

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, tem-se demonstrado que a incapacidade das próteses valvulares em reconstituir um tecido cardíaco viável parece ser o principal fator determinante da trombogenicidade, da inflamação e da limitação da durabilidade tardia, as quais têm sido apontadas, pelo menos em parte, como o resultado de uma reação imunogênica ao tecido xenogênico mediada pela ação citotóxica do glutaraldeído.¹

Diante deste cenário, a preservação da estrutura e da função natural dos tecidos ganhou notoriedade tornando-se um dos maiores objetivos na pesquisa e no desenvolvimento dos novos substitutos valvares².

Estudos anteriores demonstram que a extração celular e a remoção de detritos celulares de dentro dos componentes valvares reduzem, substancialmente, a antigenicidade prescindindo da fixação com glutaraldeído (GA)^{3,4}. Verificou-se, também, que a manutenção da integridade da matriz pode ser assegurada pela possibilidade de re-endotelização por células do hospedeiro^{5,6,7,8}.

Na literatura, não há relatos de endotelização espontânea completa dos folhetos valvulares após o seu implante com a utilização dos métodos usuais de preservação tecidual.

O presente estudo tem como objetivo testar o potencial para re-endotelização *in vivo* das próteses valvulares porcinas montadas em suporte e tratadas por um novo processo não-aldeídico de preservação tecidual, comparando-as quanto ao desempenho hemodinâmico e o aspecto histológico com as biopróteses de preservação pelo glutaraldeído.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Desde o final da década de sessenta, as válvulas biológicas vêm sendo implantadas com resultados satisfatórios a curto e médio prazos^{9,10}. Entretanto, a baixa durabilidade tardia constitui o maior problema funcional das biopróteses por se tratarem de estruturas desvitalizadas e incapazes de regenerar-se¹¹.

Já está bem demonstrado que, a longo prazo, as biopróteses sofrem um processo degenerativo principalmente por calcificação secundária ao processo de fixação do tecido valvar^{12,13}. Estes métodos de fixação tecidual são utilizados para mascarar os xeno-antígenos e tornar a matriz do tecido conjuntivo resistente à degradação; entretanto, como consequência, os tecidos tornam-se desvitalizados seja pela presença de resíduos químicos citotóxicos ou pela resistência da matriz à migração celular^{14,15}.

Nas últimas décadas, foram propostas várias modificações na preservação e estabilização dos tecidos valvares heterólogos^{16,17}.

O Cialit (sal organo-mercurial) foi o primeiro agente de preservação valvar a ser utilizado. Entretanto, a série clínica original de

BINET et al. mostrou resultados inaceitáveis com apenas 10% das próteses normofuncionantes no seguimento de quatro anos, indicando ação deletéria deste agente sobre os componentes do colágeno do enxerto¹⁸.

A durabilidade limitada com esta série inicial motivou a pesquisa de outros agentes para preservação e esterilização tecidual capazes de melhorar a credibilidade dos xenoenxertos valvares. Em 1966, O'BRIEN et al.¹⁹ na Austrália, iniciou uma série clínica com 23 substituições valvares aórticas por biopróteses porcinas preservadas com ácido formaldeídico tamponado a 4%. Este método mostrou-se eficaz em reduzir a antigenicidade, porém as próteses tratadas por este método tiveram durabilidade muito limitada com 38% dos pacientes apresentando disfunção protética no seguimento de 3 anos. Em 1971 no Brasil, PUIG et al.^{20,21}, iniciaram uma série clínica com 272 substituições valvares com próteses de duramáter preservadas com glicerol a 98%. Apesar da melhora no rendimento hemodinâmico e na durabilidade com apenas 18% da disfunção protética em seis anos; estudos subseqüentes demonstraram que o glicerol, embora seja um excelente estabilizador, não esteriliza os tecidos^{22,23}. A degeneração do colágeno foi também um achado comum após 23 meses do implante destas próteses²⁴.

O glutaraldeído, quimicamente conhecido como 1,5-pentano dialdeído, foi empregado pela primeira vez na prática clínica em 1968 na França por CARPENTIER et al.²⁵ para a preservação de biopróteses porcinas. Os resultados, com esta série inicial, mostraram-se bastantes satisfatórios com apenas 7% de disfunção protética em seis anos. A

introdução do uso do glutaraldeído em baixa concentração (0,5%) para a preservação tecidual desencadeou uma nova era no campo das próteses biológicas permitindo que outros tecidos, como por exemplo o pericárdio, pudessem ser preservados pelo mesmo método com resultados consistentes a médio e longo prazos, onde destacam-se o estudo pioneiro de IONESCU et al.^{26,27,28} na Inglaterra e os estudos de BRAILE et al.^{29,30} e POMERANTZEFF et al.³¹ no Brasil, cuja a incidência linearizada de disfunção protética nestes últimos foi menor que 1%/paciente/ano em 11 e 15 anos respectivamente.

Até o presente, o glutaraldeído permanece como o agente de preservação mais amplamente utilizado no preparo dos tecidos bioprotéticos devido à sua alta solubilidade aquosa em pH fisiológico e ao seu custo relativamente baixo³². A sua ação se faz através de ligações cruzadas com as proteínas do tecido valvar diminuindo a antigenicidade e estabilizando-o contra a degradação proteolítica após o seu implante^{33,34}.

Por outro lado, o glutaraldeído residual presente no tecido valvar preservado é citotóxico e impede que o mesmo seja repopularizado por células do hospedeiro, tornando-o vulnerável à insudação por proteínas e sais a qual é precursora do processo de calcificação, que é uma das mais importantes causas de disfunção primária das próteses valvulares^{35,36,37,38,39,40,41,42}.

O glutaraldeído também reduz o relaxamento e aumenta a dureza dos folhetos levando a um funcionamento mecânico anormal das

próteses valvulares resultando em danos teciduais localizados que predisõem à trombogenicidade^{43,44}.

Atualmente, acredita-se que o desenvolvimento de uma camada de células endoteliais autógenas teria ação protetora contra estes danos teciduais assegurando-lhes maior resistência e durabilidade^{45,46,47}. Entretanto, o crescimento endotelial somente é possível se os folhetos valvulares forem processados utilizando-se um método atóxico de preservação tecidual; uma vez que os aldeídos mantêm-se tóxicos às células endoteliais em concentrações tão baixas quanto três partes por milhão, impedindo que as válvulas biológicas assim preservadas adquiram revestimento endotelial^{48,49}.

Estudos recentes, com métodos alternativos de preservação não-aldeídica, têm demonstrado que a recelularização da superfície e da matriz do colágeno com células endoteliais do hospedeiro pode conferir potencial para regeneração e crescimento do tecido valvar transformando-o numa estrutura viva^{50,51}. Dentre as alternativas, destaca-se a decelularização, a qual pode ser enzimática ou pelo uso de detergentes ou ainda pela foto-oxidação seguida da semeadura endotelial *in vitro* com células do receptor^{3,4,5,52,53,54,55}. Este método também apresenta limitações como: a necessidade de intervenção para a obtenção das células endoteliais, crescimento celular em meio de cultura, pouca adesividade das células ao colágeno subjacente, e baixa resistência do novo endotélio às forças do fluxo^{56,57}.

A endotelização *in vivo* das próteses cardíacas tem sido proposta como a alternativa definitiva para a preservação da estrutura e função naturais dos tecidos. Por este método a matriz se tornaria cito-compatível espontaneamente, mantendo inalteradas as propriedades físicas dos folhetos^{58,59,60,61}.

Assim, a endotelização espontânea dos folhetos valvulares; a qual prescinde das manobras complexas da re-endotelização *in vitro*, apresenta-se como uma nova fronteira a ser explorada na busca do substituto valvar ideal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção da amostra

Foram selecionados 14 ovinos de raça Santa Inês (*Ovis aries*), sendo todos machos castrados, com idade entre 4 e 6 meses (média = 5,2m) confirmada pelo tempo de erupção dental e pelas mudanças na tábua dental, e com peso entre 30 e 35kg (média = 32kg).

Os animais permaneceram sob quarentena durante 15 dias, e ao seu término foram submetidos a um exame clínico geral por um médico-veterinário, e uma vez considerados clinicamente sadios foram liberados para a intervenção cirúrgica.

Todos os animais receberam um número de identificação individual e uma ficha clínica contendo todos os cuidados recebidos durante a permanência dos mesmos no estudo.

3.1.1 Preparo das Próteses

3.1.1.1 Prótese não-aldeídica

As valvas porcinas foram obtidas de um abatedouro aprovado pelo Ministério da Agricultura e pelo Serviço de Inspeção Federal. E, após a limpeza e a sua individualização com a exclusão dos folhetos musculares, foram montadas com três folhetos idênticos em suporte de acetalcopolímero (Plásticos GM, Belo Horizonte, Brasil). Este suporte foi revestido por tecido tubular de poliéster Fabric (Bard, New Jersey, EUA), ao qual foi incorporado um anel de sutura de elastômero (Nusil Silicone Technology, Carpenteria, EUA).

Completada a montagem, as próteses receberam o tratamento de preservação pelo processo L-Hydro™ (Philogenesis Inc., Monrovia, EUA)⁶², o qual consistiu em três etapas distintas descritas abaixo em linhas gerais (patente pendente):

1ª Etapa: extração dos antígenos porcinos e mascaramento dos antígenos remanescentes sob oxidação química controlada pelo uso do ácido polietilenoglicol;

2ª Etapa: incorporação ao tecido valvar de um agente antiinflamatório não-esteróide (equivalente à

aspirina) e de um agente antitrombótico (equivalente à heparina);

3ª Etapa: esterilização de tecido em fase aquosa de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Concluído o processo de preservação, as próteses foram estocadas em solução de etanol a 50% até a sua utilização (Figura 1).



FIGURA 1 – Prótese porcina não-aldeídica. A – Face atrial, B – Face ventricular

3.1.1.2 Prótese aldeídica

As valvas porcinas utilizadas na preparação das biopróteses Labcor® foram obtidas em frigoríficos autorizados pelo Serviço de Inspeção Federal imediatamente após o abate dos animais com idade entre 30 e 60 meses.

As valvas foram dissecadas e imersas em solução salina tamponada como pH mantido em 7,4. Os folhetos musculares foram excluídos e substituídos por folhetos livres. Após a fixação e esterilização com pressão zero em solução de glutaraldeído a 0,4% e etanol a 20%, três folhetos idênticos foram montados em anel flexível de Celcon™ (acetalcopolímero) revestido com Dacron™ (poliéster Fabric macio). Cada prótese foi submetida individualmente a testes hidrodinâmicos e à inspeção sob luz polarizada para confirmar a sua integridade estrutural. As próteses foram mantidas em quarentena até a confirmação da sua esterilidade pelos testes microbiológicos; em seguida, foram embaladas com solução de formaldeído a 4% em recipiente plástico selado, estéril, apirogênico, contendo etiqueta com as especificações do fabricante.

3.1.2. Preparo dos animais de experimentação

Os animais permaneceram em jejum de sólidos por 24 horas e de líquidos nas seis horas que antecederam a cirurgia, quando foi administrado 1,0 g de cefalotina intramuscular (IM).

Quinze minutos antes da indução anestésica, foi administrado 1mg de sulfato de atropina IM.

A indução anestésica foi realizada através da administração endovenosa (EV) de 12,5 mg.Kg⁻¹ de tiopental sódico.

A veia jugular externa esquerda foi cateterizada e conectada à uma torneira de 3 vias para a administração de drogas e soluções eletrolíticas. Neste momento foram administrados 250mg de metilprednisolona e 1g de cefalotina EV.

A seguir, o animal foi intubado e uma sonda orogástrica foi inserida através da qual foram administrados 150ml de solução de hidróxido de alumínio. A ventilação mecânica foi estabelecida com volume de 12ml de $O_2 \cdot Kg^{-1}$ e na frequência de 12 ciclos por minuto. Em seguida, o registro contínuo do traçado eletrocardiográfico e da temperatura retal foram obtidos utilizando-se um monitor multiparamétrico (Bese, Belo Horizonte, Brasil).

A anestesia foi mantida pela administração de halotano a 1,5% por via inalatória e de 100mg de cloreto de suxametônio EV.

Todos os experimentos deste estudo foram realizados no Centro de Pesquisas da Labcor Laboratórios (Belo Horizonte, Brasil), mediante a aprovação da Comissão Científica do Instituto do Coração e de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e seguindo-se as normas da American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care⁶³.

No anexo A, encontram-se os dados de identificação dos animais incluindo data de nascimento, idade, peso e categoria (teste ou controle).

3.1.3. Implantes em animais

3.1.3.1. Técnica operatória

Com o animal posicionado em decúbito lateral direito, e após a antissepsia e colocação de campos estéreis, realizou-se uma toracotomia lateral esquerda no quarto espaço intercostal. A seguir, o pulmão esquerdo foi afastado com afastador maleável sobre uma compressa úmida expondo o saco pericárdico, o qual foi incisado longitudinalmente em direção ao ápice do coração.

Neste momento, o animal recebeu heparina sódica na dose de 350 UI.kg⁻¹ EV, e foi administrada uma dose adicional de 125mg de metilprednisolona EV.

Após três minutos da administração da heparina, introduziu-se, na aorta descendente, uma cânula DLP 16Fr (DLP, Grand Rapids, EUA) com a ponta orientada cranialmente, e no átrio direito uma cânula única de dois estágios DLP 30Fr.

Em seguida, a circulação extracorpórea foi estabelecida utilizando-se um oxigenador de membranas adulto (Vitae, DMG Equipamentos Médicos Ltda, Rio de Janeiro, Brasil), cujo volume do perfusato foi de 1500ml de Ringer Lactato (Fresenius, Campinas, Brasil). O fluxo arterial foi mantido entre 50 e 70 ml/kg/min, e o fluxo de gás em

0,5l/min da mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂, os quais foram ajustados no transcorrer do procedimento de acordo com os valores da gasometria.

A temperatura corpórea foi reduzida para 34°C, e induzida a parada cardíaca anóxica por fibrilação ventricular mediante o contato do epicárdio com uma bateria de 9 volts (Duracell, São Paulo, Brasil). O ventrículo esquerdo foi drenado por meio de uma cânula DLP 12Fr inserida no ápice do coração.

Em seguida, foi realizada uma atriotomia longitudinal esquerda para exposição da valva mitral nativa, a qual foi excisada junto ao anel, sendo suas cordas seccionadas dos respectivos músculos papilares.

As biopróteses foram implantadas em posição anatômica utilizando-se 12 pontos em “U” de fio poliéster trançado 2-0 (Polysut[®], Biosut Ltda., Belo Horizonte, Brasil). Após a passagem do último ponto, iniciou-se o reaquecimento do animal e a atriorrafia esquerda com fio polipropileno 4-0 (Ethicon[®], São José dos Campos, Brasil) (Figura 2).

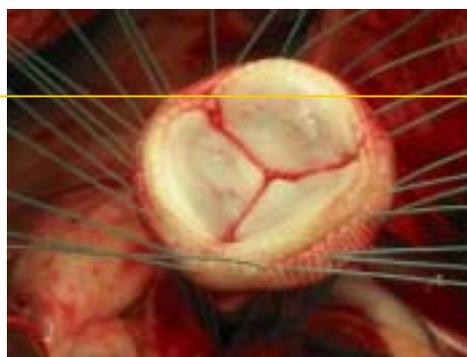
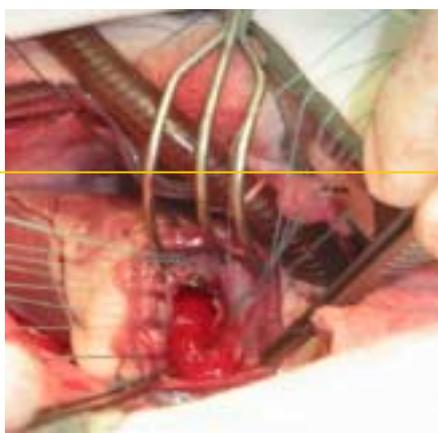


FIGURA 2 – Implante da prótese em posição mitral

Após a retirada do ar das câmaras cardíacas esquerdas e o restabelecimento dos batimentos cardíacos, a circulação extracorpórea foi descontinuada e as cânulas do átrio direito e da aorta foram retiradas. Prosseguiu-se com a administração de sulfato de protamina EV na dose de 10mg para cada 1000 UI de heparina administradas.

Um dreno torácico foi inserido no 6º espaço intercostal e deixado em aspiração contínua.

A parede torácica foi suturada por planos com fio monofilamentar 3-0 inabsorvível.

Os animais tiveram a cânula traqueal e o dreno torácico retirados ainda na sala cirúrgica, e em seguida foram transferidos para sala de recuperação pós-operatória.

Foram excluídos do estudo quatro animais que tiveram óbito perioperatório, sendo considerados como falha técnica do procedimento cirúrgico. A amostra com os 10 animais sobreviventes ficou assim distribuída:

- 1) Grupo Teste: composto por 7 animais implantados com a bioprótese porcina não-aldeídica (L-Hydro™).

2) Grupo Controle: composto por 3 animais implantados com a bioprótese porcina Labcor Comercial preservada com glutaraldeído a 0,4% (Labcor Laboratórios Ltda., Belo Horizonte, Brasil).

No anexo B, encontram-se discriminados os dados intra-operatórios (data da operação, tipo e tamanho das próteses e tempo de CEC).

3.1.3.2. Cuidados pós-operatórios

Após cinco horas da retirada da cânula traqueal, reinstituiu-se a oferta hídrica e a dieta com feno, e administrou-se 1g de cefalotina IM e 5.000 UI de heparina subcutânea, as quais foram administradas a cada 12 horas nos 3 primeiros dias.

A temperatura retal dos animais foi monitorada diariamente na primeira semana e, ao término desta, quando considerados em condições clínicas satisfatórias, foram transferidos para o biotério, aonde permaneceram em observação diária até completar o tempo de exposição de 150 dias estabelecidos para o sacrifício.

3.1.3.3 Avaliação EcoDopplercardiográfica

Os estudos ecoDopplercardiográficos transtorácicos foram realizados antecedendo o sacrifício dos animais.

Utilizou-se um equipamento da marca ATL Ultramark 6 (Philips, Drachten, Holanda) com transdutores de 2,0 e 3,0 megaHertz.

As imagens foram obtidas nos cortes transversal, apical e paraesternal longitudinal em vários planos, gravados no mínimo três ciclos cardíacos consecutivos, sendo considerados os valores médios, excluindo-se as imagens não bem definidas.

Foram determinadas a mobilidade e a suficiência da válvula, o grau de regurgitação valvular, os gradientes transvalvares médio e máximo e a área valvar da prótese.

O ecoDoppler contínuo, obtido em posição apical, corte quatro câmaras, foi utilizado para a determinação do grau de regurgitação mitral pela pesquisa da área de fluxo retrógrado turbulento a partir do orifício mitral.

Foi considerada de grau discreto quando o jato regurgitante ocupava menos de 20% da área do átrio esquerdo; moderada, quando ocupava entre 20 e 40%; e importante, quando preenchia mais de 40% do átrio esquerdo (Figura 3).

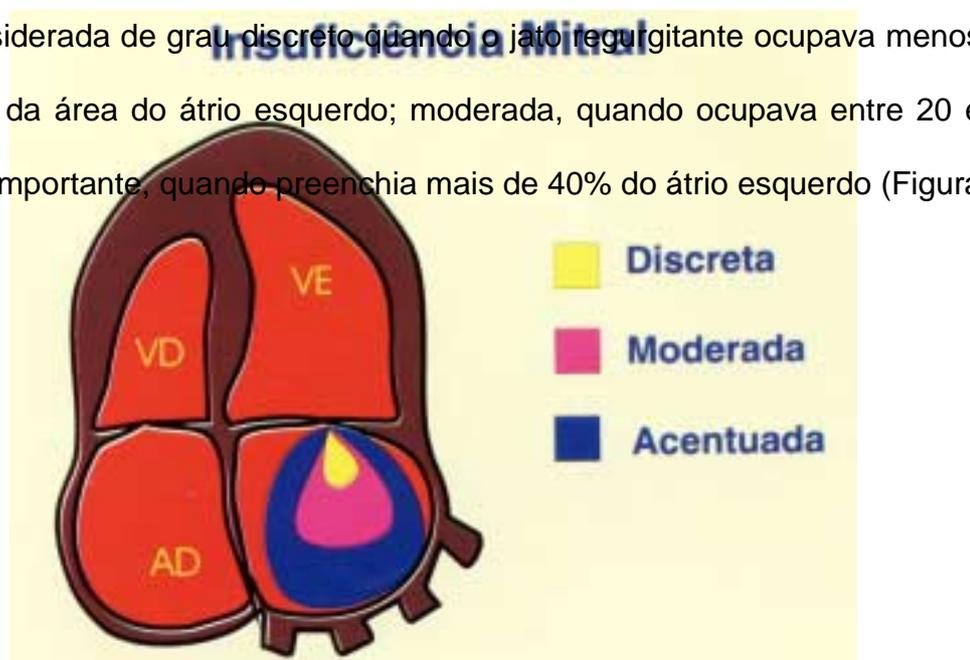


FIGURA 3 – Esquema do mapeamento da cavidade atrial esquerda para quantificação da insuficiência mitral pelo Doppler pulsátil. AD = átrio direito; VD = ventrículo direito; VE = ventrículo esquerdo

O gradiente transvalvar máximo foi calculado pela medida da velocidade do fluxo sanguíneo através do orifício mitral durante a diástole utilizando-se a equação simplificada de Bernoulli:

$$\text{gradiente} = 4 \times \text{velocidade de fluxo}^2.$$

O gradiente médio foi determinado pela planimetria da curva de fluxo mitral.

A área valvar mitral foi determinada por planimetria do orifício valvar no momento de abertura máxima, e calculada pela seguinte fórmula⁵⁵:

$$\text{Área mitral} = \frac{220}{\text{PHT}}$$

Onde: 220 = PHT constante para área mitral de 1cm²

PHT = “pressure-half-time”, ou tempo de meia pressão

3.1.3.4. Avaliação angiográfica

Os estudos foram realizados após completados os 150 dias de pós-operatório, e precederam o sacrifício dos animais para o explante das próteses.

Antes da anestesia, foram coletados de todos os animais, amostras de sangue da veia jugular externa para hemocultura, hematimetria e bioquímica.

Os animais foram anestesiados através da administração endovenosa de tiopental sódico na dose de $12,5\text{mg.Kg}^{-1}$, e em seguida intubados e ventilados mecanicamente. A anestesia foi mantida pela inalação de uma mistura de oxigênio associada a 1,5% de halotano e 50% de óxido nitroso.

O animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo, e após antisepsia do lado direito do pescoço, realizou-se uma cervicotomia longitudinal para a exposição de artéria carótida e veia jugular externa, as quais foram ligadas distalmente e cadaçadas proximalmente com fita cardíaca.

Foi realizado um cateterismo cardíaco direito e esquerdo através de veia jugular e carótida direita utilizando-se um cateter de Swan-Ganz 7Fr e um Pig-Tail 6Fr, respectivamente (Baxter Healthcare Corporation, Irvine, E.U.A).

Foram obtidos os registros das pressões venosa central, arterial sistêmica e pulmonar, ventriculograma e débito cardíaco por termodiluição. O registro destes dados foi feito utilizando-se um monitor multiparamétrico da marca Bese, modelo Biomonitor 7 (Bese, Belo

Horizonte, Brasil), sendo considerados os valores médios, excluindo-se aqueles cujas curvas não estavam bem definidas.

O registro da ventriculografia foi obtido pela injeção na cavidade ventricular esquerda de 40ml de contraste à base de diatrizoato de meglumina a 75% (Hypaque M 75%[®], Sanofi-Syntelabo, Rio de Janeiro, Brasil), e as imagens gravadas pela exposição simultânea à fluoroscopia (10 mA) utilizando-se um fluoroscópio Philips XG 4002/00 (Philips, Drachten, Holanda).

Pela ventriculografia esquerda foi analisada a contração ventricular e a presença de estenose ou regurgitação protética.

3.2. Explante das próteses

Ao término da angiografia, os animais receberam heparina à razão de 350 UI.Kg⁻¹ e foram sacrificados pela injeção endovenosa de 1g de tiopental sódico e 39 mEq (30ml) de cloreto de potássio a 10%.

Em seguida, uma toracotomia esquerda sobre a incisão prévia foi realizada para retirada em bloco do coração e vasos da base.

A prótese mitral foi exposta pela transecção do ventrículo esquerdo abaixo do sulco atrioventricular, e pela transecção do átrio esquerdo acima do plano valvar.

Após ser lavada com solução salina e fotografada, a prótese foi encaminhada para o exame macroscópico.

Os restos dos animais foram incinerados.

3.2.1. Avaliação macroscópica

Pelo exame macroscópico pesquisou-se a:

1. Funcionalidade e integridade do procedimento realizado;
2. Integridade dos tecidos (valvar e miocárdico);
3. Orientação, direção e mobilidade dos folhetos;
4. Presença de trombose, vegetação, calcificação e fibrose (“pannus”);
5. Presença de solução de continuidade periprotética (vazamento).

Os pontos de ruptura e perfurações das cúspides valvulares foram classificados em quatro tipos de acordo com a classificação de ISHIHARA et al.⁴⁸, os quais consideram como lesão Tipo I aquelas rupturas que envolvem a borda livre das cúspides; Tipo II, as perfurações lineares na região basal; Tipo III, grandes defeitos redondos ou ovais nas áreas centrais;

e Tipo IV, as pequenas perfurações em cabeça-de-alfinete nas áreas centrais das cúspides.

Após o exame macroscópico, as próteses explantadas foram fixadas em histochoiceTM (Amresco Inc., Solon, E.U.A.), e transportadas para o exame radiológico.

3.2.2. Avaliação radiológica

As próteses foram submetidas ao estudo radiológico para determinação da distribuição e intensidade dos depósitos de cálcio nos folhetos valvulares.

Foi utilizado um mamógrafo Senographe DMR (GE, Buc, França) com voltagem de aceleração em 22 kV.

O grau de calcificação foi classificado de 0 a 4 de acordo com o método de GRABENWÖGER et al.⁴⁴, que se baseia na quantidade de depósitos de cálcio detectada pela radiografia considerando quatro áreas diferentes do folheto valvular: basal, central, borda livre e comissural. Por este método, a calcificação em cada uma destas quatro áreas é contada como um grau de calcificação independente de quantos folhetos estejam afetados (Figura 4).

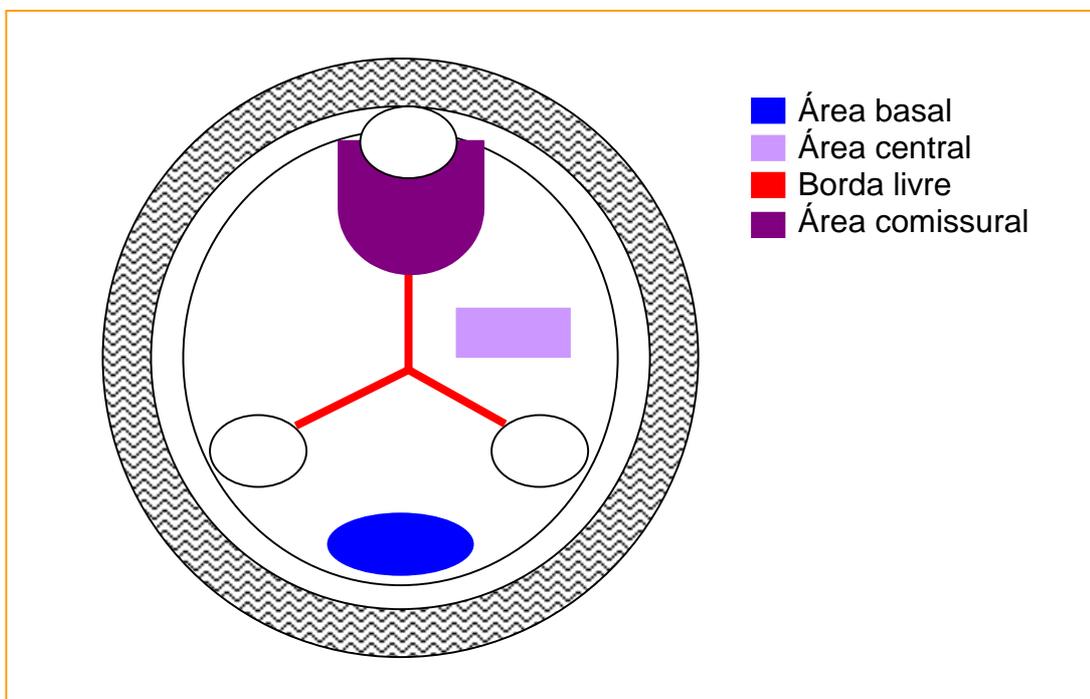


FIGURA 4 – Esquema para classificação do grau de calcificação pela mamografia

3.2.3. Avaliação histológica e imuno-histoquímica

Os estudos histológicos foram realizados para a pesquisa da re-endotelização dos folhetos valvulares e da recelularização da matriz do colágeno por células do hospedeiro; para comprovação da viabilidade celular do novo revestimento endotelial, e ainda para pesquisa da deposição de cálcio e de material trombótico na superfície das válvulas.

3.2.3.1. Microscopia óptica

As biopróteses previamente fixadas, foram cortadas em fragmentos que incluíram a base, a porção média e a borda livre dos folhetos. Estes fragmentos foram desidratados em álcool, embebidos em parafina e seccionados em fragmentos de quatro micrômetros. E em seguida, receberam três colorações distintas: com hematoxilina-eosina para pesquisa de revestimento endotelial e recelularização da matriz colagênica; com nitrato de prata de von Kossa , o qual é específico para depósito de cálcio corando-o em preto; e pelo fator VIII para demonstração da viabilidade celular endotelial corando as células endoteliais em marrom-claro (Factor von Willebrand Policlonal Dako, Gostrup, Dinamarca).

As lâminas foram observadas com o microscópio óptico Olympus CBA (Olympus, Tokyo, Japão).

3.2.3.2. Microscopia eletrônica de varredura

Os fragmentos fixados de tecido valvular foram lavados em cacodilato tamponado e desidratados com acetona até o ponto crítico do dióxido de carbono, e em seguida recobertos com ouro e examinados no microscópio eletrônico de varredura Stereoscam 240 (Cambridge Instruments, Cambridge, Reino Unido).

A microscopia de varredura foi realizada para pesquisar a repopularização endotelial da superfície valvular e para confirmar a morfologia e a organização do novo endotélio.

3.2.3.3. Microscopia eletrônica de transmissão

De cada prótese, foram colhidos cinco fragmentos dos folhetos, medindo 1x1x1mm cada. Os mesmos foram refixados em glutaraldeído a 3%, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, contrastados em bloco em acetato de uranila a 0,5% e incluídos em araldite. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo de Reynolds e observados no microscópio eletrônico de transmissão Philips EM-301 (Eindhoven, Holanda).

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para analisar a ultra-estrutura valvular e identificar os tipos celulares e a sua integridade.

3.3. Análise estatística dos dados

Os dois grupos; grupo teste (prótese não-aldeídica L-Hydro™) e o grupo controle (prótese glutaraldeídica Labcor Comercial®), foram comparados quanto aos dados ecoDopplercardiográficos, angiográficos, radiológicos e histopatológicos.

Os dados quantitativos foram expressos como média e erro-padrão. Comparações entre os grupos foram feitas com o teste-t de Student não-pareado. Os dados qualitativos foram descritos através de frequências absolutas e relativas e comparadas entre os grupos pelo teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%.

As suposições de distribuição normal e variâncias iguais foram testadas.

O processamento dos dados e análise estatística foram realizados utilizando-se o programa estatístico GraphPad InStat 3.0 for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego, E.U.A.).

4 RESULTADOS

4.1 Análise ecoDopplercardiográfica

Não houve diferença estatística quando comparados os dois grupos quanto aos gradientes transvalvares médio e máximo, e quanto à área valvar.

Em apenas um caso do grupo teste (caso 7) não foi possível aferir estas variáveis pela impossibilidade da obtenção de uma janela ecocardiográfica satisfatória, entretanto, o modo bidimensional mostrou função ventricular preservada neste caso.

Ao ecoDopplercardiograma, as próteses se mostraram normofuncionantes, exceto em um controle (caso 10), no qual havia redução na mobilidade dos folhetos secundária à extensa calcificação permitindo refluxo valvular de grau acentuado.

As médias, os erros-padrão e o nível descritivo do teste-t de Student não-pareado (valor de p) das variáveis ecoDopplercardiográficas encontram-se apresentadas na Tabela 1.

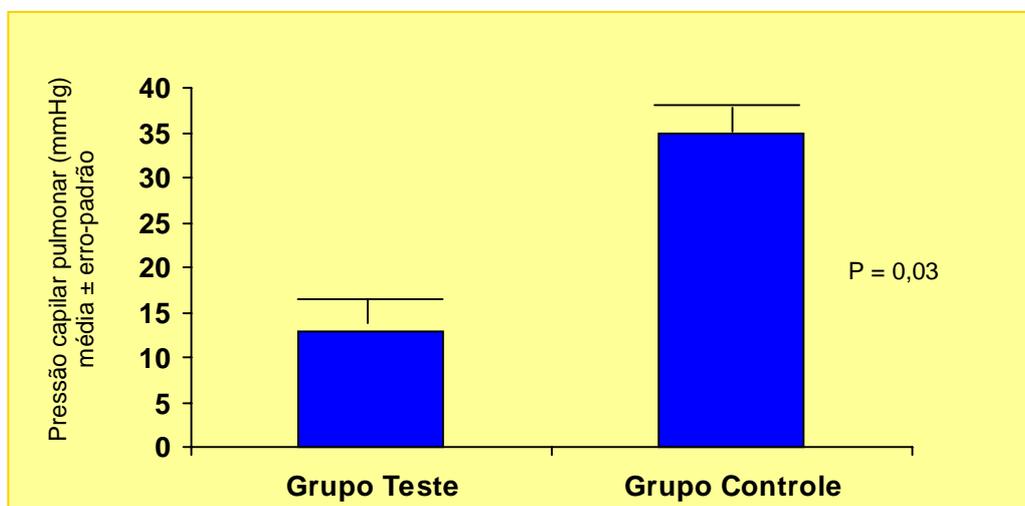
TABELA 1 – MÉDIAS E ERROS-PADRÃO DAS VARIÁVEIS ECODOPPLERCARDIOGRÁFICAS NOS 2 GRUPOS

VARIÁVEL	TESTE		CONTROLE		p
	Média	± EP	Média	± EP	
Gradiente máximo (mmHg)	6	1,30	4,3	0,88	0,40
Gradiente médio (mmHg)	3	1,04	2,33	0,33	0,65
Área valvar (cm ²)	2,5	0,34	1,66	0,33	0,17

No Anexo C, encontram-se discriminados os valores das variáveis ecoDopplercardiográficas.

4.2 Análise angiográfica

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparados os dois grupos quanto às pressões sistêmica, pulmonar e o débito cardíaco. Entretanto, a pressão capilar pulmonar mostrou significância estatística em favor do grupo teste ($p = 0,03$) cujo valor médio foi $15,3 \pm 2,9$ contra $37 \pm 10,3$ para o grupo controle, conforme demonstrado no Gráfico 1.

GRÁFICO 1 – PRESSÃO CAPILAR PULMONAR NOS 2 GRUPOS

A ventriculografia mostrou contratilidade preservada em todos os casos; exceto em um controle (caso 10), no qual havia redução da contratilidade ventricular associada ao retardo no esvaziamento atrial esquerdo, havendo correlação com os achados ecocardiográficos quanto à calcificação e à insuficiência valvular acentuada neste caso.

Em apenas um caso do grupo teste (caso 1) não foi possível aferir as variáveis angiográficas devido à instabilidade hemodinâmica secundária à arritmia ventricular no momento da angiografia.

As médias, os erros-padrão e o nível descritivo do teste-t de Student não-pareado (valor de p) das variáveis angiográficas encontram-se apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 – MÉDIAS E ERROS-PADRÃO DAS VARIÁVEIS ANGIOGRÁFICAS NOS 2 GRUPOS

VARIÁVEL	TESTE		CONTROLE		p
	Média	± EP	Média	± EP	
Pressão arterial sistêmica média (mmHg)	85,3	8,5	90,0	14,4	0,77
Pressão arterial pulmonar média (mmHg)	27,1	3,8	40,3	11,6	0,20
Pressão capilar pulmonar (mmHg)	15,3	2,9	37,0	10,3	0,03
Débito cardíaco (l/min)	4,9	0,6	5,2	1,3	0,81

No Anexo D, encontram-se discriminados os valores das variáveis angiográficas.

4.3 Avaliação macroscópica

Em ambos os grupos, não houve evidência de vegetação, hematomas, abrasões e vazamento periprotético.

Em apenas um caso do grupo teste (caso 1) observou-se pequena ruptura comissural do tipo I.

Nos três casos controles (casos 8, 9 e 10 – Prótese Labcor[®]), havia enrijecimento dos folhetos, invasão de tecido fibrótico, e trombos organizados na superfície atrial com extensa área de calcificação. Estas

alterações não foram evidenciadas nas válvulas do grupo teste (L-Hydro™ não-aldeídica).

A Figura 5 ilustra o aspecto macroscópico de uma prótese aldeídica (Labcor®) explantada após 150 dias (caso 9).

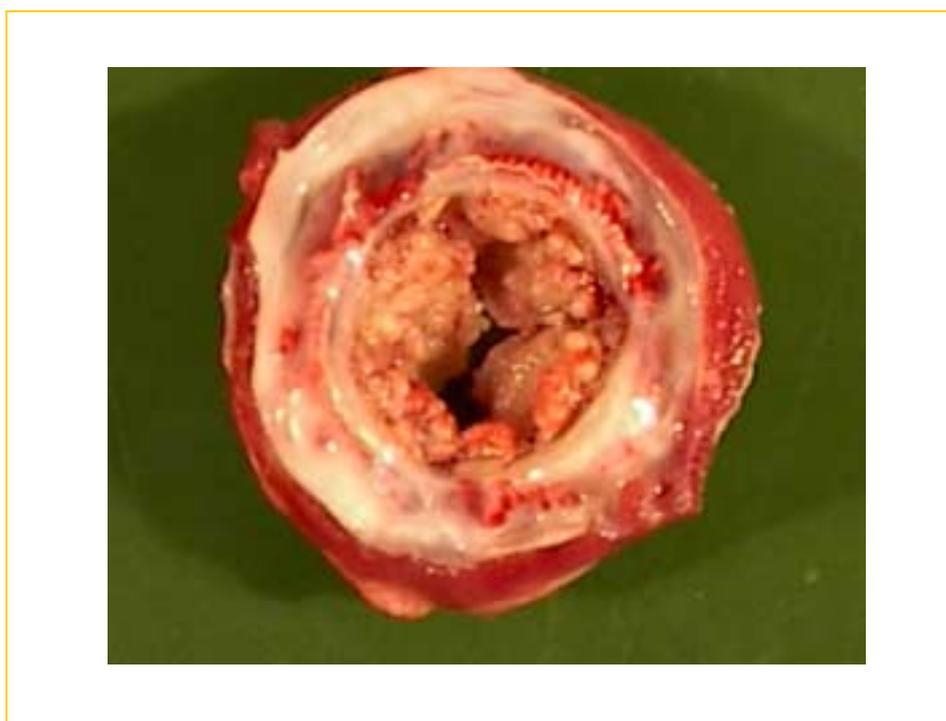


FIGURA 5. Prótese aldeídica (Labcor®) após 150 dias do implante

O aspecto macroscópico de uma prótese não-aldeídica (L-Hydro™), explantada após 150 dias, está ilustrado na Figura 6 (caso 3).

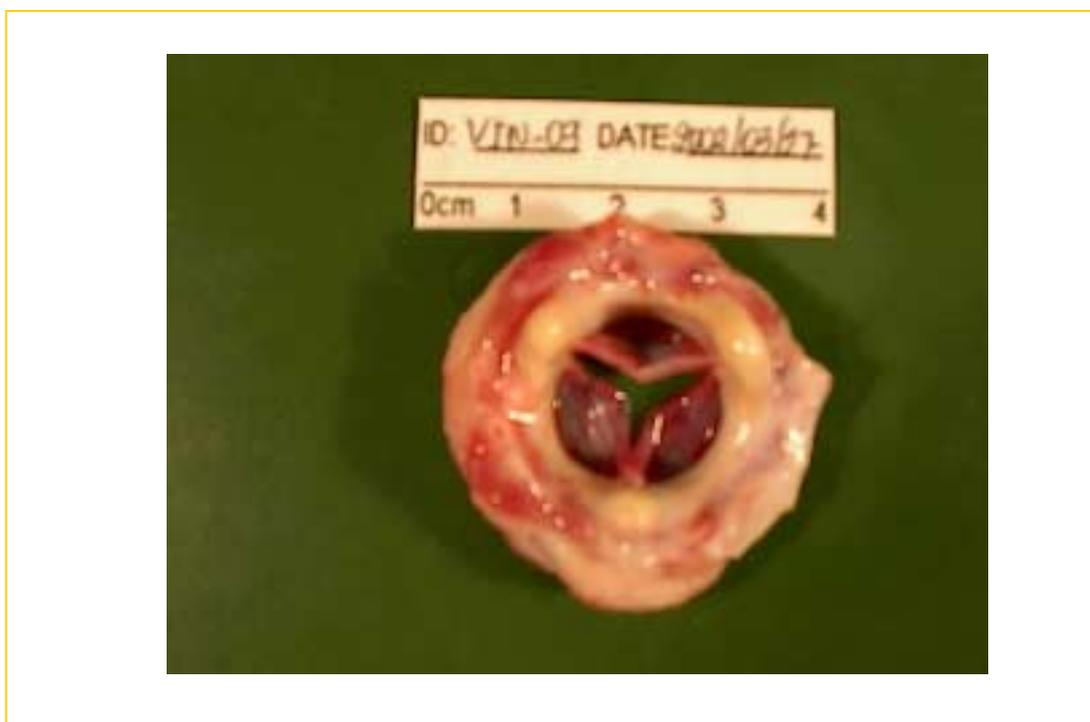


FIGURA 6. Prótese não-aldeídica (L-Hydro™) após 150 dias do implante

No Anexo E, encontram-se discriminados os achados macroscópicos em ambos os grupos, após 150 dias do implante valvular.

4.4 Análise dos achados radiológicos

Não houve calcificação detectável pela técnica mamográfica nas próteses preservadas pelo processo não-aldeídico. Entretanto, no grupo controle, observaram-se diferentes graus de calcificação.

Pela classificação de GRABENWÖGER et al.³², o caso 8 apresentou calcificação grau I; o caso 9, grau IV; e o caso 10, grau III.

O aspecto radiológico de uma prótese de preservação glutaraldeídica (caso 9) com calcificação grau IV encontra-se ilustrado na Figura 7, na qual observou-se depósito de cálcio em uma das comissuras, em uma das bordas livres e na região basal de 2 folhetos.

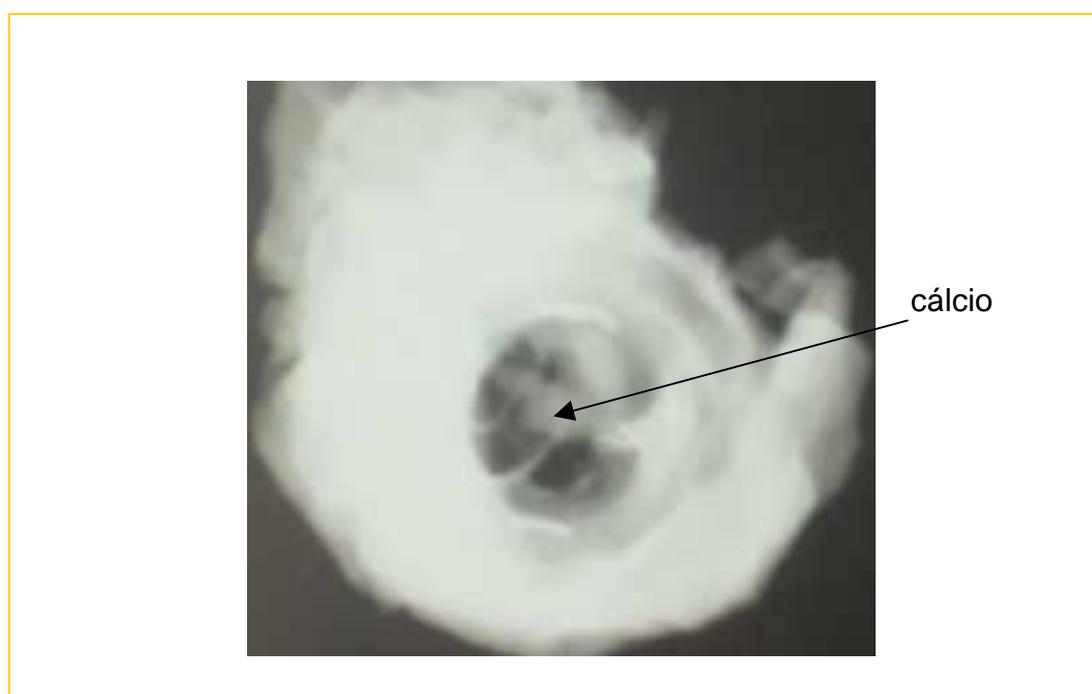


FIGURA 7. Aspecto radiológico de uma prótese aldeídica com calcificação grau IV

O aspecto radiológico de uma prótese de preservação não-aldeídica (caso 5) encontra-se ilustrado na Figura 8, na qual se observou que as cúspides valvulares estão livres de depósitos de cálcio.

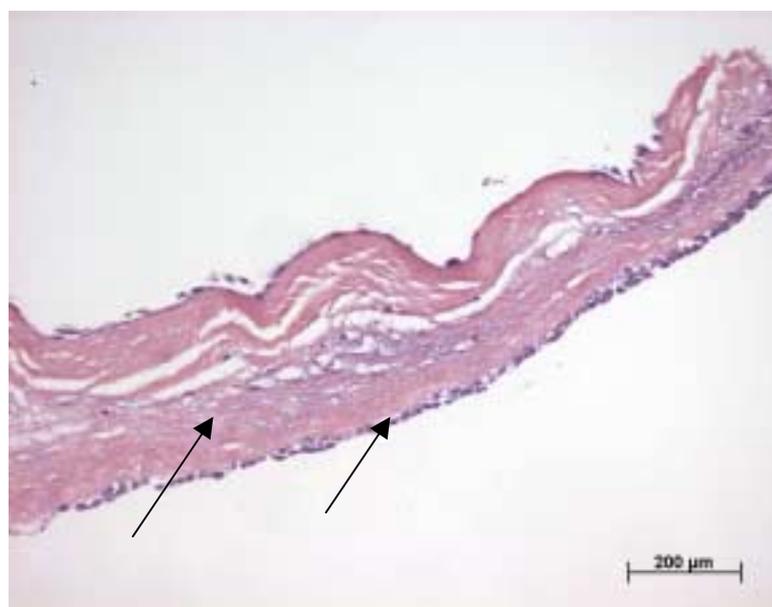


FIGURA 8. Aspecto radiológico de uma prótese não-aldeídica livre de calcificação

4.5 Análise histológica

4.5.1 Aspectos da microscopia óptica

A coloração pela hematoxilina-eosina (HE) mostrou uma camada de células endoteliais contínua revestindo quase toda a superfície dos folhetos das válvulas não-aldeídicas, exceto as bordas livres. Estas células endoteliais mantinham contato direto com o colágeno subjacente, o qual se encontrava com o aspecto denso conforme está ilustrado na Figura 9 (caso 3).



colágeno Células endoteliais

FIGURA 9. Coloração por HE de uma prótese não-aldeídica

No grupo controle, o revestimento endotelial foi descontínuo ficando restrito apenas à base dos folhetos, e em algumas áreas não houve contato direto com o colágeno devido à interposição de fibrina, células mononucleares, cálcio e material trombótico. O colágeno encontrava-se frouxo neste tipo de prótese. Estas alterações se encontram ilustradas na Figura 10 (caso 8).

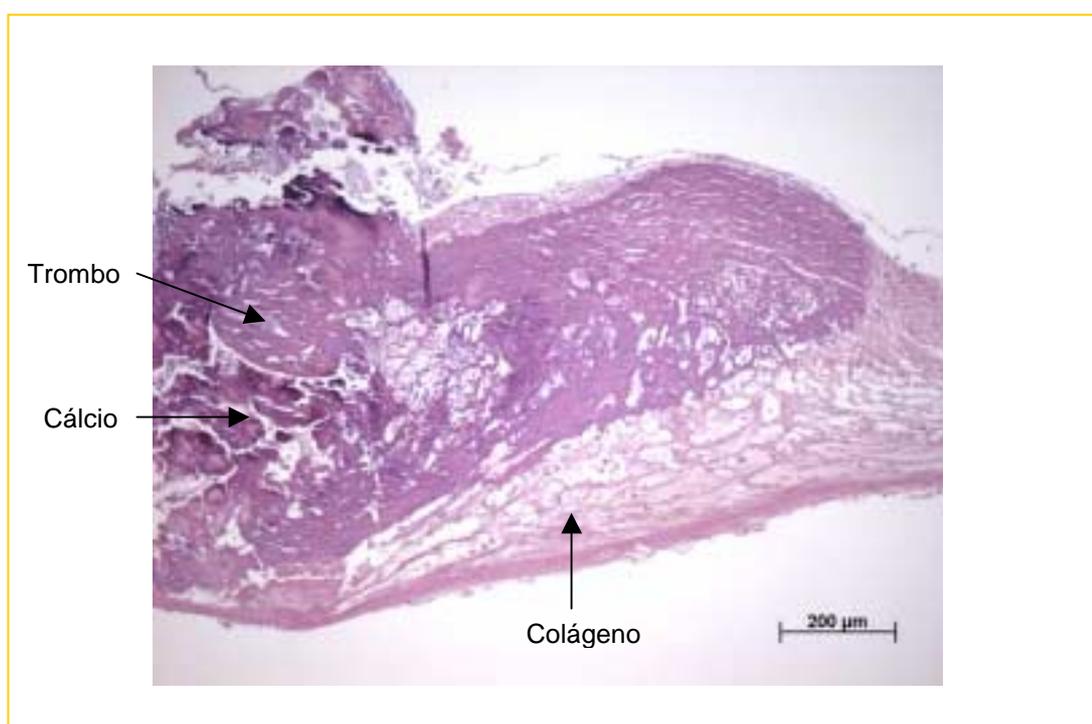


FIGURA 10. Coloração por HE de uma prótese aldeídica. Nota-se ausência de recelularização da superfície e da matriz

A coloração específica para cálcio com nitrato de prata de von Kossa foi positiva em todos os casos do grupo controle conforme ilustrado na Figura 11 (caso 9).

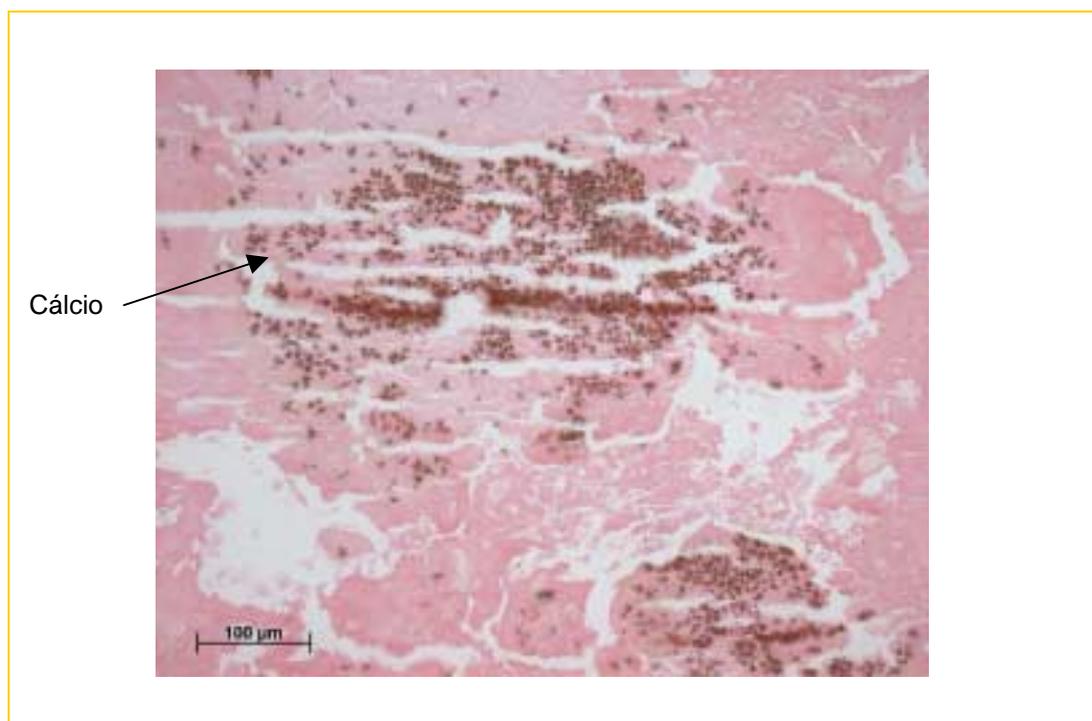


FIGURA 11. Coloração por von Kossa de uma prótese aldeídica

No grupo teste, a coloração por von Kossa foi positiva em apenas um caso (caso 4). Esta coloração foi negativa nos demais casos conforme ilustra a Figura 12.

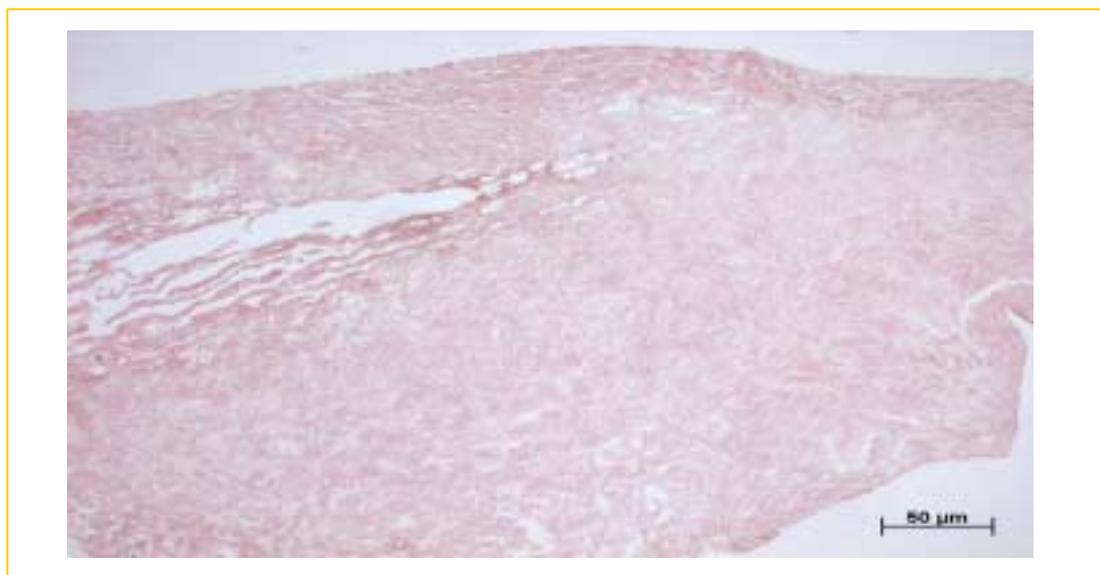
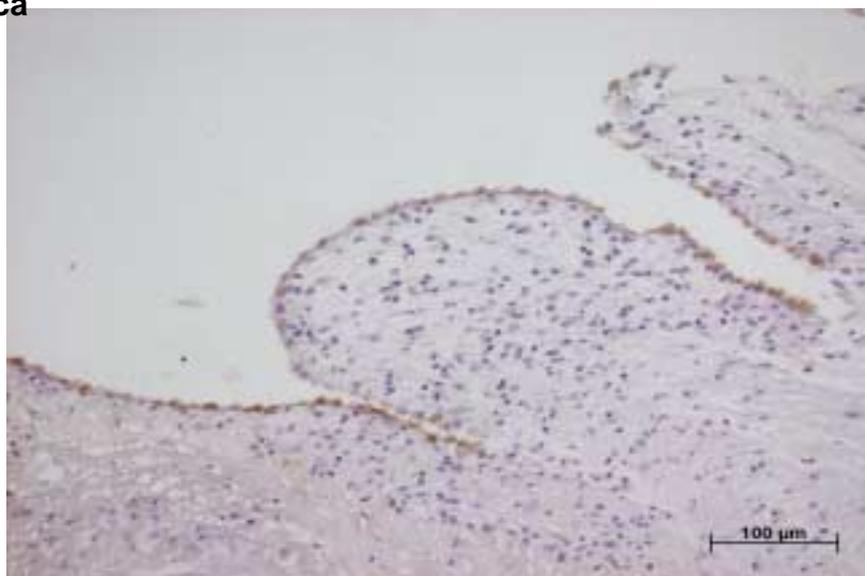


FIGURA 12. Coloração por von Kossa de uma prótese não-aldeídica**4.5.1.1 Análise imuno-histoquímica**

Células endoteliais
A expressão do fator VIII (von Willebrand) confirmou os achados da coloração pela hematoxilina-eosina no grupo teste (L-Hydro™), demonstrando que o revestimento era composto por células endoteliais viáveis, conforme ilustrado na Figura 13 (caso 6).

FIGURA 13. Expressão do fator VIII policlonal em uma prótese não-aldeídica

Houve uma expressão fraca do fator VIII no grupo controle, corando-se apenas aquelas células endoteliais que estavam recobrimo trombos de fibrina. A Figura 14 ilustra a expressão do fator VIII em uma prótese de preservação glutaraldeídica (caso 9).

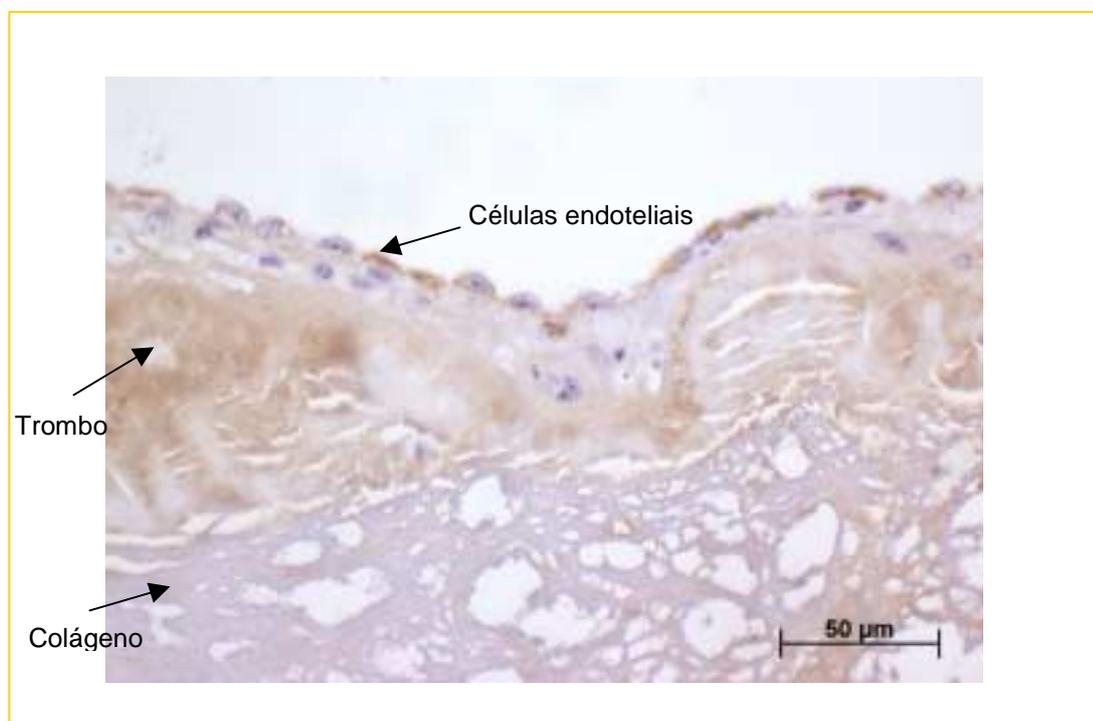


FIGURA 14. Expressão do fator VIII policlonal em uma prótese aldeídica

As frequências absolutas e relativas, e o nível descrito do teste exato de Fisher dos achados histológicos, após 150 dias do implante valvular, encontram-se apresentados na Tabela 3, demonstrando que as válvulas de preservação não-aldeídica foram estatisticamente superiores às válvulas convencionais glutaraldeídicas quanto à capacidade de re-
endotelização ($p = 0,008$), resistência à trombose ($p = 0,008$) e à calcificação ($p = 0,03$).

TABELA 3. FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS APÓS 150 DIAS DO IMPLANTE VALVULAR

VARIÁVEL	ALTERAÇÃO	TESTE	CONTROLE	P
Re-endotelização	Sim	7 (100,0%)	0	0,008
	Não	0	3 (100,0%)	
Trombose	Sim	0	3 (100,0%)	0,008
	Não	7 (100,0%)	0	
Calcificação	Sim	1 (14,3%)	3 (100,0%)	0,03
	Não	6 (85,7%)	0	

4.5.2 Aspectos da microscopia eletrônica de varredura

Todas as próteses tratadas pelo processo L-Hydro™ mostraram um revestimento celular confluyente com morfologia típica de endotélio (células losangulares), e com boa adesividade intercelular conforme ilustrado na Figura 15 (caso 6).

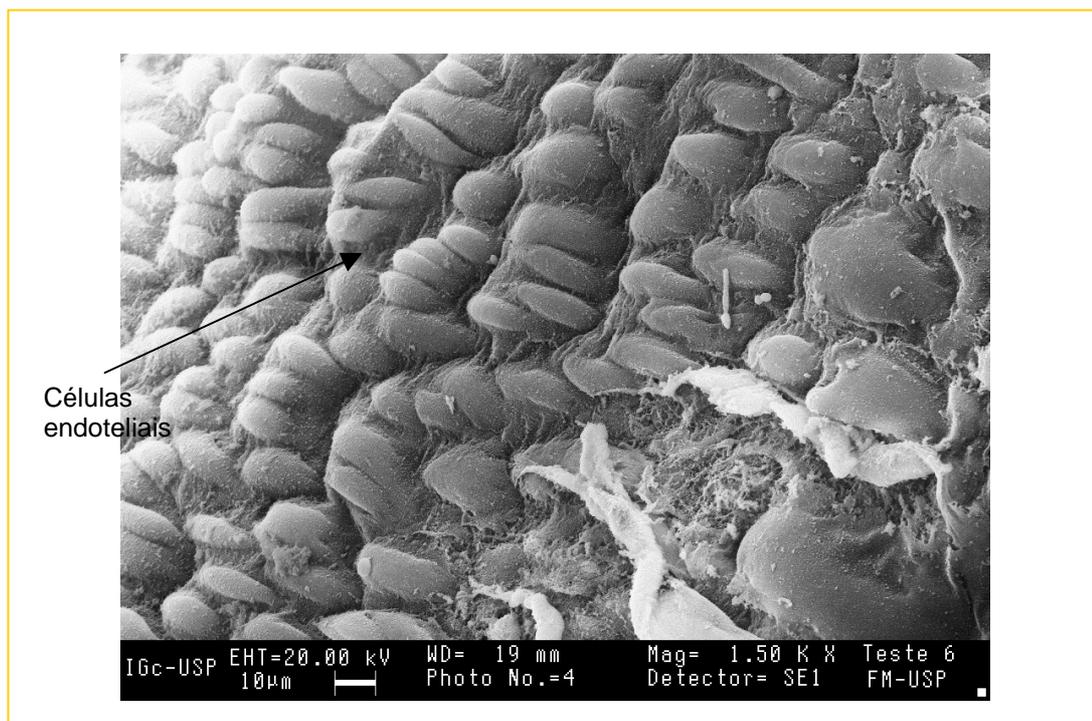


FIGURA 15. Microscopia de varredura de uma prótese não-aldéidica. Observa-se células endoteliais confluentes (aumento original, 1500x)

As próteses tratadas pelo glutaraldeído mostraram células endoteliais esparsas presentes somente na base dos folhetos, e áreas extensas não recelularizadas formadas por fibrilas de colágeno desnudo, conforme ilustrado na Figura 16 (caso 10).

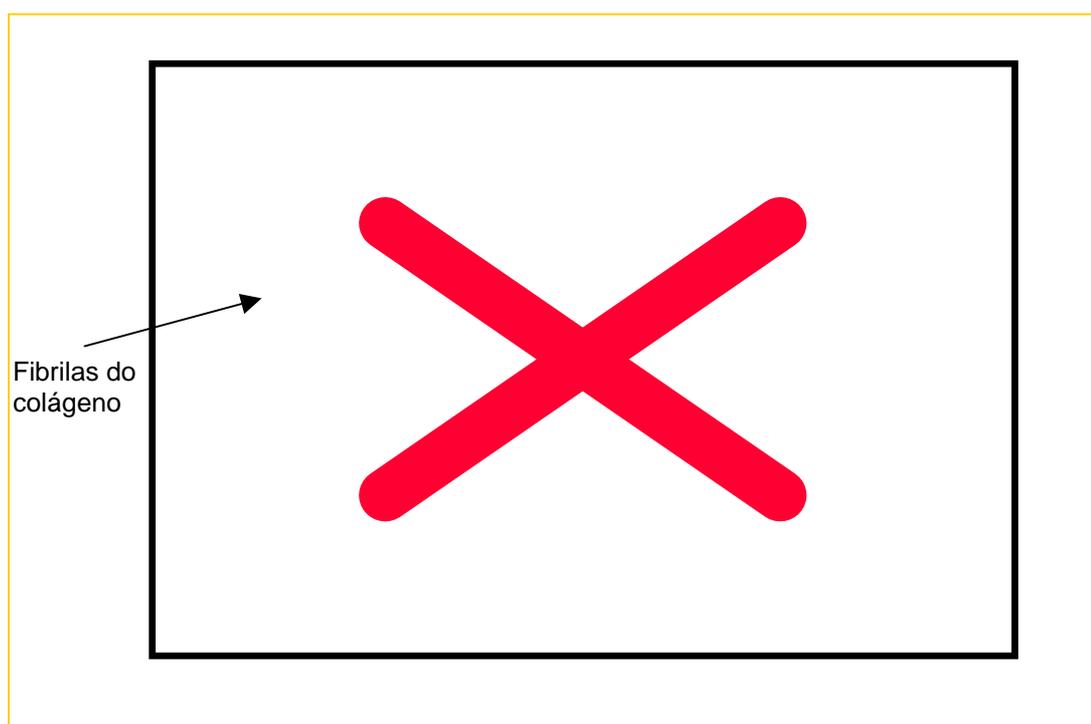


FIGURA 16. Microscopia de varredura de uma prótese aldeídica. Observa-se ausência de endotélio e colágeno desnudo (aumento original, 2500x)

4.5.3 Aspectos da macroscopia eletrônica de transmissão

No grupo teste, observou-se recelularização do colágeno por fibroblastos viáveis, conforme ilustrado na Figura 17 (caso 2).

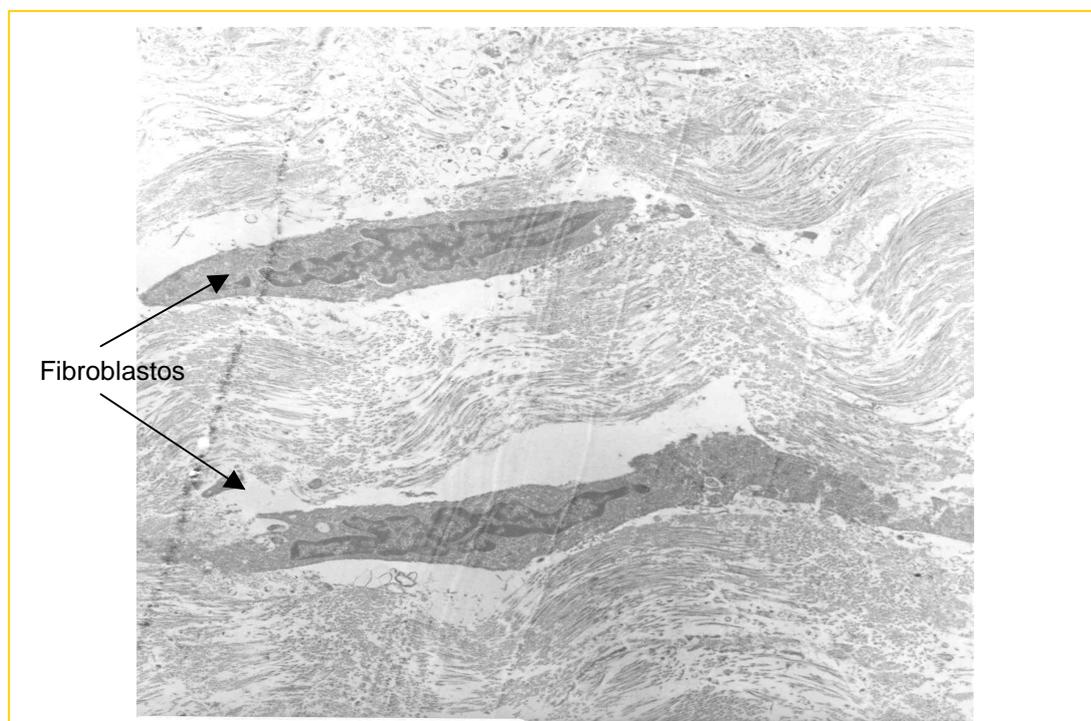


FIGURA 17. Microscopia de transmissão de uma prótese não-aldeídica. Observa-se fibroblastos viáveis incorporados na matriz do colágeno (aumento original, 1000x)

A microscopia de transmissão, no grupo controle, mostrou o colágeno com aspecto degenerado, e com a presença de células gigantes vacuolizadas, inviáveis com membrana citoplasmática rota, conforme ilustrado na Figura 18 (caso 8).

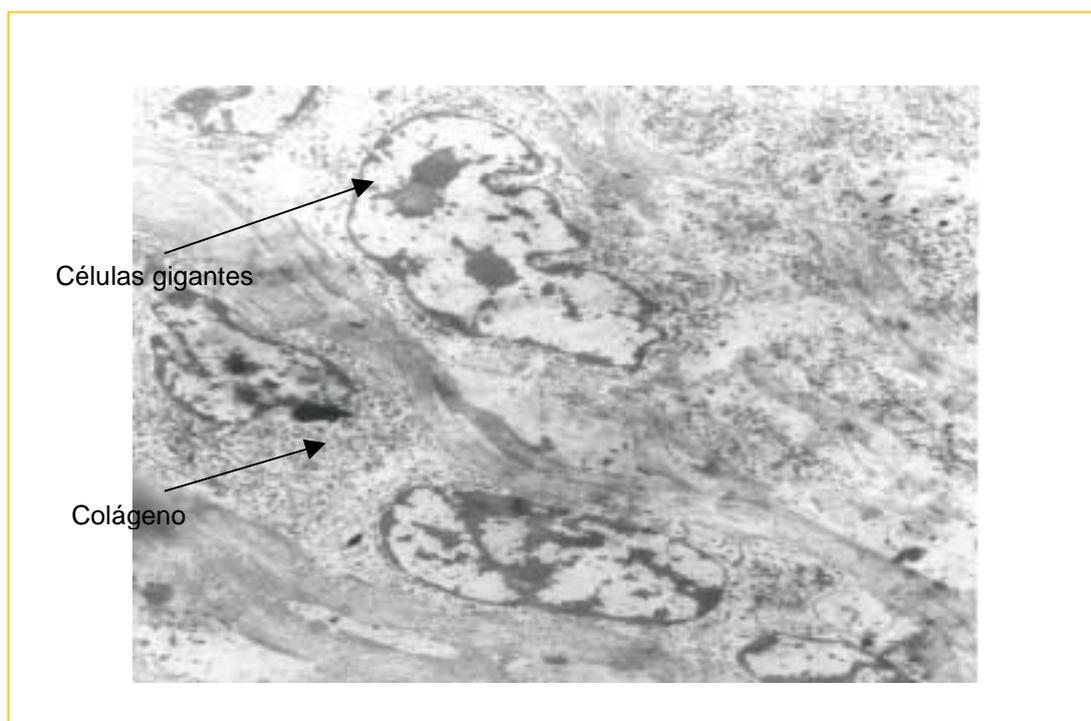


FIGURA 18. Microscopia de transmissão de uma prótese aldeídica. Observa-se ausência de fibroblastos viáveis (aumento original, 1300x)

5 DISCUSSÃO

As próteses cardíacas biológicas vêm sendo utilizadas há mais de 30 anos, por apresentarem melhor função hemodinâmica do que as mecânicas, por prescindirem da anticoagulação, e por apresentarem baixo risco de tromboembolismo e infecção^{9,10,29,30,31}. Entretanto, apesar destas vantagens ainda persistem os problemas relacionados à sua durabilidade, principalmente nos indivíduos mais jovens^{15,16,25}. Um dos fatores que contribuem para isto é a escassez de células endoteliais viáveis na superfície das biopróteses convencionais preservadas em glutaraldeído^{11,47,50}. A ausência desta barreira fisiológica protetora pode resultar em deposição de fibrina e plaquetas na superfície valvular, calcificação tecidual, infecção bacteriana, reações imunológicas, as quais levam à degeneração do enxerto^{43,44,65}. Vale a pena ressaltar que esta barreira de proteção também não existe nos homoenxertos criopreservados porque as células endoteliais são destruídas tanto pelo próprio processo de conservação como pela imunorreatividade contra as células do doador^{66,67,68}.

A calcificação é a causa mais comum de degeneração das biopróteses preservadas em glutaraldeído^{36,37,39,41}. Nos caso específico das biopróteses porcinas, isto também é verdade⁴³. Dentre as hipóteses que justificam o mecanismo para esta calcificação, a mais aceita é aquela que postula que os cristais de fosfato de cálcio contendo sódio, magnésio e carbonato nucleiam-se devido à desvitalização celular inativando a bomba de cálcio³². Vários tratamentos anti-mineralização têm sido usados clínica e experimentalmente, os quais podem ser divididos em duas categorias: a primeira inclui a modificação dos tecidos preservados com o glutaraldeído pela utilização de detergentes como o dodecil-sulfato e o etanol que removem os fosfolípedes, ou ainda pelo uso do ácido amino-oléico, ácido L-glutâmico e pelo aminodifosfonato que se ligam aos aldeídos livres. A segunda categoria inclui os processos não-glutaraldeídicos como o tratamento com o epóxi, com a foto-oxidação e com o carbodiimido^{69,70,71,72,73}. Embora todos estes tratamentos tenham constituído um avanço no controle da calcificação, nenhum deles contempla o ponto-chave do mecanismo fisiopatológico que é a restauração do endotélio viável; a qual somente é possível se utilizado um processo atóxico de preservação tecidual^{32,74}.

Novos biomateriais e novas técnicas de preservação tecidual têm sido testados com o objetivo de reconstruir um tecido valvar viável e de maior resistência e durabilidade, e que prescindia do uso do glutaraldeído. Dentre os novos biomateriais, destacam-se as biopróteses obtidas por engenharia de tecido^{75,76,77,78,79,80}. Nos trabalhos experimentais de SHINOKA

et al.^{81,82,83}, é proposta a construção de uma prótese por meio da sementeira de células endoteliais e fibroblastos de ovinos sobre um esqueleto polimérico biodegradável formado por fibras de ácido poliglicólico e poliglactina. A exposição média de 125 dias destas próteses à circulação pulmonar mostrou-se satisfatória com evidência de crescimento em diâmetro dos condutos implantados e da presença de revestimento endotelial. Entretanto, a maior limitação destas próteses com matriz sintética é a sua rigidez e alta porosidade, aspectos que precisam ser melhorados para que estas próteses possam ter aplicação clínica⁸⁴.

A decelularização de heteroenxertos e homoenxertos associada à endotelização autógena *in vitro* tem ganhado notoriedade nos últimos anos^{3,4,85,86,87,88}. A obtenção de matrizes acelulares naturais pode ser feita por tratamento enzimático como proposto por O'BRIEN et al.⁵³ ou pelo uso de detergentes químicos como proposto por DOHMEN et al.^{7,89} e por BADER et al.⁵⁵. Os resultados com estas técnicas de extração celular são bastante promissores; entretanto, a maioria dos estudos se encontra em fase pré-clínica ou clínica inicial como o trabalho de DOHMEN et al.⁹⁰ na Alemanha e de COSTA et al.⁹¹ no Brasil, com a utilização de homoenxertos decelularizados para a reconstrução da via de saída do ventrículo direito na cirurgia de Ross. Em estudo recente, SIMON et al.⁹² demonstraram a degeneração precoce em quatro crianças submetidas à reconstrução da via de saída do ventrículo direito, utilizando-se a bioprótese decelularizada Synergraft™, das quais três tiveram morte súbita por ruptura do enxerto. A análise histológica pré-implante mostrou descclularização incompleta e a

presença de depósito de cálcio; e a análise pós-explante mostrou reação inflamatória do tipo corpo estranho em todos os casos.

Quanto à endotelização *in vitro*, é uma técnica que ainda requer refinamento por envolver uma metodologia complexa, demorada, de alto custo e cujo desempenho *in vivo* é incerto. LEUKAUF et al.⁵⁶ apontam como a principal limitação desta técnica a adesividade fraca do endotélio semeado sobre a matriz do colágeno, e conseqüentemente a baixa resistência às forças do fluxo sobre a interface sangue/válvula resultando no rápido desprendimento destas células após o implante valvular.

Segundo FRATER et al.⁵⁹ a alternativa para todas estas limitações metodológicas seria o implante de válvulas biológicas que permitam ou promovam o revestimento endotelial espontâneo com células do hospedeiro. Este princípio embasou o desenvolvimento de preservação L-Hydro™ utilizada neste estudo.

O processo L-Hydro™ tem como agente de preservação tecidual o polietilenoglicol (PEG), o qual é um polímero bastante estável quimicamente cuja fórmula é HO.CH₂ (CH₂-CH₂) N-CH₂OH. Devido ao grande número de oxigênio na cadeia polimérica, este agente tem grande propensão à formação de complexos podendo inclusive associar-se a eletrólitos em soluções diluídas. O PEG é produzido pela polimerização catalítica heterogênea a partir de monômeros de óxido de etileno, e tem como propriedades: a solubilidade em água, cetonas, glicerol e etanol; entretanto, é menos higroscópico e resiste melhor à decomposição do que estes dois últimos compostos⁹³. A sua toxidez é bastante reduzida por ser

quimicamente inerte; e a sua excreção, quando em contato com a circulação sanguínea, se faz completamente pelo rim sem ser metabolizado, o que assegura a sua aplicação clínica como veículo para dissolver fármacos pouco solúveis em água como a reserpina e a nitrofurantoína ou aqueles facilmente hidrolisáveis como os barbituratos alcalinos^{94,95,96, 97}.

A toxidez reduzida do PEG foi demonstrada por WICOMB et al.⁹⁸, os quais relataram que com a administração aguda em animais de doses elevadas atingindo 16 g/kg durante 12 a 16 horas, não foram detectados efeitos adversos, e que a administração crônica foi igualmente inócua.

O PEG mostrou-se eficaz em vários estudos experimentais *in vitro* quando adicionado à solução de preservação miocárdica, garantindo a viabilidade funcional do órgão por tempo mais prolongado (até 24 horas) do que aquele preconizado como uso das soluções cardioplégicas convencionais como a de “Saint Thomas” e da “University of Wisconsin” que é de quatro a seis horas^{99,100, 101}. Esta capacidade de preservação mais prolongada deve-se à ação osmótica do PEG que estabiliza a membrana tornando-a menos permeável ao soluto extracelular, e conseqüentemente prevenindo o edema celular⁹⁸. O PEG mostrou-se igualmente eficaz quando utilizado na criopreservação de coração de ratos conforme o estudo de BANKER et al.¹⁰², os quais relataram que a inclusão do PEG permitiu a redução do conteúdo de água e da formação de gelo tecidual minimizando a lesão miocárdica pelo congelamento.

É também atribuída ao PEG a propriedade imunossupressora na qual está fundamentada a preservação L-Hydro™ utilizada neste estudo. Tem sido demonstrado que antígenos que se combinam com o PEG manifestam redução da antigenicidade; como foi relatado no estudo de COLLINS et al.¹⁰³, no qual observou-se uma redução de 30% na incidência de rejeição no grupo de receptores de transplante cardíaco nos quais os órgãos dos doadores foram preservados com uma solução contendo PEG a 5%. Em estudo subsequente por TOKUNAGA et al.¹⁰⁴, foi demonstrado o aumento estatisticamente significativo na sobrevivência (11,9 *versus* 9,6 dias) com transplante hepático de ratos cujos órgãos foram previamente irrigados com solução de PEG de alto peso molecular (20.000 daltons). Para aqueles autores esta ação imunossupressora decorre da ligação do PEG com os lipídios da membrana celular dos antígenos formando complexos reversíveis, os quais alteram ou mascaram a superfície celular destes antígenos de maneira análoga àquela descrita para a combinação química específica com os alérgenos; ou seja, interfere com a ativação dos macrófagos e conseqüentemente com a ativação das células T_{-Helper}, induzindo ao estado de tolerância aos antígenos do doador, cuja imunogenicidade torna-se reduzida. De modo semelhante, na preservação L-Hydro™ os antígenos porcinos são extraídos e os remanescentes são mascarados mediante a oxidação química controlada com o uso do PEG.

No presente estudo, evidenciou-se que as próteses não-aldeídicas (L-Hydro™) tiveram melhor rendimento hemodinâmico caracterizado pela ausência de regurgitação e pela menor pressão capilar

pulmonar média ($p < 0,03$) quando comparadas com as próteses aldeídicas (Labcor®). Estes achados são atribuídos à manutenção das propriedades naturais do tecido valvar como foi demonstrado no exame macroscópico destas válvulas; que na ausência do aldeído se mantêm livres de inflamação, enrijecimento e conseqüentemente da calcificação^{14,38,49}. A ausência de toxidez com a preservação L-Hydro™ permitiu que a superfície e a matriz de todas as próteses do grupo teste se tornassem cito-compatíveis permitindo a re-endotelização espontânea por células do hospedeiro^{22,23}. Este revestimento endotelial, conforme demonstrado por nós e por outros autores^{6,8,45,46,105,106,107}, favoreceu maior resistência à calcificação e à trombogenicidade. Destacam-se, na literatura, os estudos de BENGTTSSON et al.¹⁰⁸ e MACGREGOR et al.¹⁰⁹ que demonstraram que a semeadura de células endoteliais mesmo sobre uma superfície não-biológica, como os folhetos de uma prótese mecânica, proporcionou melhor resistência à trombose.

A resistência à trombose denota que o novo endotélio está intacto, conforme demonstrado na microscopia eletrônica de varredura; e viável mantendo preservadas as suas propriedades antiagregante e antitrombótica, conforme demonstrado pela análise imuno-histoquímica com o fator de von Willebrand. Esta integridade do novo endotélio caracterizado na microscopia de varredura pela confluência endotelial com aspecto em mosaico; e pelo contato deste com a matriz do tecido conjuntivo, também confere resistência à insudação de proteínas plasmáticas e sais, que são precursores da degeneração bioprotética¹⁰⁶. Entretanto, até o presente, os

benefícios com a restauração desta barreira fisiológica só foram evidenciados nas preservações não-aldeídicas como com o uso do glicerol e com a descelularização química⁵⁰. As próteses de duramáter preservadas com glicerol mostraram estrutura histológica normal quando explantadas com até 75 meses de pós-operatório²¹. Este achado foi confirmado experimentalmente com o implante em ovinos de biopróteses de pericárdio bovino com preservação semelhante^{22,23}. Com a descelularização química, BENGTTSSON et al.¹⁰⁶ demonstrou a capacidade de organização endotelial, porém o revestimento endotelial neo-formado foi descontínuo com fendas longitudinais desprovidas de células endoteliais, ao contrário daquele observado por nós com a endotelização espontânea com a preservação pelo PEG.

As próteses do grupo controle foram todas suscetíveis à calcificação macro e microscópica e à deposição de material trombótico. A repercussão hemodinâmica destas alterações estruturais foi a elevação significativa da pressão capilar pulmonar, a redução do orifício valvular embora estatisticamente não significativa, e a regurgitação valvular importante em um dos casos (caso 10). Estes achados assim como a ausência de re-endotelização são consistentes com os relatos da literatura como o de ISHIHARA et al.⁴⁸ quanto à ação deletéria do glutaraldeído sobre o tecido valvar. Estes autores relataram que apenas 23% das biopróteses porcinas preservadas em glutaraldeído apresentavam algum revestimento endotelial em forma de “pannus” após cinco anos do implante. Achado semelhante foi evidenciado por nós na microscopia de varredura pela

observação de áreas extensas de colágeno desnudo com células endoteliais esparsas restritas à base dos folhetos. A observação destas áreas na microscopia óptica mostrou ausência de contato direto destas células com o colágeno, ao contrário das próteses não-aldeídicas em que este revestimento mostrou-se uniforme com boa adesividade intercelular e destas células com a matriz, o que reflete uma boa resistência deste novo endotélio às forças do fluxo.

O presente estudo, assim como outros que utilizam o mesmo modelo animal, na avaliação de novas tecnologias para fixação/estabilização de tecidos, tem como limitação a impossibilidade de reproduzir o efeito da doença cardíaca e o perfil de coagulação comparável ao dos seres humanos^{32,50,51,110}. Entretanto, a endotelização como mecanismo para minimizar ou retardar a degeneração estrutural se mostrou como uma possibilidade real, desde que o tecido valvar possa ser preservado por um agente com as características do PEG tornando-o propício à recelularização por células do hospedeiro em virtude da sua baixa toxicidade, da sua capacidade de atenuar os xeno-antígenos porcinos e de manter preservada arquitetura histológica valvar¹¹¹. Estas propriedades podem garantir maior desempenho e durabilidade às próteses biológicas. Contudo, somente um ensaio clínico com seguimento tardio poderá validar as premissas deste estudo.

6 CONCLUSÕES

1 – O processo não-aldeídico (L-Hydro™) utilizado no presente estudo permitiu a endotelização espontânea com evidência de uma boa adesividade do novo endotélio à matriz do colágeno.

2 – A preservação não-aldeídica mostrou maior resistência à calcificação e à trombose quando comparada à preservação aldeídica convencional.

7 ANEXOS

ANEXO A – Dados de identificação dos animais de experimentação: número, registro, data de nascimento, idade, peso e categoria.

Caso	Registro	DN	Idade (meses)	Peso (kg)	Categoria
1	1174BR	28/05/01	4,97	33	Teste
2	72AZ	29/05/01	4,97	32	Teste
3	69AZ	31/05/01	4,90	31	Teste
4	1195BR	30/05/01	4,97	33	Teste
5	1179BR	03/06/01	4,83	32	Teste
6	1199BR	14/05/01	5,50	30	Teste
7	68AZ	10/05/01	5,67	33	Teste
8	76AZ	11/06/01	4,60	30	Controle
9	70AZ	29/05/01	5,87	35	Controle
10	78AZ	21/06/01	5,50	31	Controle

DN = data de nascimento

ANEXO B – Variáveis intra-operatórias

Caso	Categoria	Tipo de Prótese	Tamanho	Posição	TCEC	Data
1	Teste	L-Hydro	25	Mi	45	24/10/01
2	Teste	L-Hydro	23	Mi	54	25/10/01
3	Teste	L-Hydro	23	Mi	52	25/10/01
4	Teste	L-Hydro	25	Mi	55	26/10/01
5	Teste	L-Hydro	23	Mi	57	26/10/01
6	Teste	L-Hydro	23	Mi	62	26/10/01
7	Teste	L-Hydro	25	Mi	60	27/10/01
8	Controle	Labcor	25	Mi	91	27/10/01
9	Controle	Labcor	23	Mi	105	21/11/01
10	Controle	Labcor	23	Mi	71	03/12/01

L-Hydro = prótese porcina não-aldeídica L-Hydro™, Philogenesis Inc., Monrovia, E.U.A.

Labcor = prótese porcina aldeídica Labcor®, Labcor Laboratórios Ltda, Belo Horizonte, Brasil.

Tamanho = diâmetro interno em mm.

Mi = mitral

TCEC = tempo de circulação extracorpórea em minutos.

ANEXO C – Variáveis EcoDopplercardiográficas

Caso	Categ.	Data Op.	Data Eco	T. Implante	Grad. Máx.	Grad. Méd.	AV	Grau Regurg.
1	T	24/10/01	23/03/02	150	7,2	5	2,93	A
2	T	25/10/01	23/03/02	149	10	7	1,91	A
3	T	25/10/01	23/03/02	149	8	3	3,8	A
4	T	26/10/01	23/03/02	148	4	2	2,03	A
5	T	26/10/01	23/03/02	148	5	2	1,98	A
6	T	26/10/01	23/03/02	148	3	1	2,03	A
7	T	27/10/01	23/03/02	147	-	-	-	-
8	C	27/10/01	23/03/02	147	4	2	1,99	A
9	C	21/11/01	23/03/02	92	3	3	1,93	A
10	C	03/12/01	23/03/02	80	6	3	1,42	I

Categ. = categoria

T = teste

C = controle

Data Op. = data da operação

Data Eco = data do ecocardiograma

T. Implante = tempo de implante valvular em dias

Grad. Máx.= gradiente máximo em mmHg

Grad. Méd. = gradiente médio em mmHg

AV = área valvar em cm²

- = dado não avaliado

Grau Regurg. = grau de regurgitação

A = ausente

I = importante

ANEXO D – Variáveis angiográficas

Caso	Categoria	T. Implante	PAM	PAP	PCP	DC	Contratilidade
1	Teste	151	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Teste	152	62	27	7	5	N
3	Teste	151	79	18	17	2,7	N
4	Teste	152	81	28	11	6	N
5	Teste	152	102	18	14	6,6	N
6	Teste	152	118	28	15	3,6	N
7	Teste	151	70	44	28	5,3	N
8	Controle	151	66	18	19	2,6	N
9	Controle	176	116	46	37	7,1	N
10	Controle	164	88	57	55	5,9	R

T. Implante = tempo de implante valvular em dias

PAM = pressão arterial média em mmHg

PAP = pressão arterial pulmonar média em mmHg

PCP = pressão capilar pulmonar em mmHg

DC = débito cardíaco em l/min

N = normal

N/A = dado não avaliado

R = reduzida

ANEXO E – Achados macroscópicos

Caso	Categoria	T. Implante	Perfuração	Fibrose	Calcificação	Trombose
1	Teste	151	I	0	0	0
2	Teste	152	0	0	0	0
3	Teste	151	0	0	0	0
4	Teste	152	0	0	0	0
5	Teste	152	0	0	0	0
6	Teste	152	0	0	0	0
7	Teste	151	0	0	0	0
8	Controle	151	0	+	+	+
9	Controle	176	0	+	+	+
10	Controle	164	0	+	+	+

T. Implante = tempo de implante em dias.

I = ruptura comissural do tipo I de ISHIHARA et al⁴⁸.

+ = presente

0 = ausente

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- STEINHOFF, G.; STOCK, U.; KARIM, N.; MERTSCHING, H.; TIMKE, A.; MELISS, R.R.; PETHIG, K.; HAVERICH, A.; BADER A. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. **Circulation**, v.102, p. 50-5, 2000. Supplement .
- 2- SODIAN, R.; HOERSTRUP, S.P.; SPERLING, J.S.; DAEBRITZ, S.; MARTIN, D.P.; MORAN, A.M.; KIM, B.S.; SCHOEN, F.J.; VACANTI, J.P.; MAYER, J.E.. Early in vivo experience with tissue-engenireed trileaflets heart valves. **Circulation**, v.102, p.22-9, 2000. Supplement .
- 3- VESELY, I.; NOSEWORTHY, R.; PRINGLY, G. The hybrid xenograft/autograft bioprosthetic heart valve: in vivo evaluation of tissue extraction. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 60, p.359-64, 1995. Supplement.

- 4- GOLDSTEIN, S.; CLARKE, D.R.; WALSH, S.P.; BLACK, K.S.; O'BRIEN, M.F. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. **Ann. Thorac. Surg.**, v.70, p.1962-9, 2000.

- 5- BENGTTSSON, L.; RADEGRAN, K.; HAEGERSTRAND, A. In vitro endothelialization of commercially available heart valve bioprostheses with cultured adult human cells. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.**, v. 7, p. 393-8, 1999.

- 6- ELKINS, RC.; GOLDSTEIN, S.; HEWITT, C.W.; WALSH, S.P.; DAWSON, P.E.; OLLERENSHAW, J.D.; BLACK, K.S.; CLARKE, D.R.; O'BRIEN, M.F. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptative remodeling. **Sem. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 13, p.87-92, 2001. Supplement.

- 7- DOHMEN, P.M.; OZAKI, S.; YPERMAN, J.; FLAMENG, W.; KONERTZ, W. Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep. **Sem. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.13, p.93-8, 2001. Supplement.

- 8- ZAVAZAVA, N.; SIMON, A.; SIEVERS, H.H.; BERNHARD, A.;
MULLER-RUCHOLTZ, W. Porcine valves are reendothelialized by
human recipient endothelium in vivo. **J. Thorac. Cardiovasc.
Surg.**, v. 109, p.702-6, 1995.
- 9- COHN, L.H.; COLLINS, J.J.; DISESA V.J.; COUPERGS, PEIGHPS;
KOWALKER, W.; ALRED, E. Fifteen-year experience with 1678
Hancock porcine bioprosthetic heart valve replacements. **Ann.
Surg.**, v.210, p.435-42, 1989.
- 10- JAMIESON, W.R.; MUNRO, A.I.; MIYAGISHIMA, R.T.; ALLEN, P.;
BURR, L.H.; TYERS, G.F.O. Carpentier-Edwards standard porcines
bioprosthesis: clinical performance to seventeen years. **Ann.
Thorac. Surg.**, v.60, p.999-1006, 1995.
- 11- FISCHLEIN, T.; LEHNER, W.; REICHART, B. Endothelialization of
aldehyde-fixed cardiac valve bioprostheses. **Transplant. Proc.**,
v.24, p.2988, 1992.
- 12- SHEN, M.; CARPENTIER, S.; BERREBI, A.T.; CHEN,L.; MARTINETI,
B.; CARPENTIER, A. Protein adsorption of calcified and
noncalcified valvular bioprostheses after human implantation. **Ann.
Thorac. Surg.**, v.71, p.406-7, 2001. Supplement.

- 13- SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Pathology of substitute heart valves: new concepts and developments. **J. Card. Surg.**, v.9, p.222-7. 1994. Supplement.
- 14- HUANG-LEE, L. L.H.; CHEUNG, D.T.; NIMMI, M. E. Biochemical changes and citotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 24, p.1185-1201, 1990.
- 15- GABBAY, S.; KADAM, P.; FACTOR, S.; CHEUNG, T.K. Do heart valve bioprostheses degenerate for metabolic or mechanical reasons? **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 95, p. 208-15, 1988.
- 16- CARPENTIER, A.; DUBOST, C.; LANE, E.; NASHEF, A.;
CARPENTIER, S.; RELLAND, J.; DELUCHE, A.; FABIANI, J;
CHAUVAUD, S.; PERIER, P.; MAXWELL, S. Continuing improvements in valvular bioprostheses. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 83, p.27-42, 1982.
- 17- GOTT, J.R.; CHIN, P.; DORSEY, L.M.A.; JAY, J.L.; JETT, G.K.;
SCHOEN, F.J.; GIRARDOT, J.; GUYTON, R.A. Calcification of porcine valves: a sucessful new method of antimineralization. **Ann. Thorac. Surg.**, v.53, p.207-17, 1992.

- 18- BINET, J.P.; DURAN, C.G.; CARPENTIER, A.; LANGLOIS, J.
Heterologous aortic valve transplantation. **Lancet**, v.2, p.1275, 1965
apud COHN, L.H.; COLLINS, J.J., Jr. The glutaraldehyde-stabilized
porcine xenograft valve. In: IONESCU, M.I., ed. **Tissue Heart
Valves**. London, Butterworth, 1979. p. 173-200.
- 19- O'BRIEN, M.F.; Heterograft aortic valves for human use: valve bank,
techniques of measurement and implantation. **J. Thorac.
Cardiovasc. Surg.**, v.53, p.392, 1967 apud BUCH, W.S.; KOSEK,
J.C.; ANGELL, W.W. Deterioration of formalin-treated aortic valve
heterografts. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 60,p.673-7, 1970.
- 20- PUIG, L.B.; VIRGINELLI, G.; BELOTTI, G. ; KAWABE, L. ; FRACK,
C.C.R. ; PILEGGI, F. ; DECOURT, L.V.; ZERBINI, E.J. Homologous
dura mater cardiac valve. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 64,
p.154-60, 1972.
- 21- ZERBINI, E.J.; PUIG, L.B. The duramater allograft valve. In: Ionescu,
M.I., ed. **Tissue Heart Valves**. London, Butterworth, 1979. p.253-
301.
- 22- GONG, G.F.; MACALUSO, F.; FANT, J.; FACTOR, S.M.; FRATER,
R.W.M. Spontaneous host endothelial growth on bioprostheses:
influence of fixation. **Circulation**, v.84, p.640, 1991. Supplement.

- 23- HOFFMAN, D.; GONG, G.; LIAO, K.; MACALUSO, F.; NIKOLIC, S.D.; FRATER, R.W.M. Spontaneous host endothelial growth on bioprosteses. **Circulation**, v. 86, p.75-9, 1992. Supplement II.
- 24- ALLEN, D.J.; HIGHISON, G.J.; DIDIO, L.J.A.; ZERBINI, E.J.; PUIG, L.B. Evidence of remodeling in dura mater cardiac valves. **J. Thorac Cardiovasc. Surg.**, v.84, p.267-81, 1982.
- 25- CARPENTIER, A.; DELOCHE, A.; RELLAND, J.; FABIANI, J.N.; FORMAN, J.; CAMILLERI, J.P.; SOYER, R. ; DUBOST, C. Six year follow-up of glutaraldehyde preserved heterografts with particular reference to the treatment of congenital valve malformations. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.68, p.771-82, 1974.
- 26- IONESCU, M.I.; PAKRASHI, B.C.; MARY, D.A.S. Long-term evaluation of tissue valves. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.68, p.361-79, 1974.
- 27- IONESCU, M.I.; TANDON, A.P.; MARY, D.; ABID, A. Heart valve replacement with the Ionescu–Shiley pericardial xenograft. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.73, p.31-42, 1977.

- 28- IONESCU, M.I.; TANDON, A.P. The Ionescu-Shiley pericardial xenograft heart valve. In: IONESCU, M.I.; ed. **Tissue Heart Valves**. London, Butterworth, 1979. p.201-52.
- 29- BRAILE, D.M.; ARDITO, R.V.; GRECO, O.T.; LORGA, A.M. IMC bovine pericardial valve: 11 years. **J. Card. Surg.**, v.6, p.580-8, 1991. Supplement.
- 30- BRAILE, D.M.; ZAIANTCHICK, M.; SOUZA, D.R.S. Prótese de pericárdio bovino PB IMC: 11 anos em posição mitral. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.59, p.13-21, 1992.
- 31- POMERANTZEFF, P.M.A.; BRANDÃO, C.M.A.; CAUDURO, P.; PUIG, L.B.; GRINBERG, M.; TARASOUTCHI, F.; CARDOSO, L.F.; LERNER, A.; STOLF, N.A.G.; VIRGINELLI, G.; JATENE, A.D. Fisis-Incor bovine pericardial bioprotheses: 15 year results. **Heart Surg. Forum**, v.1, p.130-5, 1998.
- 32- LEVY, R.J. Glutaraldehyde and the calcification mechanism of bioprosthetic heart valves. [Editorial]. **J. Heart Valve Dis.**, v. 3, p.101-4, 1994.

- 33- WOODROOF, E.A. The chemistry and biology of aldehyde treated tissue heart valve xenograft. In: IONESCU, M.I., ed. **Tissue Heart Valves**. London, Butterworth, 1979. p.347-62.
- 34- HUGHES, H.; LILBURN, S.; TRIPTON, S.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; DURAN, C.M.G. Chemical assay of glutaraldehyde incorporation into pericardial tissue. **J. Heart Valve Dis.**, v.3, p.105-10, 1994.
- 35- COLOMB, G.; SCHOEN, F.J.; SMITH, M.S.; LINDEN, J.; DIXON, M.; LEY, R.J. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprotheses. **Am. J. Pathol.**, v. 127, p.122-30, 1987.
- 36- GRABENWÖGER, M.; SIDER, J.; FITZAL, F.; ZELENKA, C.J.; WINDRERGER, U.; GRIMM, M.; MORITZ, A.; BÖCK, P.; WOLNER, E. Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 62, p.772-7, 1996.
- 37- VICENTELLI, A.; LATRÉMOUILLE, C.; ZEGDI, R.; SHEN, M.; LAJOS, P.S.; CHACHQUES, J.C.; FABIANI, J. Does glutaraldehyde induce calcification of bioprosthetic tissues? **Ann. Thorac. Surg.**, v, 66, p.255-8, 1998. Supplement.

- 38- EBYL, E.; GRIESMACHER, A.; GRIM, M.; WOLNER, E. Toxic effects of aldehydes released from fixed pericardium on bovine aortic endothelial cells. **J. Biomed. Res.**, v.23, p.1355-65, 1989.
- 39- SCHOEN, F.J.; HIRSCH, D.; BIANCO, R.W.; LEVY, R.J. Onset and progression of calcification in porcine aortic bioprosthetic valves implanted as orthotopic mitral valve replacements in juvenile sheep. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.108, p.880-7, 1994.
- 40- ROE, S.C.; MILTHORPE, B.K.; SCHINDHELM, K. Collagen cross-linking and resorption: effect of glutaraldehyde concentration. **Artif. Organs.**, v.14, p.443-7, 1990.
- 41- MIRZAIE, M.; MEYER, T.; SCHWARTZ, P.; DALICHAU, H. Preimplant ultrastructure and calcification tendency of various biological aortic valves. **J. Heart Valve Dis.**, v.9, p.576-82, 2000.
- 42- GROBE, A.C.; CHEUNG, D.T.; LUO, H.H.; SHOMURA, Y.; MARCHION, D.C.; PFAU, J.C.; DURAN, C.M.G. A study of the junction between glutaraldehyde-treated allogenic aorta and host aorta. **J. Heart Valve Dis.**, v.9, p.570-5, 2000.

- 43- FERRANS, V.J.; SPRAY, T.L.; BILLINGHAM, M.E.; ROBERTS, W.C.
Structural changes in glutaraldehyde-treated porcine heterografts
used as substitute cardiac valves. **Am. J. Cardiol.**, v.41, p.1159-84,
1978.
- 44- GRABENWÖGER, M.; GRIMM, M.; EBYL, E.; KADLETZ, M.; HAVEL,
M.; KÖSTLER, P. New aspects of degeneration of bioprosthetic
heart valves after long-term implantation. **J. Thorac. Cardiovasc.
Surg.**, v.104, p.14-21, 1992.
- 45- EBYL, E.; GRIMM, M.; GRABENWÖGER, M.; BÖCK, P.; MÜLLER,
M.M.; WOLNER, E. Endothelial Cell Lining of Bioprosthetic heart
valve materials. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.104, p.763-9,
1992.
- 46- ZILLA, P.; VON OPELL, U.; DEUTSCH. The endothelium: a key to the
future [Review]. **J. Card. Surg.**, v.8, p.32-60, 1993.
- 47- SIMON, A.; WILHELMI, M.; STEINHOFF, G.; HARRINGER, W.;
BRÜCKE, P.; HAVERICH, A. Cardiac valve endothelial cells:
relevance in the long-term function of biologic valve prostheses. **J.
Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.116, p.607-16, 1998.

- 48- ISHIHARA, T.; FERRANS, V.J.; JONES, M.; BOYCE, S.W.; ROBERT, W. Occurrence and significance of endothelial cells in implanted porcine bioprosthetic valves. **Am. J. Cardiol.**, v.48, p.443-454, 1981.
- 49- GRIMM, M.; EBYL, E.; ING, D.; GRABENWÖGER, M.; GRIESMACHER, A.; LOSERT, U.; BÖCK, P.; MÜLLER, M.M.; WOLNER, E. Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.102, p.195-201, 1991.
- 50- SCHOEN, F.J. Future directions in tissue heart valves: impact of recent insights from biology and pathology. **J. Heart Valve Dis.**, v.8, p.350-8, 1999.
- 51- DURBIN, A.D.; GOTLIEB, A.I.. Advances towards understanding heart valve response to injury. **Cardiovasc. Pathol.**, v.11, p.69-77, 2002.
- 52- FISCHLEIN, T.; LEHNER, G.; LANTE, W.; FITTKAU, M.; MURPHY, J.G.; WEINHOLD, C.H. Endothelialization of cardiac valve bioprostheses. **Int. J. Artif. Organs.**, v.17, p.345-52, 1994.

- 53- O'BRIEN, M.F.; GOLDSTEIN, S.; WALSH, S.; BLACK, K.S.; ELKINS, R. The synergraft valve: a new acellular (nonglutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental study before clinical implantation. **Sem. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.11, p.194-200, 1999. Supplement 1.
- 54- BENGTTSSON, L.A.; PHILLIPS, R.; HAEGERSTRAND, A.N. In vitro endothelialization of photooxidatively stabilized xenogeneic pericardium. **Ann. Thorac. Surg.**, v.60, p.365-8, 1995.
- 55- BADER, A.; SCHILLING, T.; TEEBKEN, O.E.; BRANDES, G.; HERDEN, T.; STEINHOFF, G. Tissue engineering of heart valves – human endothelial seeding of detergent acellularized porcine valves. **Eur. J. Cardio-thorac Surg.**, v.14,p.279-84, 1998.
- 56- LEUKAUF, C.; SZELES, C.; SALAYMEH, L.; GRIMM, M.; GRABENWÖGER, M.; LOSERT, U. In vitro and in vivo endothelialization of glutaraldehyde treated bovine pericardium. **J. Heart Valve Dis.**, v.2, p.230-5, 1993.

- 57- JANSSON, K.; BENGTSSON, L.; SWEDENBORG, J.;
HAEGERSTRAND, A. In vitro endothelialization of bioprosthetic heart valves provides a cell monolayer with proliferative capacities and resistance to pulsatile flow. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.121, p.108-15, 2001.
- 58- MORITZ, A.; GRIMM, A.; ERYL, E.; GRABENWÖGER, M.;
GRABENWÖGER, F.; BÖCK, P.; WOLNER, E. Improved spontaneous endothelialization by postfixation treatment of bovine pericardium. **Eur. J. Cardio-thorac. Surg.**, v. 5, p.155-60, 1991.
- 59- FRATER, R.W.M.; GONG, G.; HOFFMAN, D.; LIAO, K. Endothelial covering of biological artificial heart valves. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 53, p.371-2, 1992.
- 60- LIAO, K.; GONG, G.; HOFFMAN, D.; SEIFTER, E.; FACTOR, S.M.;
MACALUSO, F.; FRATER, R.W.M. Spontaneous host endothelial growth on bioprosthetic valves and its relation to calcification. **Eur. J. Cardio-thorac. Surg.**, v.7, p.591-6, 1993.
- 61- ZHANG, Z.; DONG, H.; LIU, J.; WANG, W.; HU, B. Vascular endothelial growth factor gene transfer improves host endothelialization of xenogenic biologic heart valve in vivo. **Chin. Med. J.**, v. 115, p.878-83, 2002.

- 62- PHILOGENESIS INC. **Corograft®: nova geração de enxertos com preservação não-aldeídica.** Monrovia, 2002. 4p.
- 63- BAYNE, K. Revised guide for the care and use of laboratory animals available. **The Physiologist.**, v.3, p.205-11, 1996.
- 64- ORTIZ, J.; SILVA, C.E.S.; GHEFTER, C.G.M.; TATANI, S.B.; GIL, M.A.; LEAL, S.M.B.; FERREIRA, L.D.C.; CORDOVIL, A. **O ecocardiograma no apoio à decisão clínica.** 2ed. São Paulo, Revinter, 1997. 281p.
- 65- CARPENTIER, A.; LEMAIGRE, G.; ROBERT, L.; CARPENTIER, S.; DUBOST, C. Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 58, p. 467-82, 1969.
- 66- GALUMBECK, M.A.; RATZ, P.H. Functional integrity of vascular allografts after endothelial removal. **J. Vasc. Res.**, v. 32, p. 120-8, 1995.
- 67- HUMAN, P.; ZILLA, P. Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 71, p.385-8, 2001. Supplement.

- 68- SCHUSSLER, O.; SHEN, M.; SHEN, L.; CARPENTIER, S.; KAVERI, S.; CARPENTIER, A. Effect of human immunoglobulins on the immunogenicity of porcine bioprostheses. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 71, p. 396-400, 2001. Supplement.
- 69- CARPENTIER, A.; NASHEF, A.; CARPENTIER, S.; AHMED, A.; GOUSSEF, N. Techniques for prevention of calcification of valvular bioprostheses. **Circulation**, v. 70, p. 165-8, 1984. Supplement.
- 70- SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Heart valve bioprostheses: antimineralization. **Eur. J. Cardio-thorac. Surg.**, v. 6, p. 91-4, 1992. Supplement.
- 71- CUNANAN, C. M.; CABILING, C. M.; DINH, T. T.; SHEN, S.; TRAN-HATA, P.; RUTLEDGE, J. H. III; FISHBEIN, M.C. Tissue characterization and calcification potential of commercial bioprosthetic heart valves. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 71, p. 417-21, 2001. Supplement.
- 72- DUARTE, I. G.; MACDONALD, M. J.; COOPER, W. A.; SCHMARKEY, S. L.; GOTT, J. P.; BROWN, W. M. III; VINTEN-JOHANSEN, J.; GUYTON, R.A. In vivo hemodynamic, histologic, and antimineralization characteristics of the mosaic bioprosthesis. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 71, p. 92-9, 2001.

- 73- OZAKI, S.; HERIJGERS, P.; VERBEKEN, E.; LOMMEL, A. V.; NISHIDA, T.; PEREK, B.; ZIETKIEWICZ, M.; LEUNENS, V.; FLAMENG, W. The influence of stenting on the behavior of amino-oleic acid-treated, glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves in a sheep model. **J. Heart Valve Dis.**, v. 9, p. 552-60, 2000.
- 74- DAHM, M.; PRUFER, D.; MAYER, E.; HAFNER, G.; GROH, E., OELERT, H. Effects of surface seeding with vital cells on the calcium uptake of biological materials for heart valve replacement. **J. Heart Valve Dis.**, v. 5, p. 148-51, 1996.
- 75- SODIAN, R.; HOERSTRUP, S. P.; SPERLING, J. S.; DAEBRITZ, S. H.; MARTIN, D.P.; SCHOEN, F.J.; VACANTI, J.P.; MAYER, J. E. Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 70, p. 140-4, 2000.
- 76- KIM, W. G.; CHO, S. K.; KANG, M. C.; LEE, T. Y.; PARK, J.K. Tissue-engineered heart valve leaflets: an animal study. **Int. J. Artif Organs**, v. 24, p. 642-8, 2001.
- 77- ZUND, G.; BREUER, C. K.; SHINOKA, T.; MA, P. X.; LANGER, R.; MAYER, J. E.; VACANTI, J.P. The in vitro construction of a tissue engineered bioprosthetic heart valve. **Eur. J. Cardio-thorac. Surg.**, v. 11, p. 493-7, 1997.

- 78- STOCK, U. A.; NAGASHIMA, M.; KHALIL, P. N.; NOLLERT, G. D.;
HERDEN, T.; SPERLING, J. S.; MORAN, A.; LIEN, J.; MARTIN, D.
P.; SCOEN, F.J.; VACANTI, J.P.; MAYER, J.E. Tissue-engineered
valved conduits in the pulmonary circulation. **J. Thorac.
Cardiovasc. Surg.**, v. 119, p. 732-40, 2000.
- 79- HOERSTRUP, S.P.; KADNER, A.; BREYMAN, C.; MAURUS, C. F.;
GUENTER, C. I.; SODIAN, R.; VISJAGER, J. F.; ZUND, G.;
TURINA, M.I. Living, autologous pulmonary artery conduits tissue
engineered from human umbilical cord cells. **Ann. Thorac. Surg.**, v.
74, p. 46-52, 2002.
- 80- VACANTI, J.P.; LANGER, R. Tissue engineering: the design and
fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction
and transplantation. **Lancet**, v. 354, p. 32-4, 1999. Supplement.
- 81- SHINOKA, T.; BREUER, C.K.; TANEL, R. E.; ZUND, G.; MIURA, T.;
MA, P. X.; LANGER, R.; VACANTI, J. P.; MAYER, J. E., Jr. Tissue
engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb
model. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 60, p. 513-6, 1995. Supplement.

- 82- SHINOKA, T.; MA, P. X.; SHUM-TIM, D.; BREUER, C.K.; CUSICK, R. A.; ZUND, G.; LANGER, R.; VACANTI, J. P.; MAYER, J. E., Jr. Tissue-engineered heart valves: autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. **Circulation**, v. 94, p. 64-8, 1996. Supplement.
- 83- SHINOKA, T.; SHUM-TIM, D.; MA, P.X.; TANEL, R.E.; LANGER, R.; VACANTI, J.P.; MAYER, J. E. Tissue-engineered heart valve leaflets: does cell origin affect outcome? **Circulation**, v. 96, p. 102-7, 1997. Supplement.
- 84- SHINOKA, T.; SHUM-TIM, D.; MA, P.X.; TANEL, R.E.; ISOGAI, N.; LANGER, R.; VACANTI, J.P.; MAYER, J.E., Jr. Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 115, p. 536-46, 1998.
- 85- ELKINS, R.C.; DAWSON, P.E.; GOLDSTEIN, S.; WALSH, S.P.; BLACK, K. S. Decellularized human valve allografts. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 71, p. 428-32, 2001. Supplement.

- 86- KOROSSIS, S.A.; BOOTH, C.; WILCOX, H.E.; WATTERSON, K. G.; KEARNEY, J.N.; FISHER, J.; INGHAM, E. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. **J. Heart Valve Dis.**, v. 11, p. 463-71, 2002.
- 87- WILSON, G.J.; COURTMAN, D.W.; KLEMENT, P.; LEE, J.M.; YEGER, H. Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 60, p. 353-8, 1995. Supplement.
- 88- CLARKE, D.R.; LUST, R.M.; SUN, Y.S.; BLACK, K.S.; OLLERENSHAW, J.D. Transformation of nonvascular acellular tissue matrices into durable vascular conduits. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 71, p. 433-6, 2001. Supplement.
- 89- DOHMEN, P.M.; YPERMAN, J.; FLAMENG, W.; KONERTZ, W. Hemodynamic evaluation of a tissue engineered valve prostheses. **Artif. Organs**, v. 25, p. 843, 2001.
- 90- DOHMEN, P.M.; COSTA, F.D.A.; COSTA, I.S.E.A.; KONERTZ, W. Valvas cardíacas obtidas por engenharia de tecidos: a mais nova geração de próteses biológicas. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 79, p. 555-9, 2002.

- 91- COSTA, F.D.A.; DOHMEN, P.; LOPES, S.V.; LACERDA, G.; POHL, F.; VILANI, R.; COSTA, M.B.A.; VIEIRA, E.D.; BROFMAN, P.; KONERTZ, W.; COSTA, I.A. Estudo experimental com homoenxertos valvares descelularizados: a prótese do futuro. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v.18, p. 82, 2003.[Apresentado no 30º Congresso Nacional de Cirurgia Cardíaca, Goiânia, 2003].
- 92- SIMON, P.; KASIMIR, M.T.; SEEBACHER, G.; WEIGEL, G.; ULLRICH, R.; SALZER-MUHAR, U.; RIEDER, E.; WOLNER, E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve Synergraft™ in pediatric patients. **Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.**, v.23, p.1002-6, 2003.
- 93- PRESTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4ed. Porto, Fundação Calaouste Gulbenkian, 1995. p.646-7: polietilenoglicóis.
- 94- PRESTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4ed. Porto, Fundação Calaouste Gulbenkian, 1995. p.1699-1700: polietilenoglicóis.
- 95- UNICAMP. **PEG – 150 diesterato, polietilenoglicol**. Campinas, 2003. Disponível em: URL:<http://pcserver.iqm.unicamp.br/~wioh/cursos/qg661/trabalho20.html>.

- 96- BANDEIRANTE QUÍMICA LTDA. **Polietilenoglicol E 400**. Mauá, 1999.
Disponível em: URL:[http://www.bandeirantequimica.com.br/](http://www.bandeirantequimica.com.br/produtos/polietilenoglicol.htm)
produtos /polietilenoglicol.htm.
- 97- PISKIN, E.; PISKIN, K.; CAKMALLI, C. ; EVREN, V. ; MUTLU, M. ;
ARCA, E. Preparation of polyethyleneglycol (PEG) coatings for
microencapsulation of charcoal. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 10,
p.183-92, 1984.
- 98- WICOMB, W.N.; PEREY, R.; PORTNOY, V.; COLLINS, G. M. The role
of reduced glutathione in heart preservation using a polyethylene
glycol solution, cardisol. **Transplantation**, v. 54, p. 181-2, 1992.
- 99- WICOMB, W.N.; HILL, D.J.; COLLINS, G.M. Twenty-four-hour ice
storage of rabbit heart. **J. Heart Lung Transplant.**, v. 13, p. 891-4,
1994.
- 100- WICOMB, W.N.; HILL, J.D.; AVERY, J.; COLLINS, G.M. Optimal
cardioplegia and 24-hour heart storage with simplified UW solution
containing polyethylene glycol. **Transplantation**, v. 49, p.261-4,
1990.

- 101- BHAYANA, J. N.; TAN, Z.T.; BERGSLAND, J.; BALU, D.; SINGH, J.K.;
HOOVER, E.L. Beneficial effects of flusol-polyethylene glycol
cardioplegia on cold, preserved rabbit heart. **Ann. Thorac. Surg.**,
v.63, p.459-64, 1997.
- 102- BANKER, M.C.; LAYNE, J.R.; HICKS, G.L., Jr.; WANG, T. Freezing
preservation of the mammalian heart explant. III. Tissue dehydration
and cryoprotection by polyethylene glycol. **J. Heart Lung
Transplant.**, v.11, p.619-23, 1992.
- 103- COLLINS, G.M.; WICOMB, W.N.; LEVIN, B.S. Heart preservation
solution containing polyethyleneglycol: an immunosuppressive
effect? **Lancet**, v.338, p.890-1, 1991.
- 104- TOKUNAGA, Y.; WICOMB, W.N.; KENNEDY, R.G.; ESQUIVEL, C.D.;
COLLINS, G.M. The immunosuppressive effect of polyethylene
glycol in a flush solution for rat liver transplantation.
Transplantation, v.54, p.756-8, 1992.
- 105- FISCHLEIN, T.; FASOL, R. In vitro endothelialization of bioprosthetic
heart valves. **J. Heart Valve Dis.**, v. 5, p. 58-65, 1996.

- 106- EBERL, T.; SIEDLER, S.; SCHUMACHER, B.; ZILLA, P.; SCHLAUDRAFF, K.; FASOL, R. Experimental in vitro endothelialization of cardiac valve leaflets. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 53, p. 487-92, 1992.
- 107- BENGTTSSON, L.; RAGNARSON, B.; HAEGERSTRAND, A. Lining of viable and nonviable allogeneic and xenogeneic cardiovascular tissue with cultured adult human venous endothelium. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 106, p. 434-43, 1993.
- 108- BENGTTSSON, L.A.; HAEGERSTRAND, A.N. Endothelialization of mechanical heart valves in vitro with cultured adult human cells. **J. Heart Valve Dis.**, v. 2, p. 352-6, 1993.
- 109- MACGREGOR, D.C.; WILSON, G.J.; SCULLY, H.E.; LIXFELD, W.; PILLIAR, R.M.; SILVER, M.D. Improved thromboresistance of mechanical heart valves with endothelialization of porous metal surfaces. **Surg. Forum**, v. 30, p. 239-41, 1979.
- 110- GROSS, J.M. Calcification of bioprosthetic heart valves and its assessment.[Editorial]. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 121, p. 428-30, 2001.

- 111- LEHNER, G.; FISCHLEIN, T.; BARETTON, G.; MURPHY, J.G.;
REICHART, B. Endothelialized biological heart valve prostheses in
the non-human primate model. **Eur. J. Cardio-thorac Surg.**, v. 11,
p. 498-504, 1996.

9 **BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

CUNHA, A.C. **Estrutura e apresentação de dissertações e teses.** 2.ed.

São Paulo, Serviço de biblioteca e documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1996. 88p.

FERNANDES, F.; LUFT, C.P.; GUIMARÃES, F.M. **Dicionário brasileiro.**

56.ed. São Paulo, Globo, 2003.

FERREIRA, A.B.H. **Novo dicionário Aurélio da língua portuguesa.** 2.ed.

Rio de Janeiro, Nova Fronteira, 1986. 1838p.

ROSNER, B. **Fundamentals of biostatistics.** 2.ed. Massachussets, PWS

Publishers, 1986. p. 326-32.

ROSNER, B. **Fundamentals of biostatistics.** 2.ed. Massachussets, PWS

Publishers, 1986. p. 343-48.

ROTHER, E.T.; BRAGA, M.E.R. **Como elaborar sua tese: estrutura e**

referências. São Paulo, 2001. 86p.