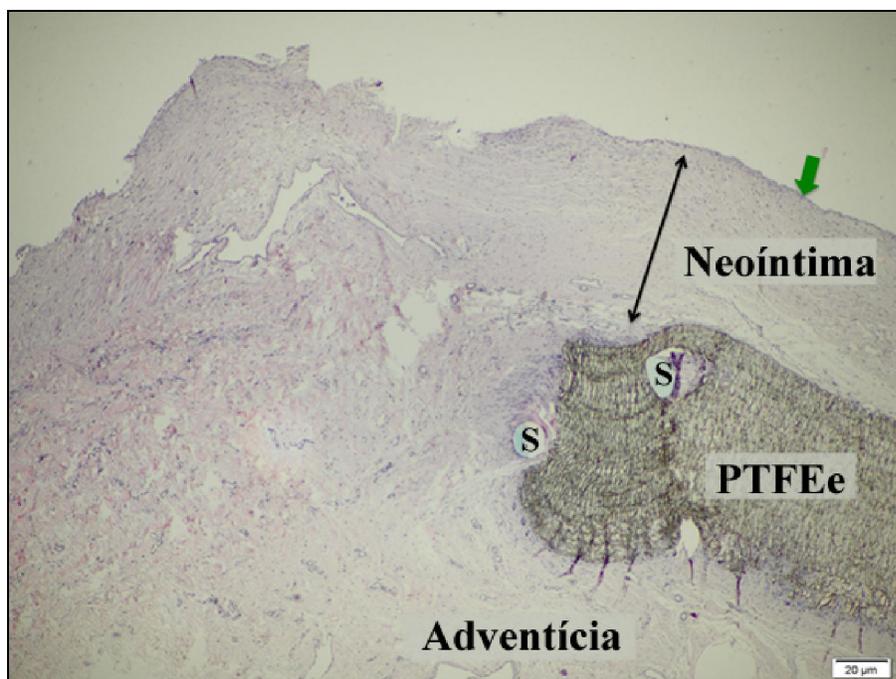


Figura 31: Hiperplasia neointimal em prótese de PTFEe demonstrada na seta. S – pontos de sutura; Flecha verde indica a camada íntima na luz do vaso. HE 40x

5.4.8 Pentacrômico de Russel Movat's

A análise da coloração Pentacrômico de Russel-Movat's demonstrou semelhanças com aquelas encontradas no HE após seis meses do implante (Figura 32 e Figura 33). No enxerto descelularizado pôde ser observado uma estrutura trilaminar organizada, reestruturada com formação de camada adventícia, média e neointima. Na ATIBD, as fibras elásticas, antes desorganizadas, curtas e distantes umas das outras, se mostraram organizadas, próximas e íntegras gerando sustentação ao vaso. A integridade das fibras elásticas, presença de colágeno, glicosaminoglicanos, mucina e fibra muscular na estrutura vascular sugere um processo de substituição do tecido bovino descelularizado pelo do hospedeiro ao longo do tempo. A avaliação identificou hiperplasia neointimal em ambos os grupos e uma estrutura com menor organização da estrutura do PTFEe.

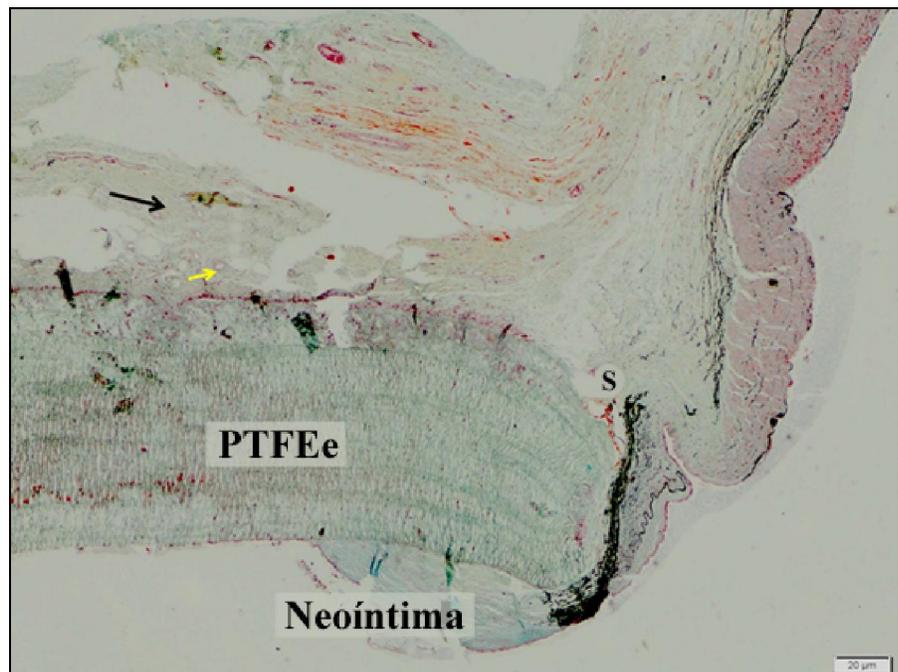


Figura 32: Anastomose no terço arterial demonstrando arquitetura do PTFEe, ausência de fibras elásticas, colágeno (seta em preto) e neovasos (seta amarela) Nota-se a formação de neointima a partir do vaso do receptor na prótese de PTFEe. Ao lado da camada neointima, prótese exposta sem tecido recobrando a luz do PTFEe. S; ponto de sutura. Pentacrômico de Russel- Movat 40x

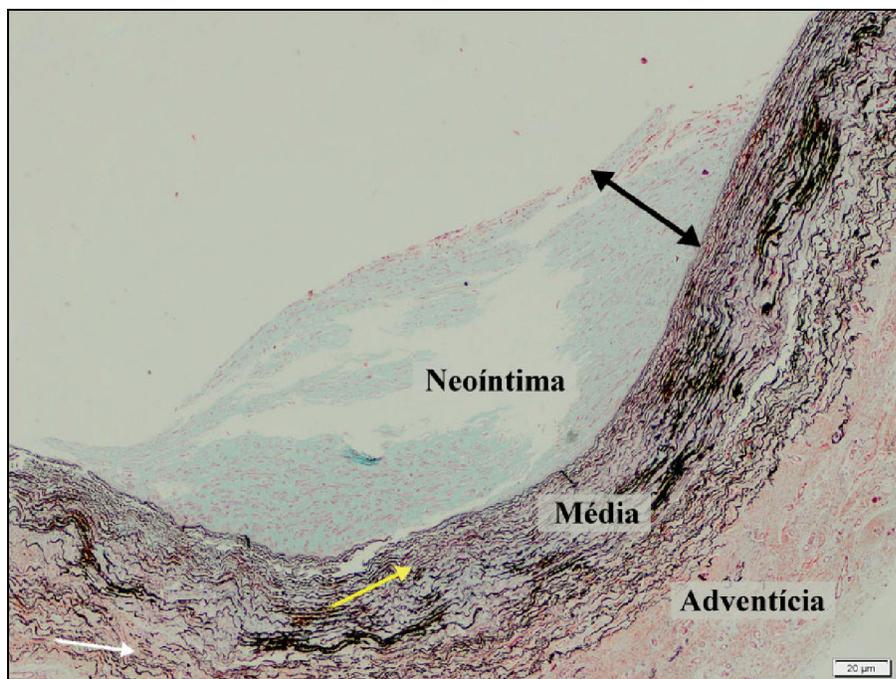


Figura 33: ATIBD com organização das camadas neointima, média e adventícia. Pode ser evidenciada camada neointima composta com substância fundamental, mucina e colágeno (seta em preto). Fibras elásticas do hospedeiro organizadas (seta amarela) e fibras elásticas maceradas, distantes umas das outra em processo de reorganização (seta branca). Pentacrômico de Russel- Movat's 40x

5.4.9 Imuno-histoquímica

Seis casos foram submetidos à reação imuno-histoquímica com anticorpo anti - CD 34. A análise dos animais com PTFEe e ATIBD identificou a marcação por CD34 de células hematopoiéticas primitivas, sugerindo a presença de miofibroblastos, células endoteliais em neovasos na camada neointima, média e adventícia. Em ambos os grupos foram visibilizados uma rede de capilares marcados com células CD34+ delineando a luz capilar (Figura 34 e Figura 35).

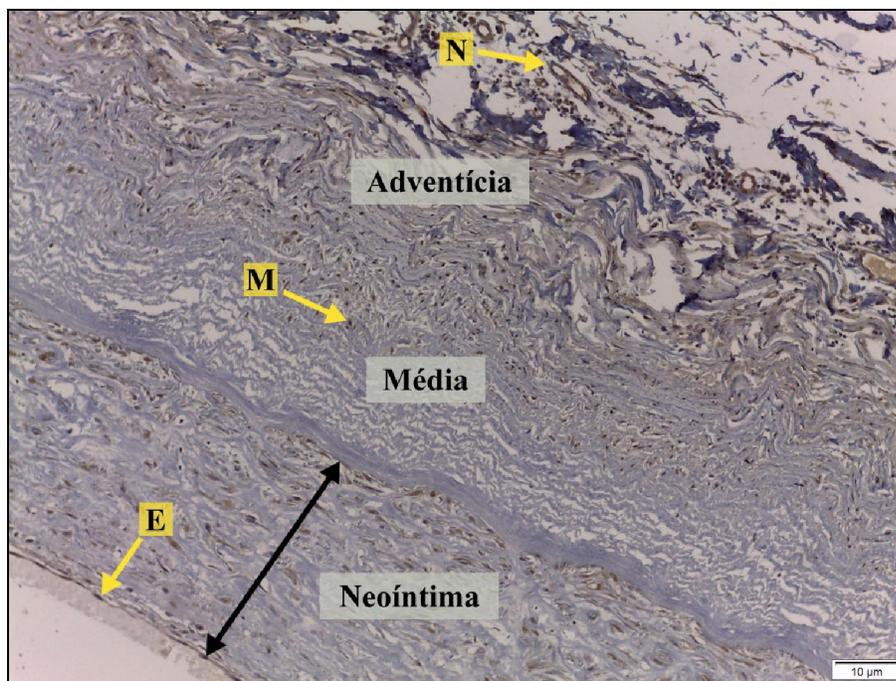


Figura 34: Imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD34. Camadas adventícia, média e íntima (seta preta). Em amarelo é possível identificar a presença de neovaso (N), células sugerindo miofibroblasto (M) e células endoteliais (E) recobrando toda a camada íntima com células CD34+. Na camada média nota-se repovoamento parcial de células e repovoamento da adventícia e da camada neointima. IH 200x

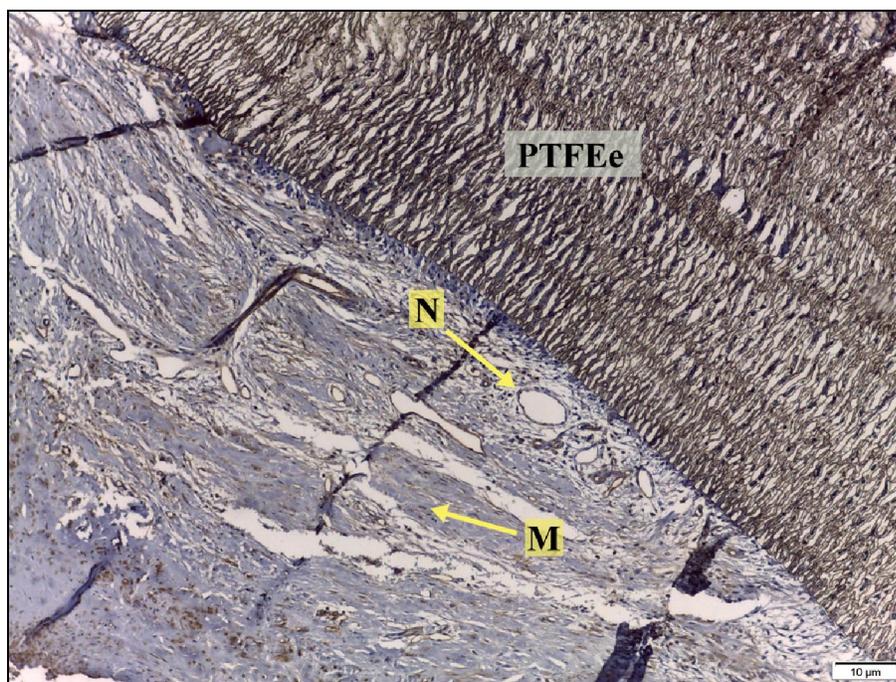


Figura 35: Imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD34 em PTFEe identificando a presença de neovasos (N) e células sugerindo miofibroblasto (M). IH 200x

6. **DISCUSSÃO**

O estudo da artéria torácica interna bovina descelularizada e do PTFEe busca maior compreensão do acesso vascular descelularizado, a análise da sua biocompatibilidade e uma alternativa futura de um acesso vascular para hemodiálise na ausência de um enxerto autólogo. Os enxertos vasculares para hemodiálise devem ser resistentes à degeneração, ter dimensões adequadas, estrutura organizada, índices baixos de infecção, presença de fluxo sanguíneo com capacidade em desempenhar a função desejada sem suscitar efeitos locais ou sistêmicos indesejados para o hospedeiro, gerando a mais apropriada resposta celular ou tecidual em situação específica, podendo assim, ser definidos como biocompatíveis [31].

Os animais apresentaram boa evolução clínica em ambos os grupos. A artéria torácica interna bovina foi preparada para ser semelhante em tamanho e diâmetro ao PTFEe utilizado em pacientes em diálise e se mostrou flexível, com maior facilidade de manuseio durante o procedimento cirúrgico. O uso de prótese de PTFEe com diâmetro de 6 mm é utilizado na prática cirúrgica para confecção de enxertos arteriovenosos para hemodiálise como em anastomose braquiobasilica, axilobraquial ou radiobasilica[67]. Além disso, a artéria bovina (Artegraft®) se mostrou adequada para punção em diálise, sem complicações maiores como pseudoaneurisma após punção. A artéria pode permitir sua punção de forma mais rápida, não necessitando um longo período de maturação do enxerto arteriovenoso como a veia[63].

A técnica de descelularização com posterior repovoamento do tecido autólogo é conhecida e estabelecida para válvulas cardíacas. A proposta em 1998 por Bader *et al* foi a descelularização de enxertos, minimizando a resposta imunológica e viabilizando a utilização de homoenxertos ou heteroenxertos [59]. O'Brien MF (1999) demonstrou com sucesso implante de válvulas descelularizadas em carneiro com posterior repovoamento podendo oferecer maior durabilidade do enxerto [60]. Estudos experimentais com enxerto descelularizado foram realizados com resultados promissores com boa perviedade, e repovoamento do enxerto com células do hospedeiro, sugerindo a possível utilização deste método[15], [58], [60]. Nossa linha de pesquisa utilizou o processo de descelularização com SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,1%, conforme patente Brasileira PI0800603-2 "MÉTODO PARA TORNAR UM TECIDO BIOLÓGICO ACELULAR E RECEPTIVO A NOVAS CELULAS, POUCO IMUNOGÊNICO" realizado no laboratório do Núcleo de Enxertos Cardiovasculares do Laboratório de Engenharia de Tecidos e Cultivo Celular da PUC-PR. O uso do método de descelularização com SDS foi descrito anteriormente e se mostrou um método adequado[32, 68, 69]

O ovino como modelo animal para estudo do acesso vascular e suas disfunções é uma opção. É um modelo em que seu sistema de coagulação é similar ao humano e a anatomia dos vasos carotídeo e jugular permitem o uso de enxertos de diâmetro semelhante ao usado clinicamente no homem para hemodiálise. Este modelo também é adequado para o desenvolvimento de novos enxertos e terapias. O ovino é utilizado para estudo de hiperplasia neointimal e assim a estenose venosa ocorre em um curto espaço de tempo, cerca de oito semanas, o que auxilia no estudo das complicações. Além disso, este modelo animal é aplicado no Núcleo de Enxertos Cardiovasculares do Laboratório de Engenharia de Tecidos e Cultivo Celular da PUC-PR, mantendo a linha de pesquisa do laboratório[32, 64, 70].

A avaliação macroscópica do enxerto não demonstrou alterações de integridade. Veia umbilical humana e veia bovina fixada com glutaraldeído foram testadas e descartadas devido à elevada incidência de aneurismas após o implante. [55],[71]. Estudos com veias criopreservadas (CRY, SYN) foram mais resistentes à infecção, porém com um número maior de aneurismas[57].

Wang *et al* descreveu um repovoamento celular em heteroenxertos progressivo com maior crescimento celular no sexto mês após o implante e formação adequada da estrutura do vaso neste período[43]. Outros estudos também demonstraram a relação do repovoamento celular com o tempo e formação de um tecido com estrutura e propriedades mecânicas semelhantes àquelas antes da descellularização[32, 72]. Apesar de a análise ter caráter descritivo, a análise semiquantitativa do estudo observou um maior repovoamento no terço arterial, venoso e médio respectivamente, sugerindo que o processo tem relação com a proximidade aos vasos nativos do animal e com o fluxo de sangue. Além disso, o crescimento celular também foi progressivo a partir da adventícia, local onde se identificou importante processo de angiogênese.

A matriz extracelular descellularizada, com suas fibras elásticas, fibras musculares e colágeno, proporciona um ambiente para a migração celular com a presença de fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, macrófagos e neovasos migrando para o tecido, assim como observado na literatura quando enxertos descellularizados foram utilizados[32, 60, 69, 73]. O colágeno, por exemplo, promove a aderência e o crescimento de células endoteliais[74]. Glicoproteínas também participam do processo de repovoamento com aderência de fibroblastos e células endoteliais no tecido. Alguns estudos demonstram que a matriz extracelular descellularizada, como submucosa intestinal porcina, uretra e bexiga, é

substituída totalmente ou parcialmente pelo tecido do receptor ao longo do tempo com o progressivo repovoamento e crescimento celular[75].

A reendotelização com células do próprio receptor é um evento importante no estudo do enxerto descelularizado. Células CD34 positivas confirmam a presença de células hematopoiéticas primitivas e endoteliais. Próteses de PTFEe semeadas com anticorpo anti-CD34 demonstram o processo de reendotelização em modelos animais[76]. Células endoteliais primitivas derivadas da medula óssea são subtipos de célula CD34+ com a capacidade de proliferar e se diferenciar em células endoteliais, além de se apresentarem em locais com lesão vascular promovendo a reendotelização. Assim a presença de células CD34+ sugere um processo adequado de angiogênese e reendotelização de enxertos descelularizados.

Estudos da fisiopatologia relacionada à trombose e disfunção do enxerto descrevem a relação da ausência de células endoteliais e lesão endotelial com a formação de um meio pró-trombótico e com conseqüente evolução para estenose e trombose do enxerto. A lesão endotelial por estresse oxidativo, inflamação e alterações secundárias ao fluxo foram descritas e formam um ambiente de reparo tecidual com conseqüente trombose. A ausência de formação da camada neointima e exposição da própria prótese foi um achado importante no grupo PTFEe. A ausência de endotélio estimula a ativação de plaquetas, proliferação de células musculares lisas e secreção de serotonina e tromboxane A2, promotores desta proliferação. Esta proliferação pode evoluir com atividade reparativa e com hiperplasia neointimal. A conseqüência deste processo é a trombose [46-48].

Um importante achado deste estudo foi ausência de trombose no grupo ATIBD. Este achado foi estatisticamente significativo quando comparado ao PTFEe. Cinco animais deste grupo evoluíram com trombose. Kohler e Kirkman descreveram a resposta da lesão endotelial e conseqüente trombose. Segundo os autores, a formação do trombo ocorre através da interface do sangue com o biomaterial. É possível que a melhora desta interface sangue-prótese possa diminuir o índice de trombose[64]. Este é um achado que sugere uma maior biocompatibilidade da ATIBD frente ao PTFEe.

A presença de hiperplasia neointimal ocorreu nos dois grupos estudados. O ovino é um modelo animal utilizado para estudo de hiperplasia neointimal, ocorrendo estenose em um curto espaço de tempo, cerca de oito semanas, sendo assim esperada nos animais estudados[64]. Em ambos os grupos o aumento da espessura da camada neointimal confirmou o diagnóstico de hiperplasia neointimal.

A trombose é causa de 80% das disfunções relacionadas à prótese. A principal patologia que acompanha os pacientes com trombose é a hiperplasia neointimal no local da anastomose, proximal à prótese[39].

Sabe-se que a estenose ocorre principalmente na veia, e agora conhecidamente na artéria, na região das anastomoses com o enxerto, sendo os locais de maior complicação e evolução com hiperplasia[5]. A fisiopatologia envolve um processo inflamatório crônico, estresse oxidativo, angiogênese na íntima e adventícia e consequente lesão endotelial e migração de células musculares lisas e endoteliais, principalmente na região da anastomose[44]. Nosso estudo pode identificar a presença, em diferentes campos, de hiperplasia neointimal, e um maior número de animais com hiperplasia no terço arterial e venoso quando comparado ao terço médio. Além disso, ocorreu uma ausência de formação de camada neointimal com exposição da prótese no grupo PTFEe, característica esta que também contribui para um quadro de trombose. A ausência de reendotelização e de camada neointima em diversos campos do enxerto e de hiperplasia neointimal, sugerem a formação de um meio pró-trombótico no PTFEe. Isto pode estar relacionado com um maior número de trombozes do grupo PTFEe, compatível com a literatura discutida acima[5, 48, 64, 65].

A neovascularização ocorreu nos segmentos, arterial, venoso e médio de ambos os grupos. Este é um processo relevante e necessário para nutrição, repovoamento celular e remodelamento da matriz extracelular viabilizando o enxerto. Alguns autores descreveram a presença de angiogênese em excesso como sendo um dos achados encontrados no processo de estenose do acesso vascular para hemodiálise e de lesão coronariana[5, 77]. Não ocorreu diferença estatisticamente significativa quanto à neovascularização entre os grupos.

A análise histológica se caracterizou pela presença focal de infiltrado linfocitário e quando presente a identificação de macrófagos, células gigantes multinucleadas, principalmente no grupo ATIBD. O infiltrado inflamatório foi ausente ou discreto na maioria dos animais. O enxerto descelularizado é pouco imunogênico causando pequena reação quando implantado[32, 69]. O enxerto é avascular, assim, rejeições hiperagudas não devem acontecer[69]. É acelular, portanto a apresentação de antígenos é mínima para que possam causar sensibilização. Estudos com matriz extracelular descelularizada demonstraram ausência de produção de anticorpos e de resposta imunológica inespecífica como ativação do complemento[78]. Clinicamente a presença de processo inflamatório local com enxertos descelularizados (Stratasis®) está descrita em até 50% de pacientes[79]. A presença de infiltrado inflamatório é esperada no estudo do acesso vascular. O infiltrado inflamatório

presente na adventícia e camada média é descrito no estudo de enxertos descelularizados como um processo agudo, transitório e sem degeneração do enxerto. Este infiltrado parece estar relacionado à quimiotaxia das demais células, portanto, ao processo de repovoamento, crescimento celular e de remodelamento e substituição do enxerto descelularizado pelo do receptor[32, 60, 69]. Ao longo do tempo, as células tendem a ser substituídas por células mais maduras, como histiócitos, fibroblastos e miofibroblastos[32]. A liberação de citocinas e fator de necrose tumoral podem estar relacionados ao recrutamento de macrófagos, célula muscular lisa e fibroblastos[80, 81]. O linfócito T pode ter um fator atenuador na migração de célula muscular lisa[82]. Uma das explicações para este efeito inibitório do linfócito T é a sua capacidade de produzir interferon γ que pode inibir a proliferação de célula muscular lisa e fibroblastos[83]. A atenuação na migração de célula muscular lisa e fibroblasto levanta um questionamento do possível efeito inibidor do processo inflamatório no processo de disfunção do enxerto. Por outro lado, a descrição de células mononucleares, macrófagos, células gigantes presentes na adventícia e média também são descritas no processo de disfunção deste enxerto, do PTFEe e da própria FAV [44, 65]. Um dos fatores limitantes do estudo foi a ausência de estudo imuno-histoquímico para células inflamatórias como CD4 e CD8.

Achados de calcificação discreta são encontrados neste modelo animal e também descritos na placa aterosclerótica e em acessos vasculares com PTFEe[64, 84, 85]. Áreas de calcificação também podem ser encontradas relacionadas ao processo de descelularização incompleto ou algum grau de comprometimento estrutural decorrente do processo de descelularização o que ocorre com métodos inferiores de descelularização como quando se utiliza a enzima tripsina como método descelularizante [32, 68]. No presente estudo a calcificação foi ausente ou focal na maioria dos animais não comprometendo os acessos de ambos os grupos.

Os achados ultrassonográficos evidenciaram ausência de fluxo e presença de trombose em animais com PTFEe, corroborado pelos achados histológicos. Foi identificado um diâmetro maior do enxerto descelularizado quando comparado ao PTFEe, sem ocorrer alterações da estrutura do vaso como aneurismas. Isto pode estar relacionado a um mecanismo de distensibilidade da ATIBD semelhante ao que acontece na FAV. Fatores como perviedade, distensão adequada da veia e da artéria, fluxo arterial e diâmetro da artéria são importantes para determinar o sucesso da FAV[86, 87]. A diferença de elasticidade entre a rígida prótese de PTFEe e a artéria nativa é motivo de discussão e definido como um dos maiores problemas mecânicos da disfunção do PTFEe[88]. Atualmente a principal conduta para reduzir o

problema de distensibilidade do enxerto utilizado é o uso de heteroenxertos[89]. Isto sugere que a distensibilidade discreta do acesso é fator que influencia no sucesso do acesso vascular para hemodiálise, sugerindo uma melhor adaptação da ATIBD como enxerto arteriovenoso.

A análise realizada por somente um patologista, maior dificuldade com a confecção e análise das lâminas do segmento venoso, limitação na pesquisa quanto ao número de animais e ausência de uremia no modelo animal foram fatores limitantes do estudo.

7. CONCLUSÕES

O estudo da artéria torácica interna bovina descelularizada em ovinos demonstrou a presença de fluxo arteriovenoso em todos os animais estudados, maior diâmetro interno do enxerto e ausência de trombose proporcionando como consequência uma resposta tecidual mais apropriada e um melhor desempenho da função desejada, resultado relevante neste modelo animal quando comparado ao PTFEe, tendo assim, maior biocompatibilidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vinhas, J., et al., *Prevalence of chronic kidney disease and associated risk factors, and risk of end-stage renal disease: data from the PREVADIAB study*. *Nephron Clin Pract.* **119**(1): p. c35-40.
2. JR., L., *End-stage renal disease and chronic kidney disease in Brazil*. *Ethn Dis.*, 2009. **19**(Suppl 1): p. S1-7-9.
3. *Censo de Diálise SBN 2011*, 2011, Sociedade Brasileira de Nefrologia: www.sbn.org.br.
4. Roy-Chaudhury, P., V.P. Sukhatme, and A.K. Cheung, *Hemodialysis vascular access dysfunction: a cellular and molecular viewpoint*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(4): p. 1112-27.
5. Lee, T. and P. Roy-Chaudhury, *Advances and new frontiers in the pathophysiology of venous neointimal hyperplasia and dialysis access stenosis*. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2009. **16**(5): p. 329-38.
6. Roy-Chaudhury, P. and T.C. Lee, *Vascular stenosis: biology and interventions*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2007. **16**(6): p. 516-22.
7. Akoh, J.A., *Prosthetic arteriovenous grafts for hemodialysis*. *J Vasc Access*, 2009. **10**(3): p. 137-47.
8. *III. NKF-K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Vascular Access: update 2000*. *Am J Kidney Dis*, 2001. **37**(1 Suppl 1): p. S137-81.
9. Huber, T.S., et al., *Patency of autogenous and polytetrafluoroethylene upper extremity arteriovenous hemodialysis accesses: a systematic review*. *J Vasc Surg*, 2003. **38**(5): p. 1005-11.
10. Fan, P.Y. and S.J. Schwab, *Vascular access: concepts for the 1990s*. *J Am Soc Nephrol*, 1992. **3**(1): p. 1-11.
11. Schild, A.F., et al., *Arteriovenous fistulae vs. arteriovenous grafts: a retrospective review of 1,700 consecutive vascular access cases*. *J Vasc Access*, 2008. **9**(4): p. 231-5.
12. Dahl, S.L., et al., *Readily available tissue-engineered vascular grafts*. *Sci Transl Med.* **3**(68): p. 68ra9.
13. Martin, R.S., 3rd, et al., *Cryopreserved saphenous vein allografts for below-knee lower extremity revascularization*. *Ann Surg*, 1994. **219**(6): p. 664-70; discussion 670-2.
14. Madden, R.L., et al., *A comparison of cryopreserved vein allografts and prosthetic grafts for hemodialysis access*. *Ann Vasc Surg*, 2005. **19**(5): p. 686-91.
15. Madden, R., et al., *Decellularized cadaver vein allografts used for hemodialysis access do not cause allosensitization or preclude kidney transplantation*. *Am J Kidney Dis*, 2002. **40**(6): p. 1240-3.
16. O'Brien, M.F., et al., *The SynerGraft valve: a new acellular (nonglutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation*. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 1999. **11**(4 Suppl 1): p. 194-200.
17. Goncalves, A.C., et al., *Decellularization of bovine pericardium for tissue-engineering by targeted removal of xenoantigens*. *J Heart Valve Dis*, 2005. **14**(2): p. 212-7.

18. Rieder, E., et al., *Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **127**(2): p. 399-405.
19. Liao, J., E.M. Joyce, and M.S. Sacks, *Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet*. Biomaterials, 2008. **29**(8): p. 1065-74.
20. Schenke-Layland, K., et al., *Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves*. J Struct Biol, 2003. **143**(3): p. 201-8.
21. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials, 2006. **27**(19): p. 3675-83.
22. Donaruma, L.G., *Definitions in biomaterials*, D. F. Williams, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1987, 72 pp. Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters, 1988. **26**(9): p. 414-414.
23. Riella, M.C., *Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólitos*. Quarta edição ed2003, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
24. Blagg, C.R., *The 50th anniversary of long-term hemodialysis: University of Washington Hospital, March 9th, 1960*. J Nephrol. **24 Suppl 17**: p. S84-8.
25. Brescia MJ, C.J., Appel K, Hurwich BJ., *Chronic hemodialysis using venipuncture and a surgically created arteriovenous fistula*. New England Journal of Medicine, 1966(275(20)): p. 1089-92.
26. Group, V.A.W., *Clinical practice guidelines for vascular access*. Am J Kidney Dis, 2006. **48** (Suppl 1): p. pp. S248–S273.
27. Smith, G.E., R. Gohil, and I. Chetter, *Factors affecting the patency of arteriovenous fistulas for dialysis access*. J Vasc Surg.
28. Linardi F LF, B.J.e.a., *Acesso vascular para hemodiálise: Avaliação do tipo e local anatômico em 23 unidades de diálise distribuídas em sete estados brasileiros*. . Rev Col Bras Cir. , 2003. **30**(3): p. 183-93.
29. Sreenarasimhaiah, V. and P. Ravani, *Arteriovenous fistula surgery: an American perspective from Italy*. Semin Dial, 2005. **18**(6): p. 542-9.
30. Bing, J., *The tissue reaction to implanted plastics*. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl, 1955. **105**: p. 16-26.
31. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials, 2008. **29**(20): p. 2941-53.
32. Navarro, F.B., et al., *Evaluation of the biological behavior of decellularized pulmonary homografts: an experimental sheep model*. Rev Bras Cir Cardiovasc. **25**(3): p. 377-87.
33. Badylak, S.F., et al., *Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog*. J Surg Res, 1989. **47**(1): p. 74-80.
34. Badylak, S.F., *The extracellular matrix as a biologic scaffold material*. Biomaterials, 2007. **28**(25): p. 3587-93.

35. Hodde, J.P., et al., *Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement*. Tissue Eng, 1996. **2**(3): p. 209-17.
36. Kherlakian, G.M., et al., *Comparison of autogenous fistula versus expanded polytetrafluoroethylene graft fistula for angioaccess in hemodialysis*. Am J Surg, 1986. **152**(2): p. 238-43.
37. Perera, G.B., et al., *Superiority of autogenous arteriovenous hemodialysis access: maintenance of function with fewer secondary interventions*. Ann Vasc Surg, 2004. **18**(1): p. 66-73.
38. Li, L., et al., *Cellular and morphological changes during neointimal hyperplasia development in a porcine arteriovenous graft model*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(11): p. 3139-46.
39. Beathard, G.A., *The treatment of vascular access graft dysfunction: a nephrologist's view and experience*. Adv Ren Replace Ther, 1994. **1**(2): p. 131-47.
40. Windus, D.W., *Permanent vascular access: a nephrologist's view*. Am J Kidney Dis, 1993. **21**(5): p. 457-71.
41. Sakariassen, K.S., P.A. Bolhuis, and J.J. Sixma, *Platelet adherence to subendothelium of human arteries in pulsatile and steady flow*. Thromb Res, 1980. **19**(4-5): p. 547-59.
42. Terry, C.M., et al., *Evaluation of histological techniques for quantifying haemodialysis arteriovenous (AV) graft hyperplasia*. Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(11): p. 3172-9.
43. Wang, X.N., et al., *Implantation of decellularized small-caliber vascular xenografts with and without surface heparin treatment*. Artif Organs, 2007. **31**(2): p. 99-104.
44. Roy-Chaudhury, P., et al., *Venous neointimal hyperplasia in polytetrafluoroethylene dialysis grafts*. Kidney Int, 2001. **59**(6): p. 2325-34.
45. Roy-Chaudhury P, W.J.M.M.e.a., *Neointimal hyperplasia and hemodialysis access dysfunction: A pathogenetic role for cytokines, matrix proteins and specific cell types*. Vascular Access for Hemodialysis VI 1999: p. 45-53.
46. Gibbons, G.H. and V.J. Dzau, *The emerging concept of vascular remodeling*. N Engl J Med, 1994. **330**(20): p. 1431-8.
47. Ross, R., et al., *A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(4): p. 1207-10.
48. Choudhury, D., *Vascular access thrombosis prophylaxis*. Semin Dial, 2006. **19**(4): p. 335-42.
49. Peck, M.K., et al., *New biological solutions for hemodialysis access*. J Vasc Access. **12**(3): p. 185-92.
50. Hodges, T.C., et al., *Longitudinal comparison of dialysis access methods: risk factors for failure*. J Vasc Surg, 1997. **26**(6): p. 1009-19.
51. Chinitz, J.L., et al., *Self-sealing prosthesis for arteriovenous fistula in man*. Trans Am Soc Artif Intern Organs, 1972. **18**(0): p. 452-7.
52. Hurt, A.V., et al., *Bovine carotid artery heterografts versus polytetrafluoroethylene grafts. A prospective, randomized study*. Am J Surg, 1983. **146**(6): p. 844-7.

53. Wusteman, M.C., D.E. Pegg, and R.M. Warwick, *The banking of arterial allografts in the United Kingdom. A technical and clinical review.* Cell Tissue Bank, 2000. **1**(4): p. 295-301.
54. Heintjes, R.J., et al., *The results of denatured homologous vein grafts as conduits for secondary haemodialysis access surgery.* Eur J Vasc Endovasc Surg, 1995. **9**(1): p. 58-63.
55. Rosenberg, N., et al., *The modified bovine arterial graft.* Arch Surg, 1976. **111**(3): p. 222-6.
56. Matsuura, J.H., et al., *Cryopreserved femoral vein grafts for difficult hemodialysis access.* Ann Vasc Surg, 2000. **14**(1): p. 50-5.
57. Madden, R.L., et al., *Experience with cryopreserved cadaveric femoral vein allografts used for hemodialysis access.* Ann Vasc Surg, 2004. **18**(4): p. 453-8.
58. Hawkins, J.A., et al., *Immunogenicity of decellularized cryopreserved allografts in pediatric cardiac surgery: comparison with standard cryopreserved allografts.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **126**(1): p. 247-52; discussion 252-3.
59. Bader, A., et al., *Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves.* Eur J Cardiothorac Surg, 1998. **14**(3): p. 279-84.
60. Elkins, R.C., et al., *Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling.* Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2001. **13**(4 Suppl 1): p. 87-92.
61. Matsuura, J.H., et al., *Cellular remodeling of depopulated bovine ureter used as an arteriovenous graft in the canine model.* J Am Coll Surg, 2004. **198**(5): p. 778-83.
62. Darby, C.R., et al., *Depopulated bovine ureteric xenograft for complex haemodialysis vascular access.* Eur J Vasc Endovasc Surg, 2006. **31**(2): p. 181-6.
63. Kennealey, P.T., et al., *A prospective, randomized comparison of bovine carotid artery and expanded polytetrafluoroethylene for permanent hemodialysis vascular access.* J Vasc Surg. **53**(6): p. 1640-8.
64. Kohler, T.R. and T.R. Kirkman, *Dialysis access failure: A sheep model of rapid stenosis.* J Vasc Surg, 1999. **30**(4): p. 744-51.
65. Kelly, B.S., et al., *Aggressive venous neointimal hyperplasia in a pig model of arteriovenous graft stenosis.* Kidney Int, 2002. **62**(6): p. 2272-80.
66. Baurakiades, E., et al., *Histomorphometric and immunohistochemical analysis of infectious agents, T-cell subpopulations and inflammatory adhesion molecules in placentas from HIV-seropositive pregnant women.* Diagn Pathol. **6**: p. 101.
67. Barbato, H.A., et al., *Tunelizador metálico rígido na confecção de fístulas arteriovenosas dos membros superiores.* Jornal Vascular Brasileiro, 2011. **10**: p. 154-159.
68. Dohmen, P.M., et al., *Results of a decellularized porcine heart valve implanted into the juvenile sheep model.* Heart Surg Forum, 2005. **8**(2): p. E100-4; discussion E104.
69. Lopes, S.A., et al., *Decellularized heterografts versus cryopreserved homografts: experimental study in sheep model.* Rev Bras Cir Cardiovasc, 2009. **24**(1): p. 15-22.

70. Tillman, P., S.N. Carson, and L. Talken, *Platelet function and coagulation parameters in sheep during experimental vascular surgery*. Lab Anim Sci, 1981. **31**(3): p. 263-7.
71. Dale, W.A. and M.R. Lewis, *Further experiences with bovine arterial grafts*. Surgery, 1976. **80**(6): p. 711-21.
72. Gui, L., et al., *Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(9): p. 2665-76.
73. Zhang, Y., et al., *Coculture of bladder urothelial and smooth muscle cells on small intestinal submucosa: potential applications for tissue engineering technology*. J Urol, 2000. **164**(3 Pt 2): p. 928-34; discussion 934-5.
74. Herbst, T.J., et al., *Differential effects of laminin, intact type IV collagen, and specific domains of type IV collagen on endothelial cell adhesion and migration*. J Cell Biol, 1988. **106**(4): p. 1365-73.
75. Santucci, R.A. and T.D. Barber, *Resorbable extracellular matrix grafts in urologic reconstruction*. Int Braz J Urol, 2005. **31**(3): p. 192-203.
76. Rotmans, J.I., et al., *In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts*. Circulation, 2005. **112**(1): p. 12-8.
77. Staab, M.E., et al., *Enhanced angiogenesis and unfavorable remodeling in injured porcine coronary artery lesions: effects of local basic fibroblast growth factor delivery*. Angiology, 1997. **48**(9): p. 753-60.
78. Allman, A.J., et al., *Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response*. Transplantation, 2001. **71**(11): p. 1631-40.
79. Ho, K.L., M.N. Witte, and E.T. Bird, *8-ply small intestinal submucosa tension-free sling: spectrum of postoperative inflammation*. J Urol, 2004. **171**(1): p. 268-71.
80. Jovinge, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha activates smooth muscle cell migration in culture and is expressed in the balloon-injured rat aorta*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(3): p. 490-7.
81. Postlethwaite, A.E. and J.M. Seyer, *Stimulation of fibroblast chemotaxis by human recombinant tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and a synthetic TNF-alpha 31-68 peptide*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1749-56.
82. Hansson, G.K., et al., *T lymphocytes inhibit the vascular response to injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10530-4.
83. Duncan, M.R. and B. Berman, *Gamma interferon is the lymphokine and beta interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation*. J Exp Med, 1985. **162**(2): p. 516-27.
84. Eggleton, S.P., et al., *Heterotopic ossification of an expanded polytetrafluoroethylene vascular graft*. Br J Surg, 1986. **73**(2): p. 159-60.
85. Janssens de Varebeke, B. and G. Van Osselaer, *Late occlusion of a polytetrafluoroethylene femoropopliteal graft due to implant calcification and heterotopic ossification*. Acta Chir Belg, 1994. **94**(5): p. 288-90.
86. Malovrh, M., *Native arteriovenous fistula: preoperative evaluation*. Am J Kidney Dis, 2002. **39**(6): p. 1218-25.

87. Parmar, J., M. Aslam, and N. Standfield, *Pre-operative radial arterial diameter predicts early failure of arteriovenous fistula (AVF) for haemodialysis*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2007. **33**(1): p. 113-5.
88. Jorgensen, C.S. and W.P. Paaske, *Physical and mechanical properties of ePTFE stretch vascular grafts determined by time-resolved scanning acoustic microscopy*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1998. **15**(5): p. 416-22.
89. Li, L., et al., *Neointimal hyperplasia associated with synthetic hemodialysis grafts*. Kidney Int, 2008. **74**(10): p. 1247-61.

9. ANEXOS

ANEXO A - Carta de seleção de resumo para apresentação no Congresso Americano de Nefrologia 2013:

Dear Dr. Marcos Vieira:

On behalf of the American Society of Nephrology (ASN), thank you for submitting an abstract for the ASN Kidney Week 2013 Annual Meeting, November 7-10 in Atlanta, GA. We are pleased to inform you that your abstract **842 “Biocompatibility of Decellularized Bovine Artery and Expanded Polytetrafluorethylene Arteriovenous Grafts in a Sheep Model”** has been selected by ASN’s Program Committee for poster presentation.

Sincerely,

Bruce A. Molitoris, MD,
FASN
President

Anupam Agarwal, MD, FASN
Program Committee Chair

ANEXO B - Artigo enviado para Revista Kidney International

Kidney International



Biocompatibility of decellularized bovine artery and expanded polytetrafluoroethylene arteriovenous grafts in a sheep model

Journal:	<i>Kidney International</i>
Manuscript ID:	KI-07-13-1106
Manuscript Type:	Basic Research
Date Submitted by the Author:	26-Jul-2013
Complete List of Authors:	Vieira, Marcos; Catholic University of Parana, Curitiba, Brazil, Medicine; Fundação Pró-Rim, Nephrology Bochi, Galvane; Catholic University of Parana, Curitiba, Brazil, Medicine Curitiba, Parana, Brazil, Medicine Vieira, Eduardo; Catholic University of Parana, Curitiba, Brazil, Medicine Roderjan, Joao; Catholic University of Parana, Curitiba, Brazil, Medicine da Costa, Francisco; Catholic University of Parana, Curitiba, Brazil, Medicine Curitiba, Parana, Brazil, Medicine Riella, Miquel; Catholic University of Parana, Curitiba, Brazil, Medicine
Keywords:	arteriovenous graft, hemodialysis biocompatibility, hemodialysis access, chronic kidney disease, vascular access
Subject Area:	Dialysis

SCHOLARONE™
Manuscripts

Only

10. APÊNDICE



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro do projeto no CEUA: 368

Data do parecer: 04/08/2008

Título do Projeto:

Estudo comparativo das alterações anatomopatológicas entre a artéria bovina descelularizada com PTFE e como enxerto artério-venoso em ovino

Pesquisador responsável:

Marcos Alexandre Vieira

Equipe da pesquisa:

Miguel Carlos Riella, Francisco Diniz Affonso

Instituição:

PUCPR

Categoria do Experimento - C

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
<i>Ovis aries</i>	Indet.	4 a 6 meses, 15 a 25 kg	32

O colegiado do CEUA em reunião no dia 31/07/2008, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

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

Curitiba, 04 de Agosto de 2008.

Atenciosamente


Profa. Graça Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora do CEUA
PUC PR

