

HELMGTON JOSÉ BRITO DE SOUZA

**SUBSTITUIÇÃO DO TRONCO DA ARTÉRIA
PULMONAR EM CARNEIROS, UTILIZANDO
HETEROENXERTO TUBULAR VALVADO,
PRESERVADO EM *L-Hydro*^R**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**São Paulo
2011**

HELMGTON JOSÉ BRITO DE SOUZA

**SUBSTITUIÇÃO DO TRONCO DA ARTÉRIA
PULMONAR EM CARNEIROS, UTILIZANDO
HETEROENXERTO TUBULAR VALVADO,
PRESERVADO EM *L-Hydro*^R**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

Orientador: Prof. Dr. Ênio Buffolo

Co-Orientadores: Prof. Dr. José Honório de Almeida Palma

Dr. Diego Felipe Gaia dos Santos

São Paulo

2011

Souza, Helmgton José Brito de.

Substituição do tronco da artéria pulmonar em carneiros, utilizando heteroenxerto tubular valvado, preservado em *L-Hydro*^R./Helmgton

José Brito de Souza. -- São Paulo, 2011.

xvii,118f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós Graduação em Cirurgia Plástica, com ênfase em Cirurgia Cardiovascular

Título em inglês: Replacing the body of pulmonary artery in sheep using tubular graft valved bovine pericardium with non aldehydic preservation.

1. Bioprótese
2. Valvas
3. Cirurgia Cardíaca
4. Polietilenoglicol
5. Glutaraldeído

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA PLÁSTICA, COM ÊNFASE EM CIRURGIA
CARDIOVASCULAR**

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

Dedicatória

Ao meu pai, **Hélio**, exemplo de honradez e dignidade;

À minha mãe, **Mamédia**, que, através do seu **AMOR** mostrou-me o caminho da vitória com determinação e perseverança;

À **Estrella** da minha Vida, **Lu**, que me ensinou o real sentido da palavra
AMAR;

À nossa pequenina **Estrella**, **Bia**, que nos ensina quão simples, natural e sincero é dizer - **EU TE AMO.**

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. ÊNIO BUFFOLO**, meu orientador, PROFESSOR TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA CARDIOVASCULAR DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA - UNIFESP, exemplo de liderança, firmeza e sabedoria, responsável pela formação e aperfeiçoamento de uma legião de cirurgiões espalhados pelo país, cujo nome e legado já figuram dentre os principais mestres do nosso tempo.

Ao **Prof. Dr. JOSÉ HONÓRIO DE ALMEIDA PALMA DA FONSECA**, PROFESSOR ADJUNTO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA CARDIOVASCULAR DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA - UNIFESP, exemplo de inventividade e dedicação, meu sincero agradecimento pelo privilégio de conviver e aprender com seu carisma, habilidade, experiência e humildade.

Ao **Prof. Dr. IVAN SÉRGIO JOVIANO CASAGRANDE**, exemplo de perseverança, pioneirismo e espírito científico, cujo apoio foi essencial para a realização deste estudo no Centro de Pesquisas da LABCOR - Minas Gerais.

Aos amigos **JORGE FERREIRA, RUBEM JUNQUEIRA e KLEUDER LEÃO**, que incentivaram e viabilizaram a realização deste projeto.

Às sempre colaboradoras **LAILA OLIVEIRA e DANIELA LACERDA**, bem como os ex-membros da minha equipe cirúrgica, **RILSON MOITINHO, MARILENE PINHEIRO e JEANE FORTUNA**, pela compreensão nos momentos de ausência. Meus sinceros agradecimentos.

À equipe do Centro de Pesquisas da LABCOR: **PATRÍCIA DODD** - veterinária, aos técnicos **MARISA** e **LEANDRO** e aos colaboradores **BEATRIZ** e **VADI**, pelo exemplo de profissionalismo durante o período de realização do estudo.

Aos amigos da Disciplina de Cirurgia Cardiovascular da **UNIFESP - Escola Paulista de Medicina**, residentes, instrumentadores e perfusionistas, demais profissionais técnicos e administrativos, pela receptividade e hospitalidade no período de participação nas atividades da disciplina.

Aos professores da Disciplina de Cirurgia Cardiovascular da UNIFESP - Escola Paulista de Medicina: **Prof. Dr. ROBERTO CATANI**, **Prof. Dr. JOÃO NELSON RODRIGUES BRANCO**, **Prof. Dr. MIGUEL MALUF**, **Prof. Dr. WALTER GOMES**, **Dr. CARLOS TELES**, **Dr. DIEGO GAIA**, pelo apoio e contribuição no período de convívio nas atividades da disciplina.

Aos **Drs. NELSON AMERICO HOSSNE JUNIOR** e **HEITOR FRANCISCO DE CARVALHO GOMES** pelas cuidadosas e valorosas contribuições feitas no texto dessa tese, assim como na apresentação.

Ao **Dr. SÉRGIO CAMPO CHRISTO**, pelo apoio na realização dos procedimentos cirúrgicos.

Ao **Dr. LUÍZ SÉRGIO ALVES-SILVA**, pela criteriosa e caprichosa análise estatística dos dados desta tese.

Ao **Dr. MARCO ANTÔNIO CARDOSO DE ALMEIDA**, pela contribuição inestimável na reavaliação do estudo anátomo-patológico.

À equipe técnica do CEPED: **HELENA ALVES, GEÍSA MELO, DJAVÃ MARTINS, BÁRBARA ARAÚJO, RITA DE CASSIA DANTAS**, pela operacionalização da técnica de dosagem de cálcio por absorção atômica.

À **Prof^a. ELZA SANTOS SILVA**, pelo carinho na avaliação e correção ortográfica e gramatical desta tese.

Aos colegas e companheiros da **CARDIOTÓRAX**, COOPERATIVA DOS CIRURGIÕES CARDIOVASCULARES E TORÁDICOS DO ESTADO DA BAHIA, pelo estímulo à defesa profissional, pelo exemplo de união, maturidade e compromisso com a ética e o exercício digno da “ARTE DE CURAR”.

Aos médicos, abaixo nomeados, que, cronologicamente, desde os primeiros anos de academia, na permanente busca pelo saber, contribuíram para minha formação e desenvolvimento profissional: **ÁLVARO FERNANDO SILVA, MARCELO DANILLO DA COSTA LAGO, SEBASTIÃO HELDENIR DE MESQUITA JÚNIOR, PAULO FERNANDO DA GLÓRIA LEAL, LUCIANO ESPINHEIRA FONSECA JÚNIOR, JOSÉ SIQUEIRA, WELLINGTON FREITAS, ANIBAL SILVANY FILHO, GERALDO MILTON DA SILVEIRA, SÉRGIO MIES, ANDRÉ BEAR JÚNIOR, GUILHERME SCHETTINO, JOÃO PLÍNIO DE SOUZA, PAULO MASSAROLO, JOSÉ ANTÔNIO DE ALMEIDA SOUZA, ALBINO EDUARDO NOVAES, HEONIR DE JESUS P. ROCHA, RODOLFO DOS SANTOS TEIXEIRA, EUVALDO ROSA, ANTÔNIO JOSÉ DE SOUZA MACHADO, EDIRIOMAR PEIXOTO , RICARDO ELOY PEREIRA, NADJA**

**KRAYCHETE, RICARDO BARROS CORSO, LAUDELINO SOUSA
FILHO, MARCOS LUCIANO PARREIRA GOULART , NILZO
AUGUSTO M. RIBEIRO, JORGE PEREIRA, LÍCIA CAVALCANTE,
OTÁVIO MARAMBAIA, CELSO FIGUEROA, RICARDO FERRAZ,
ANDRÉ NEY M. FREIRE, IVAN SÉRGIO JOVIANO
CASAGRANDE, ÊNIO BUFFOLO, JOSÉ HONÓRIO DE ALMEIDA
PALMA.**

EPÍGRAFE

Viva!

Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe
e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é "muito" pra ser insignificante.

Já perdoei erros quase imperdoáveis,
tentei substituir pessoas insubstituíveis
e esquecer pessoas inesquecíveis.

Já fiz coisas por impulso,
já me decepcionei com pessoas quando nunca pensei me decepcionar,
mas também decepcionei alguém.

Já abracei pra proteger,
já dei risada quando não podia,
fiz amigos eternos,
amei e fui amado,
mas também já fui rejeitado,
fui amado e não amei.

Já gritei e pulei de tanta felicidade,
já vivi de amor e fiz juras eternas,
"quebrei a cara muitas vezes"!

Já chorei, ouvindo música e vendo fotos,
já liguei só para escutar uma voz,
me apaixonei por um sorriso,
já pensei que fosse morrer de tanta saudade
e tive medo de perder alguém especial (e acabei perdendo).

Mas vivi, e ainda vivo!
Não passo pela vida...
E você também não deveria passar!

Charles Chaplin

SUMÁRIO

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Epígrafe	ix
Listas	xi
Resumo	xvii
1. Introdução	1
2. Objetivos	17
3. Métodos	19
4. Resultados	42
5. Discussão	70
6. Conclusões	78
7. Referências	80
8. Normas adotadas	100
9. Abstract	102
10. Anexos	103

Lista de Figuras

FIGURA 1:	Tubo valvado de pericárdio bovino, com cúspides de pericárdio porcino, preservado em <i>L-Hydro</i> ^R	14
FIGURA 2:	Aspecto cirúrgico final pós cirurgia de implante de prótese (Grupos <i>L-Hydro</i> ^R e Glutaraldeído)	44
FIGURA 3:	Verificação hemodinâmica (pós implante e antes do sacrifício)	45
FIGURA 4:	PMVD - Grupos <i>L-Hydro</i> ^R e Glutaraldeído (pós implante)	46
FIGURA 5:	PMAP - Grupos <i>L-Hydro</i> ^R e Glutaraldeído (pós implante)	46
FIGURA 6:	Gradiente (VD-AP) - Grupos <i>L-Hydro</i> ^R e Glutaraldeído (pós implante)	47
FIGURA 7:	PSAP ₁ X PSAP ₂ - Grupo <i>L-Hydro</i> ^R	47
FIGURA 8:	PSAP ₁ X PSAP ₂ - Grupo Glutaraldeído	48
FIGURA 9:	PMVD ₁ X PMVD ₂ - Grupo <i>L-Hydro</i> ^R	48
FIGURA 10:	PMVD ₁ X PMVD ₂ - Grupo Glutaraldeído	49
FIGURA 11:	Gradiente VD-AP ₁ X Gradiente VD-AP ₂ - Grupo <i>L-Hydro</i> ^R	50
FIGURA 12:	Gradiente VD-AP ₁ X Gradiente VD-AP ₂ - Grupo Glutaraldeído.....	50
FIGURA 13:	Média da PAM - Grupos <i>L-Hydro</i> ^R e Glutaraldeído	51
FIGURA 14:	Média da PCP - Grupos <i>L-Hydro</i> ^R e Glutaraldeído .	51
FIGURA 15:	Média do DCM - Grupos <i>L-Hydro</i> ^R e Glutaraldeído	52

FIGURA 16: Aspecto radiológico de próteses preservada em <i>L-Hydro^R</i>	58
FIGURA 17: Aspecto radiológico de próteses preservada em Glutaraldeído	58
FIGURA 18: Aspecto macroscópico das próteses (Grupo <i>L-Hydro^R</i>) pós explante	62
FIGURA 19: Aspecto macroscópico das próteses (Grupo Glutaraldeído) pós explante	63
FIGURA 20: Aspecto macroscópico das próteses (Grupo <i>L-Hydro^R</i>) pós explante - Aderência parcial de cúspides à parede do tubo	63
FIGURA 21: Aspecto macroscópico das próteses (Grupo <i>L-Hydro^R</i>) pós explante - Aderência total de cúspides à parede do tubo	64
FIGURA 22: Aspecto microscópico das próteses - Grupo <i>L-Hydro^R</i> - Coloração por hematoxilina-eosina	65
FIGURA 23: Aspecto microscópico das próteses - Grupo <i>L-Hydro^R</i> - Coloração por hematoxilina-eosina	66
FIGURA 24: Aspecto microscópico das próteses - Grupo <i>L-Hydro^R</i> - Coloração por hematoxilina-eosina	66
FIGURA 25: Aspecto microscópico das próteses - Grupo Glutaraldeído - Coloração por hematoxilina-eosina	67

Lista de Tabelas

TABELA 1:	Medidas hemodinâmicas - sacrifício	52
TABELA 2:	Medidas hemodinâmicas - sacrifício	53
TABELA 3:	Análise estatística - variáveis quantitativas (hemodinâmica)	54
TABELA 4:	Contratilidade do VD e obstrução da VSVD pela angiografia	56
TABELA 5:	Estenose da valva pulmonar e da AP pela angiografia	57
TABELA 6:	Refluxo valvar pulmonar e refluxo tricúspide por angiografia	57
TABELA 7:	Mensuração de calcificação (mamografia)	59
TABELA 8:	Análise estatística mamografia (Grupos <i>L-Hydro^R</i> e Glutaraldeído)	60
TABELA 9:	Mensuração de calcificação (macroscopia)	61
TABELA 10:	Análise estatística macroscopia (Grupos <i>L-Hydro^R</i> e Glutaraldeído)	62
TABELA 11:	Mensuração de calcificação (microscopia)	65
TABELA 12:	Análise estatística microscopia (Grupos <i>L-Hydro^R</i> e Glutaraldeído)	68
TABELA 13	Dosagem de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica	69

Lista de abreviaturas e siglas

DATASUS	Banco de dados do Sistema Único de Saúde
PEG	Polietilenoglicol
HE	Hematoxilina-eosina
cm	centímetro
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
VE-Ao	Ventrículo esquerdo-Aorta (gradiente)
mm	milímetro
°C	Graus centígrados
SC	Subcutâneo
ml	mililitro
VO	Via oral
IV	Intravenoso
IM	Intramuscular
mg	miligrama
UI	Unidade Internacional
L/min	litros por minutos
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
O ₂	Oxigênio
g	grama
DC	Débito cardíaco
DCM	Débito cardíaco médio
PMVD	Pressão média de ventrículo direito
PMVD ₁	Pressão média de ventrículo direito (cirurgia de implante)
PMVD ₂	Pressão média de ventrículo direito (sacrifício)

VSVD	Via de saída de ventrículo direito
GRAD.	Gradiente
AAALAC	<i>American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEC	Circulação extracorpórea
mmHg	Milímetro de mercúrio
O ₂	Oxigênio
Gama GT	Gama glutamil transferase
VD-AP	Ventrículo direito - artéria pulmonar (gradiente)
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
F	<i>French</i>
CD	<i>Compact disc</i>
kV	kilowatt
HNO ₃	Ácido nítrico
ug	micrograma
mg/L	miligrama por litro
mcg/dL	micrograma por decilitro
g/dL	Gramas por decilitro
mm ³	milímetro cúbico
micromol/L	Micromol por litro
Kg	Kilograma
U/L	Unidades por litro
mEq/L	Miliequivalente por litro
PAM	Pressão de artéria pulmonar
PSAP	Pressão sistólica de artéria pulmonar
PSAP ₁	Pressão sistólica de artéria pulmonar (cirurgia de implante)

PSAP ₂	Pressão sistólica de artéria pulmonar (sacrifício)
PVC	Pressão venosa central
PO	Pós operatório
AD	Átrio direito
PCP	Pressão capilar pulmonar
mamog.	mamografia
CC	Centímetro cúbico
%	Porcento
O ₂ /Kg	Oxigênio por kilograma
CPK	Creatinofosfoquinase
SF	Solução Fisiológica
M	Mol
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Glutarald.	Glutaraldeído
nº	Número
<i>R</i>	Marca Registrada

RESUMO

Introdução: As biopróteses valvares cardíacas estão relacionadas a eventos tromboembólicos, infecciosos e degenerativos. Seu desgaste é atribuído principalmente à desnaturação do colágeno. O glutaraldeído, método predominante de preservação de biopróteses, favorece o processo de calcificação e limita sua durabilidade. Diversas técnicas tentam conter o processo degenerativo das biopróteses. **Objetivos:** Avaliar o processo de calcificação, *in vivo*, de heteroenxertos pulmonares valvados, preservados em meios não aldeídico (*L-Hydro^R*). **Métodos:** 17 carneiros foram submetidos à substituição do tronco da artéria pulmonar por enxerto tubular valvado de pericárdio bovino. Os animais foram distribuídos em dois grupos: Grupo *L-Hydro^R* (teste / n=14) e Grupo Glutaraldeído (controle / n=3). Cerca de 150 dias pós implante, foram realizadas angiografia, medidas hemodinâmicas e sacrifício. Os animais foram necropsiados e as próteses submetidas a estudo anátomo-patológico, avaliação radiológica e dosagem do cálcio por espectrofotometria de absorção atômica. A análise estatística foi obtida através dos testes exato de Fisher, T de Student ou Mann-Whitney (significância: 5%). **Resultados:** O desempenho hemodinâmico e angiográfico das próteses testadas foi semelhante nos dois grupos. A avaliação radiológica, a macroscopia, a microscopia e a dosagem de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica mostraram maior calcificação nas próteses do Grupo Glutaraldeído, quando comparadas às próteses do Grupo *L-Hydro^R* (p=0,001). 07 animais do Grupo *L-Hydro^R* (50%) apresentaram aderência das cúspides à parede do tubo (p=0,228). **Conclusões:** As próteses preservadas em *L-Hydro^R* mostraram-se mais resistentes à calcificação, quando comparadas às preservadas em Glutaraldeído.

INTRODUÇÃO

Introdução

Pacientes portadores de valvulopatia cardíaca, quando indicado o tratamento cirúrgico, convivem com um importante e delicado problema – a escolha do substituto valvar.

Sabe-se que o tratamento cirúrgico das valvulopatias reduz substancialmente a mortalidade, bem como proporciona a melhoria da qualidade de vida dos pacientes, quando comparado ao tratamento clínico. Os substitutos valvares existentes, entretanto, possuem limitações significativas. Pelo fato de serem tecidos estranhos ao organismo humano, as próteses valvares estão associadas aos riscos de complicações tromboembólicas, degenerativas e infecciosas (SODIAN *et al.*, 2000). Enquanto as próteses mecânicas, altamente trombogênicas, requerem terapia anticoagulante de longa duração, as próteses biológicas, sejam elas criopreservadas ou fixadas em glutaraldeído, apresentam limitação de durabilidade com disfunção progressiva causada principalmente pela degeneração tecidual.

De acordo com dados do ministério da saúde, através do banco de dados do DATASUS, foram realizadas no ano de 2009 no Brasil mais de 115 mil procedimentos em cirurgia cardiovascular. Destas, 10.090 cirurgias representaram troca de uma ou mais valvas cardíacas. No ano anterior (2008), este número atingiu 9.839 cirurgias de troca valvar. Em 2010 11.317 cirurgias de troca valvar foram realizadas. Até o mês de abril de 2011 as cirurgias de troca valvar já somam 3.757. Entre as opções de substitutivos valvares, as próteses mecânicas e as biológicas são, atualmente, mais acessíveis. A distribuição entre prótese mecânica e biológica é equilibrada. Aproximadamente 50 a 60% delas apresentarão algum tipo de problema nos primeiros dez anos de pós-operatório,

ocasionando reoperação ou morte (BLOOMFIELD *et al.*, 1991). Estima-se que o número de operações para substituição de valvas cardíacas triplique nas próximas cinco décadas (MOL *et al.*, 2009).

Os primeiros registros de tratamento das doenças valvares pela substituição cirúrgica das valvas doentes por próteses artificiais datam do final da sexta década do século passado. Assim, coube a LONG *et al.* (1959); BRAUNWALD *et al.* (1960); HARKEN *et al.* (1960); HUFNAGEL e CONRAD (1961); KAY *et al.* (1961); LILLEHEI *et al.* (1961); LITTLEFIELD e MULLER (1961) e STARR & EDWARDS (1961) divulgarem os primeiros relatos de sucesso dessa opção terapêutica.

A busca pela confecção de substitutivos valvares através de tecidos orgânicos tem sido alvo do estudo de vários autores ao longo dos últimos sessenta anos. Assim, TEMPLETON & GIBBON (1949) utilizaram pericárdio, ABSOLON *et al.* (1959) - diafragma, ARCHER (1965) - mesentério, LOUGHRIDGE *et al.* (1965) e GEHA *et al.* (1970) - tecido autógeno de reação ao aço ou silicone, SENNING (1966) e FLEGE *et al.* (1967) - fascia lata, FADALI *et al.* (1970) - peritônio e PUIG & VERGINELLI (1971) - dura mater.

Os primeiros registros de utilização de valvas heterólogas (porcos) datam de 1965 e foram concebidas por DURAN & GUNNING. BINET *et al.* (1965), e O'BRIEN & CLAREBROUGH (1966) foram os primeiros a utilizar valvas aórticas heterólogas (porcos ou bezerros) em humanos. Já CARPENTIER *et al.* (1967) e IONESCU *et al.* (1967) foram os

responsáveis pelas primeiras substituições de valva mitral utilizando valvas heterólogas.

Ainda na busca pelo substitutivo valvar ideal, MURRAY *et al.* (1956), MURRAY (1960), e BEALL *et al.* (1961), testaram o implante de valva aórtica homóloga na aorta descendente de pacientes com insuficiência aórtica. Tais resultados inspiraram ROSS (1962) a realizar a primeira substituição da valva aórtica humana por valva aórtica homóloga. O sucesso com esse procedimento, entretanto, foi obtido por BARRATT-BOYES (1964).

GEHA *et al.* (1967) propuseram a montagem prévia das valvas aórticas homólogas em suporte rígido metálico, como forma de reduzir a incidência de insuficiência aórtica pós operatória. WELDON *et al.* (1966 e 1967), FUCHS *et al.* (1967), ANGELL *et al.* (1967) e PALMA *et al.* (1988) utilizaram valva aórtica homóloga montada em suporte na substituição de valva mitral. BUFFOLO *et al.* (1973) utilizou valva aórtica homóloga montada em suporte metálico na substituição de valva aórtica ou mitral.

O grande desafio no tratamento cirúrgico das doenças valvares é a obtenção de um substitutivo capaz de oferecer qualidade de vida, segurança e durabilidade, a partir da confecção de biopróteses e a identificação de materiais (agentes) voltados à sua preservação, que garantam o bom funcionamento de sua estrutura, diminuindo a destruição e desarranjo das fibras do colágeno e, conseqüentemente, a incidência de calcificação dessas próteses (SODIAN *et al.*, 2000).

Atualmente, as opções geralmente recaem entre a prótese biológica ou mecânica. Em qualquer das situações, estão previstas vantagens e desvantagens que podem influenciar o resultado tardio e, portanto, o prognóstico a longo prazo.

Em se tratando de próteses mecânicas, a expectativa pela resolução definitiva da patologia cardíaca, sem a necessidade de reoperações, implica num rigoroso acompanhamento do paciente além da inconveniência e risco decorrente da anticoagulação definitiva.

Já no caso das próteses biológicas, o processo natural de desgaste e calcificação ao longo do tempo, impõe ao paciente a possibilidade da reoperação. O desgaste das biopróteses é atribuído a três fatores:

1. Reação imunológica: Observada pela presença de grandes focos de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos.
2. Reação inflamatória: Observada pelo aumento de eosinófilos e alterações degenerativas das fibras de colágeno;
3. Desnaturação do colágeno e elastina: Considerado o maior dos problemas biológicos nas próteses.

A utilização de homoenxertos nas substituições valvares possui vantagens e desvantagens semelhantes às biopróteses. Entretanto, a escassez de oferta destes enxertos, bem como a estrutura necessária à sua regular utilização, limita seu uso como opção de tratamento (SACKS *et al.*, 2009).

Os heteroenxertos, assim como os homoenxertos, requerem a aplicação de métodos de preservação que visam impedir a formação de anticorpos e tornar a matriz do tecido conjuntivo resistente à degradação (GABBAY *et al.*, 1988).

A degeneração das biopróteses valvares continua a figurar dentre os principais problemas envolvendo o tratamento de pacientes portadores de cardiopatias valvares. Essa degeneração pode estar relacionada a fatores mecânicos, decorrentes ou não do processo de fabricação. Sabe-se que as valvas fabricadas a partir de pericárdio bovino sofrem maior desgaste durante o fechamento das cúspides. Já nas próteses porcinas, esse desgaste ocorre mais intensamente durante a abertura dos folhetos devido às características do desenho da válvula (GABBAY *et al.*, 1988).

Na tentativa de reduzir o ritmo de desgaste e, conseqüentemente, prolongar a vida útil das próteses biológicas, algumas técnicas de preservação têm sido propostas com o objetivo de reduzir o processo de calcificação.

O primeiro agente utilizado para preservação de próteses valvares foi o cialit, um sal organo-mercurial (BINET *et al.*, 1965). O ácido formaldeído tamponado a 4% (O'BRIEN, 1965) e o glicerol a 98% (PUIG *et al.*, 1972) também foram testados. Entretanto, apesar do formaldeído ter se mostrado eficaz na redução da antigenicidade e do glicerol demonstrar boa performance hemodinâmica, os resultados em relação à durabilidade foram insatisfatórios, com taxas de disfunção que variaram de 90% em

quatro anos, no caso do cialit, 38% em três anos, para o ácido formaldeído e 18% em seis anos, no caso do glicerol.

As biopróteses valvares, comumente, são preservadas em glutaraldeído. Esse método está associado à maior agregação de fibrina, macrófagos, cálcio e material trombótico à superfície da prótese.

O glutaraldeído, como método de preservação de prótese biológica, foi introduzido na prática clínica em 1968 com resultados que chegaram a 77% de manutenção de função para próteses implantadas em posição mitral, 89% em posição aórtica e 96% em posição tricúspide, num segmento de seis anos (CARPENTIER *et al.*, 1974). Associado ao baixo custo e à sua solubilidade em água, a fixação em glutaraldeído em baixas concentrações (0,5%), desde então, tem sido o mecanismo de escolha para preservação de biopróteses valvares cardíacas. Diversos estudos nestas quatro décadas demonstram sua capacidade de redução da antigenicidade e da degradação proteolítica no pós implante (HUGHES *et al.*, 1994).

Apesar dessa inegável contribuição, o glutaraldeído contido na superfície do tecido protético é citotóxico. Sua ação ocorre através de ligações cruzadas com as proteínas do tecido protético valvar.

O processo de degeneração das biopróteses valvares preservadas em glutaraldeído ainda não está totalmente esclarecido. Alguns mecanismos, entretanto, têm sido propostos: 1) Alterações moleculares na matriz do colágeno; 2) Criação de espaços intersticiais com exposição à formação de

calcificação; 3) Oxidação de grupos de aldeídos livres no plasma; 4) Lenta liberação de glutaraldeído presente no tecido protético levando à interrupção da regulação celular de cálcio; 5) Redução do gradiente transmembranoso de cálcio, favorecendo a deposição e formação de núcleos de calcificação (OOSTHUYSEN *et al.*, 2006; JORGE-HERRERO *et al.*, 2010).

A principal desvantagem da fixação das biopróteses em glutaraldeído é a consequente calcificação dos tecidos ao longo do tempo (SODIAN *et al.*, 2000), o que favorece a disfunção e a necessidade de substituição cirúrgica da prótese.

Sabe-se que esse mecanismo de calcificação tecidual tem início na desvitalização celular a partir da fixação da bioprótese em glutaraldeído (SCHOEN *et al.*, 2005). Por se tratar de método citotóxico, a fixação em glutaraldeído favorece reação imunogênica, o que, pelo menos em parte, limita a durabilidade e favorece o processo degenerativo das biopróteses (SIMIONESCU, 2004; KIM *et al.*, 2006).

A desnaturação do colágeno, independente da calcificação propriamente dita, representa importante fator contribuidor para a limitada durabilidade das biopróteses (VESELY *et al.*, 2001).

Na busca por novos mecanismos de preservação das próteses biológicas, tem sido estudada a utilização de agentes anticalcificantes. Nesse contexto, alguns estudos demonstram bons resultados a partir da

utilização de preservação à base de fotooxidação, fluosol-polietilenoglicol, etanol, ácido alfa-amino-oléico e sulfato duodecil de sódio, além de métodos de descelularização e reconstrução com engenharia tecidual.

Diversas técnicas foram aplicadas com o objetivo de atenuar o processo de calcificação nos tecidos tratados com glutaraldeído, incluindo tratamento com surfactantes (CARPENTIER *et al.*, 1984), ácido alfa-amino-oléico (GOTT *et al.*, 1992), ferro (CARPENTIER *et al.*, 1995), aplicação complementar com calor (CARPENTIER *et al.*, 1998), etanol, éter, isoladamente ou associados (SHEN *et al.*, 2001), ácido L-glutâmico (GRIMM *et al.*, 1992; BRAILE *et al.*, 2011).

Na tentativa de melhorar a performance e a durabilidade das biopróteses fixadas em glutaraldeído, diversas estratégias foram propostas. Um desses métodos adotou o revestimento da superfície da prótese com células endoteliais. Tal revestimento, entretanto, mostrou-se ineficaz devido à incapacidade de reepitelização das valvas fixadas em glutaraldeído (FISCHLEIN *et al.*, 1992; HOFFMANN *et al.*, 1992; BENGTSSON *et al.*, 1993; FISCHLEIN & FASOL, 1996). Outros métodos tentaram aumentar a capacidade de adesão celular das próteses fixadas em glutaraldeído a partir do pré tratamento das próteses com soluções de aminoácidos (FISCHLEIN *et al.*, 1994) ou com ácido cítrico (GULBINS *et al.*, 2003) e pré revestimento das próteses com fibronectina ou fatores de crescimento (FISCHLEIN *et al.*, 1994). Técnicas *in vitro*, visando a redução da citotoxicidade do glutaraldeído e o revestimento da superfície da prótese com células da medula óssea, demonstraram o aumento da adesividade

celular com consequente capacidade de reendotelização do tecido (KIM *et al.*, 2006).

Métodos alternativos também foram testados, como a utilização de substâncias anticalcificantes, como diaminas, dimetil-amino-propil, etil-carbodimida e hexadiazina (GIRARDOT *et al.*, 1996), associação entre glutaraldeído e ácido alfa-amino-oléico, que se caracteriza por inibir a entrada de cálcio nas células teciduais (ZILLA *et al.*, 2005), poliacrilamida hidrogel (OOSTHUYSEN *et al.*, 2006), foto-oxidação, associada ou não à fixação em glutaraldeído (MOORE *et al.*, 1998; MEURIS *et al.*, 2003).

Na tentativa de ampliar a durabilidade das biopróteses valvares, diversos estudos tentam substituir o glutaraldeído como método de fixação e preservação das próteses. Estudos *in vitro* e *in vivo* compararam o processo de calcificação de biopróteses valvares pré-tratadas com glutaraldeído e um modelo anticalcificante introduzido pelo Instituto BIOCOR (Belo Horizonte/Basil), demonstrando redução significativa da calcificação *in vivo* e *in vitro* nas próteses tratadas pelo método *no-react* (ABOLHODA *et al.*, 1996).

Mais recentemente, algumas tentativas de manejo químico do glutaraldeído demonstraram redução da toxicidade e obtiveram resultados promissores na diminuição do processo de calcificação *in vivo* (JORGE-HERRERO *et al.*, 2010).

O desafio atual de engenharia tecidual é estudar e propor a criação de substitutivos teciduais e valvares cardíacos a partir de estruturas artificiais e biológicas que sejam biocompatíveis, não trombogênicas, não teratogênicas, duráveis e que possibilitem o acompanhamento do crescimento do hospedeiro (CEBOTARI *et al.*, 2010; SACKS *et al.*, 2009; KNIGHT *et al.*, 2008).

Teoricamente, a alternativa a todas essas limitações metodológicas seria a utilização de próteses que, tratadas, permitissem a epitelização espontânea com células do hospedeiro (FRATER *et al.*, 1992).

Na busca por publicações acerca dessa nova metodologia, encontrou-se, apenas, três estudos experimentais que compararam o desempenho hemodinâmico e a histologia de próteses valvulares implantadas em carneiros, comparando a conservação e tratamento em glutaraldeído *versus* a preservação não aldeídica (*L-Hydro*^R):

1. “*Comparative Study of the L-Hydro^R process and glutaraldehyde preservation*”. Esse estudo comparou próteses preservadas em *L-Hydro*^R (PEG) e em glutaraldeído, implantadas em posição mitral de dez carneiros jovens, analisadas cinco meses após implante. A avaliação foi realizada através de ecocardiografia, angiografia, histologia e histoquímica (NINA *et al.*, 2005).

Nesse estudo, NINA *et al.* (2005), demonstraram que próteses implantadas em posição mitral de carneiros, tratadas com solução não-

aldeídica, tiveram melhor rendimento hemodinâmico, caracterizado pela ausência de regurgitação e menor pressão capilar pulmonar média, se comparada com as próteses tratadas com solução aldeídica.

O mesmo estudo demonstrou que a baixa toxicidade das próteses preservadas em *L-Hydro*^R, permitiu a reendotelização espontânea por células do hospedeiro, conferindo maior resistência à calcificação e à trombogenicidade. Nesse sentido, as próteses tratadas convencionalmente, em glutaraldeído, apresentaram calcificação macroscópica e microscópica, além de deposição de material trombótico. A endotelização, como mecanismo para minimizar ou retardar a degeneração estrutural, mostrou-se como uma possibilidade real, desde que o tecido valvar possa ser preservado por um agente com as características do polietilenoglicol (PEG), tornando-o propício à recelularização por células do hospedeiro em virtude da sua baixa toxicidade, da sua capacidade de atenuar os xenoantígenos e de manter preservada a estrutura histológica valvar (LEHNER *et al.*, 1996).

Em seu estudo, NINA *et al.* concluíram que a preservação não-aldeídica, em PEG (*L-Hydro*^R), propiciou a endotelização espontânea, com evidência de boa adesividade do novo endotélio à matriz do colágeno, além de mostrar maior resistência à calcificação e à formação de trombos, quando comparada à preservação aldeídica convencional.

2. ***“Stentless valves treated by the L-Hydro^R process in the aortic position in sheep”***, que comparou a preservação *L-Hydro*^R, *versus* a preservação em Glutaraldeído. Nesse estudo, também experimental, o

número de animais comparados foi de 24 carneiros, sendo em 14 animais implantadas próteses preservada em *L-Hydro^R*, e em 10 animais implantadas próteses preservadas em Glutaraldeído. SANTOS *et al.*, avaliaram a incidência de calcificação tardia em próteses porcinas, implantadas em posição aórtica. Nesse estudo, ao contrário do anterior, não foram observadas diferenças no desempenho hemodinâmico, definido como ausência de regurgitação aórtica importante, equivalência de pressão capilar pulmonar, ausência de gradiente VE-Ao importante. Após 150 dias de implante, foi realizada avaliação de medidas hemodinâmicas, ecocardiográficas e angiográficas, assim como análise histológica (SANTOS *et al.*, 2007).

Na avaliação macroscópica das próteses explantadas, houve nítida diferença entre os grupos com presença de maior quantidade de pontos de calcificação nas próteses tratadas em glutaraldeído. Ainda em relação à calcificação, a microscopia ótica mostrou diferença significativa, em favor das próteses tratadas em *L-Hydro^R*. A exemplo do demonstrado por NINA *et al.*, a avaliação macroscópica não verificou a presença de trombos nessas próteses, denotando a formação de novo epitélio, conforme demonstrado por ele através da microscopia eletrônica de varredura. A integridade do novo endotélio foi caracterizada pelo contato desse com a matriz do tecido conjuntivo, conferindo, dessa maneira, resistência à insudação de proteínas plasmáticas e sais, precursores da degeneração bioprotética (EYBL *et al.*, 1992).

3. “Estudo experimental comparativo do enxerto homólogo pulmonar tratado pelo processo *L-Hydro^R* com homoenxerto

pulmonar a fresco". Nesse estudo, os autores comparam morfológica e funcionalmente, o homoenxerto pulmonar preservados pelo método *L-Hydro^R*, com o homoenxerto a fresco, implantados em 14 carneiros jovens, e avaliados após um período de 320 dias. Os autores concluíram que o desempenho clínico e hemodinâmico dos homoenxertos foram semelhantes, apesar do desempenho ecocardiográfico ter sido superior no grupo tratado em *L-Hydro^R*. Além disso, a partir da utilização da microscopia eletrônica de varredura e da microscopia eletrônica de transmissão, demonstraram que homoenxerto tratado pelo método *L-Hydro^R* apresentou evidência histológica de repopulação celular intersticial e endotelial (REY *et al.*, 2011).

Nesses três estudos, evidenciou-se baixos níveis de calcificação das próteses preservadas em *L-Hydro^R*, sempre com significância estatística, bem como a indução espontânea de endotelização, principalmente quando comparadas àquelas tradicionalmente preservadas em gluraldeído, conforme objetivo das duas primeiras citações.

O polietilenoglicol (PEG) é uma família de polímeros de cadeia longa composto de subunidades de etileno glicol. Possui grande capacidade de formação de complexos, devido ao grande número de partículas de oxigênio em sua cadeia polimérica - HO-CH₂-(CH₂-O-CH₂-)_n-CH₂-OH.

O Polietilenoglicol é produzido pela interação de óxido de etileno com água, etileno glicol ou oligômeros de etileno glicol. A reação é catalisada por ácidos ou bases. Sua característica hidrófila da cadeia de

polioxietileno da linha do polietilenoglicol permite a obtenção de um polímero higroscópico e altamente solúvel em água.

Polietilenoglicóis (PEGs) reagem com ácidos graxos para fazer detergentes que têm espessamento e espuma de estabilização como propriedades. Quando quimicamente combinado com ácidos graxos do óleo de coco, por exemplo, faz detergentes, que são usados em xampus como surfactante, emulsificante e estabilizante de espuma.

PEG é usada como espessante em muitos produtos. Dentre eles, no creme dental, impedindo que as bactérias rompam os pirofosfatos, controlando assim o acúmulo de tártaro. São usados na indústria como surfactantes, incluindo alimentos, cosméticos e farmacêuticos; em biomedicina, como agentes dispersantes, solventes, pomada e bases de supositório; em veículos, como excipientes, e como laxantes (WIKIMEDIA FOUNDATION - http://en.wikipedia.org/wiki/Polyethylene_glycol, 2010).

Além dessas características, possui baixa toxicidade por se tratar de um composto quimicamente inerte. Quando em contato com a corrente sanguínea é excretado completamente pelo rim, sem sofrer metabolização. Essas propriedades asseguram sua aplicabilidade clínica como veículo para dissolver fármacos pouco solúveis em água, como a reserpina e a nitrofurantoína e aqueles facilmente hidrolisáveis, como os barbituratos alcalinos (PRESTA *et al.*, 1995; UNICAMP, 2003).

Alguns estudos experimentais *in vitro* utilizaram o PEG adicionado à solução de preservação miocárdica de “*Saint Thomas*” e da “*University of Wisconsin*”. Nessa comparação, a associação com PEG mostrou maior eficácia e garantiu a viabilidade funcional do coração por até 24 (vinte e quatro) horas contra as quatro a seis horas obtidas com as soluções tradicionalmente utilizadas isoladamente (BHAYANA *et al.*, 1997). A capacidade de preservação mais prolongada se deve à ação osmótica do PEG, que estabiliza a membrana, tornando-a menos permeável ao soluto extracelular e, conseqüentemente, prevenindo o edema celular (WICOMB *et al.*, 1992).

A combinação do antígeno específico com o PEG, resultando na redução da antigenicidade, confere propriedade imunossupressora ao PEG, como demonstrado quando se associou 5% de PEG à solução de preservação miocárdica utilizada em transplante cardíaco. Essa associação reduziu em 30% a incidência de rejeição no grupo de pacientes transplantados que utilizaram tal solução. A ação imunossupressora decorre da ligação do PEG com os lipídeos da membrana celular dos antígenos, formando complexos reversíveis, interferindo na ativação dos macrófagos e das células *T-helper*, induzindo ao estado de tolerância aos antígenos do doador, reduzindo a imunogenicidade (COLLINS *et al.*, 1991).

Nesse contexto, o presente estudo avança na avaliação do processo de endotelização espontânea dos substitutivos valvares, desta vez, testando o desempenho do modelo de preservação em polietilenoglicol (*L-Hydro^R*) em próteses tubulares valvadas, implantadas no tronco da artéria pulmonar de carneiros.

OBJETIVOS

Avaliar os processos de degeneração estrutural, *in vivo*, de heteroenxertos pulmonares valvados, preservados em *L-Hydro*^R e implantados em ovinos, com período mínimo de observação de cinco meses.

MÉTODOS

Este protocolo foi conduzido de acordo com os Procedimentos Operacionais Padrão do Laboratório de Pesquisas da Labcor Laboratórios – Centro de Pesquisas. O estudo teve a supervisão do Controle de Qualidade - Labcor Laboratórios.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob o número 1761/08

ESPÉCIE EM TESTE – OVINO

Justificativa: O ovino (raça Santa Inês) foi escolhido como a espécie experimental a ser usada, pelas seguintes razões:

A. O tamanho desse animal permite, tecnicamente, a realização do implante do conduto pulmonar valvado.

B. O tamanho do coração do ovino é comparável ao de humanos, permitindo, assim, o implante de biopróteses vasculares tubulares de tamanho clínico (4 a 6cm).

C. O ovino é, relativamente, fácil de ser mantido por longos períodos após a realização do procedimento.

D. A experiência do laboratório com esse modelo experimental permitiu um julgamento mais racional a respeito de complicações ocorridas durante o estudo.

DESCRIÇÃO E REQUERIMENTO DE ANIMAIS

A - Todos os animais pesavam entre 27 – 35kg (média de 32,5Kg +/-2Kg), sendo 03 fêmeas e 14 machos castrados.

B - Antes de entrarem no estudo, eles foram considerados livres de doenças e receberam certificado de saúde fornecido pelo médico – veterinário.

C - A idade dos animais variou de 6,13 a 8,13 meses (média de 6,8 meses +/-0,6 meses). A idade ainda foi confirmada pelo tempo de erupção e pelas mudanças na tábua dental.

D - A origem de cada animal foi devidamente documentada.

E – Todos os animais foram vermifugados e vacinados na chegada ao Centro de Pesquisa.

CASUÍSTICA

Quatorze (14) animais receberam o implante da bioprótese a ser testada (*L-Hydro^R*) - **GRUPO *L-Hydro^R* (teste)**. Três (03) animais receberam o implante da bioprótese controle preservadas em glutaraldeído - **GRUPO Glutaraldeído (controle)**.

O número de animais participantes foi definido a partir de cálculo amostral e obedeceu à *International Standardization Organization* - ISO 5840, 3a edição, publicada em 1996 e revisada em 2005.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO E INCLUSÃO DE NOVOS ANIMAIS

Os animais que morreram antes de 24 horas de pós-operatório foram consideradas mortes cirúrgicas e foram excluídos do estudo. Animais adicionais foram incluídos no estudo e submetidos à cirurgia para ser preenchido o critério de população fornecida anteriormente.

Os animais que morreram antes da data prevista para o sacrifício foram examinados e submetidos à necropsia como descrito na secção “PROTOCOLO DE PATOLOGIA”. A funcionalidade da bioprótese e a causa da morte foram determinadas, quando possível, pelo patologista do estudo.

ALOJAMENTO DOS ANIMAIS

Os animais foram alojados e isolados dos outros animais do estudo, pelo período de cinco dias, antes de entrarem para o estudo. Todos os animais foram alojados de acordo com a normas estabelecidas pela AAALAC (*AMERICAN ASSOCIATION for ACCREDITATION of LABORATORY ANIMAL CARE*) sob condições sanitárias adequadas, alimentação balanceada e água à vontade.

MANUSEIO E CUIDADO

Toda ferida cirúrgica foi verificada, pelo menos uma vez ao dia. Caso alguma alteração fosse notada, o pesquisador e o veterinário responsável eram comunicados, sendo registrada no histórico do animal.

MATERIAL EM TESTE

A prótese utilizada consiste em um *patch* de pericárdio bovino corrugado, tratado pelo processo *L-Hydro^R*. O fechamento do tubo é feito com 2 planos de sutura. Uma válvula, confeccionada de pericárdio porcino, com tratamento em *L-Hydro^R*, é fixada no interior do tubo. Uma vez montado, o tubo é testado quanto a competência da válvula e verificada a não existência de vazamentos.

Aprovada, a prótese é esterilizada em solução de peróxido de hidrogênio e etanol e, posteriormente, embalada em solução de etanol a 50%. Teste de esterilidade é feito através de amostras incubadas em meios de cultura *FTM*, *Middlebrook* e *STB* durante 14 dias. Comprovada a esterilidade, a prótese é liberada.

A técnica de preservação em *L-Hydro^R* consiste de três etapas distintas:

1ª ETAPA: Extração dos antígenos e oxidação química dos antígenos remanescentes com polietilenoglicol.

2ª ETAPA: Esterilização em peróxido de hidrogênio.

3ª ETAPA: Estoque das próteses em solução de etanol a 50%.

Cada prótese possuía qualidade e diâmetro determinados (17 ou 19 mm). Cada prótese foi identificada pelo número do animal no estudo. O número da prótese foi registrado em todos formulários associados ao animal e ao procedimento operatório.

As próteses (Figura 01) utilizadas nesse estudo foram confeccionadas a partir de pericárdio bovino, sendo compostas por um segmento tubular e outro composto por três folhetos valvares.

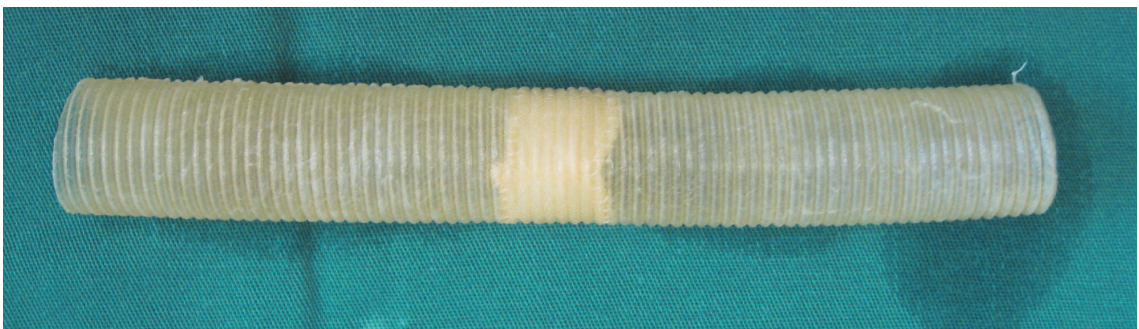


FIGURA 01: Tubo valvado de pericárdio bovino, com cúspides de pericárdio porcino, preservado em *L-Hydro*^R

PROTOCOLO

A – Protocolo de recebimento de animais:

Nenhum animal possuía sinais de infecção aparente ou anormalidade congênita que justificassem a rejeição do animal. Atenção especial foi dirigida ao sistema respiratório, não sendo evidenciado quadro de pneumonia ou outros problemas respiratórios que resultassem na rejeição do animal. Nenhum animal apresentou temperatura retal acima de 40°C.

Logo após o exame clínico, o animal recebeu número individual, sendo preenchida ficha contendo todos os cuidados recebidos durante a permanência do mesmo no estudo. Foram administradas Vacinas Biodectin 2, via SC, Ivomec (Ivermectina 1%) – 0,02ml por Kg via SC, Valbazen 10 Cobalto (Albendazole) 2ml via oral. Cada animal permaneceu isolado por cinco dias, para então ser alojado junto aos animais já controlados. O histórico de cada animal permanece arquivado.

Os animais permaneceram sob cuidados veterinários diários e receberam tratamento de acordo com a publicação *MANUAL SOBRE CUIDADOS E USOS DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO*, preparado pelo *NATIONAL RESEARCH COUNCIL – INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES* editado pela parceria AAALAC e COBEA. E foram mantidos em instalações adequadas, recebendo alimentação balanceada, controle de verminose e imunizações periódicas.

B – Pré-operatório

Cada animal foi alojado na sala de pré-operatório 24 horas antes da cirurgia, junto ao bloco cirúrgico, quando era retirado todo alimento sólido da baía do animal. Seis horas antes da cirurgia, começava o jejum hídrico.

C – Indução anestésica e anestesia

Quinze minutos antes da indução anestésica, administrava-se 01mg de sulfato de atropina IM. A indução anestésica era feita por via intravenosa (IV) com 12,5mg/kg de Thiopental. Um catéter era colocado na veia jugular externa esquerda e fixado por meio de sutura. Essa via endovenosa permanecia até o final do ato operatório. Uma torneira de três vias era conectada ao catéter e, a esta, um equipo de soro, por onde eram administrados medicamentos e soluções eletrolíticas.

Naquele momento, eram administrados, por via intravenosa, 6ml de dexametasona (Azium), 1g de Ampicilina Sódica intravenosa (IV), que eram repetidos a cada três horas de cirurgia. O animal era, então, intubado e ventilado artificialmente.

Uma sonda gástrica era colocada, e através dela, eram administrados 150CC de solução antiácida. A sonda permanecia fechada até o início da circulação extracorpórea (CEC).

Foi feita ampla tricotomia da região torácica esquerda, e o animal transportado para a sala de operação, colocado na mesa cirúrgica e conectada a monitorização eletrocardiográfica. O tubo orotraqueal era conectado e se iniciava a ventilação mecânica com o volume de 10 a 15ml de O₂/kg, numa frequência de 8 a 12 ciclos por minuto.

A anestesia foi mantida pela administração de Halotano na concentração de 1 a 1,5%, de Thiopental, de acordo com a necessidade, e o relaxamento muscular obtido pela administração intravenosa de 100mg de Cloreto de Succinilcolina.

D – Técnica operatória

A antisepsia do campo operatório foi feita com dermoiodine diluído em soro fisiológico por 5 a 10 minutos e com *spray* de demoiodine. A área cirúrgica foi, então, enquadrada com campos estéreis, que cobriam todo o animal. Os pacotes com as tubulações estéreis da circulação extracorpórea (CEC) eram abertos e passados ao auxiliar do cirurgião, que as separava e as passava à perfusionista, fixando-as com auxílio das pinças de campo.

Eram administrados 100mg de cloreto de succinilcolina IV e realizada toracotomia esquerda ampla penetrando no quarto espaço intercostal. A artéria torácica interna esquerda era ligada com fio de algodão 0, seguindo-se a secção da mesma. O pulmão esquerdo era afastado, com um afastador maleável, sobre uma compressa úmida, para obtenção de boa visualização do campo cirúrgico.

Proseguia-se com a dissecação da aorta torácica, em seu terço proximal, para a canulação. Os nervos frênico e vago eram isolados. Era realizada a dissecação do tronco pulmonar, desde o plano da valva pulmonar até sua bifurcação. Todos os isolamentos eram feitos com fita cardíaca.

O animal era heparinizado (350UI de heparina/kg) e era administrado, naquele momento, 4ml de dexametasona (Aziium). Depois de permitir que a heparina circulasse por dois a três minutos, era feita sutura em bolsa na aorta torácica, com fio de poliéster trançado 2-0, ancorado em barra de teflon, para a canulação arterial, e outra, na aurícula direita, para a drenagem do sangue venoso, através de cânula única. Era estabelecida a circulação extracorpórea (CEC), com hemodiluição total e normotermia, sem pinçamento aórtico.

O tronco pulmonar era pinçado distalmente após sua bifurcação. O ligamento arterioso era seccionado nesse momento. Após a secção completa do tronco pulmonar, os folhetos nativos da válvula pulmonar eram retirados. O enxerto era lavado a partir da imersão completa do tubo em cuba contendo soro fisiológico 0,9%, sendo mantido imerso por três minutos, repetindo-se este procedimento três vezes. Um segmento do enxerto de aproximadamente 4cm, contendo as cúspides, era preparado para o implante. Anastomosava-se a porção proximal na via de saída do ventrículo direito, com sutura contínua, com fio polipropileno 5-0. Passava-se, então, para a sutura da porção distal do conduto à porção do tronco pulmonar relacionada com a bifurcação, também com polipropileno 5-0. Nesse momento era feita a revisão da hemostasia.

A CEC era interrompida após o implante da prótese e a revisão da hemostasia. O animal era estabilizado pelo ajuste do volume sangüíneo e pela administração das drogas requisitadas pelo cirurgião. Com o animal hemodinamicamente estável, era retirada a cânula do átrio direito e da aorta, dando início à administração IV de cloridrato de protamina à razão de 1ml para cada 1000UI de heparina administrada, em intervalos de hum minuto. Todos os sítios de canulação, assim como as anastomoses, eram revisados para a verificação da hemostasia, um dreno torácico era colocado, fazendo-se sutura em forma de bolsa na pele, em volta da incisão, por onde o dreno penetrava, usando-se fio de náilon monofilamentar 2-0 para fixá-lo à pele. O pericárdio era aproximado com fios de seda 2-0. As costelas eram aproximadas com fios de algodão grosso (barbante). A incisão torácica era fechada, usando-se fios de seda 2-0 para a sutura da musculatura intercostal, serrátil do tórax, grande dorsal e subcutâneo, com pontos simples, contínuos. A pele era aproximada com sutura com fios de seda 2-0, aproximando-se o tecido celular subcutâneo, e uma sutura intradérmica com fio de náilon 4-0. A partir do fechamento da parede torácica, já era conectado o dreno torácico a um aspirador a vácuo e se iniciava a drenagem do tórax. O dreno era retirado quando o animal passava a respirar espontaneamente e não havia secreção a ser aspirada.

E – Perfusão

1 – Montagem e início:

O pacote com os tubos necessários era aberto, após a cobertura do animal com toalhas estéreis. O auxiliar passava os tubos ao perfusionista, que terminava a montagem do sistema. Uma vez montado o circuito, o fluxo de gás era ajustado para 0,5l/min de oxigênio com FiO₂ em 70%. Adicionava-se ao oxigenador de membrana, 2.000ml de solução de ringer com lactato de sódio (Solução Iniciadora ou “*Priming Solution*”) e 200UI de heparina.

Essa solução era aquecida a 37°C e circulada para que as tubulações fossem totalmente preenchidas por ela, ficando livres de bolhas de ar. O volume da solução era estabilizado após a circulação e preenchimento de todas as tubulações. O volume estabilizado era assinalado no oxigenador e usado como referência para se fazer o ajuste do volume de sangue ao final da CEC. A solução circulava até que o cirurgião estivesse pronto para separar as linhas arterial e venosa e conectá-las às respectivas cânulas.

2. Perfusão

Com o anúncio de que o cirurgião estava pronto para separar as linhas do circuito, a circulação da solução iniciadora era interrompida, e a linha de retorno venoso pinçada. O cirurgião separava as linhas e conectava a arterial à cânula da aorta, enquanto a drenagem venosa era feita

através de cânula única, multiperfurada, colocada no átrio direito e conectada a uma linha de aspiração. Simultaneamente, começava o bombeamento da linha arterial e a aspiração do retorno venoso. O perfusionista, então, ajustava o fluxo de gases para 2l/min com 100% de O₂.

O fluxo desse gás era ajustado de acordo com os resultados da gasometria, e o anestésico inalatório era desligado. A temperatura esofágica permaneceu entre 37,5 e 38,5°C. Durante a CEC, todas as drogas eram administradas diretamente no reservatório do oxigenador.

Análises regulares de sangue arterial eram realizadas em períodos determinados pelo cirurgião. A temperatura esofágica era mantida em torno de 38,5°C até o momento da saída da CEC. Os pulmões eram cuidadosamente reinsuflados. A CEC era vagarosamente desligada, ocluindo-se, paulatinamente, a linha de retorno venoso e, ao mesmo tempo, diminuindo o fluxo de sangue arterial.

Imediatamente antes do fechamento torácico, era introduzido catéter tipo *jelco*, nº 20, na via de saída do ventrículo direito e ao nível do tronco da artéria pulmonar, após a anastomose distal do enxerto tubular. Com o auxílio de um monitor multiparamétrico (Dixtal), eram mensuradas as pressões médias de ventrículo direito (PMVD) e de artéria pulmonar (PMAP). Tais medidas visavam avaliar a existência de gradiente VD-AP.

CUIDADOS E OBSERVAÇÕES

A – Cuidados pós-operatórios

O animal era observado cuidadosamente durante o período pós-operatório imediato, para o caso de ocorrerem eventos hemorrágicos. Caso necessário, poder-se-ia recorrer à transfusões de sangue. Na primeira oportunidade, a ventilação mecânica era desligada, mas o oxigênio continuava a ser administrado, via tubo ou, se esse fosse removido, através de cânula nasal (3 ou 4l/min).

Assim que o animal acordava da anestesia e era restabelecida a pressão negativa intratorácica, o dreno torácico era removido, e o animal era levado para a sala de pós-operatório. Após quatro horas de pós-operatório, eram administrados 1g de ampicilina sódica intramuscular (IM) e 1g de cefazolina sódica, via intramuscular.

Durante os sete primeiros dias de pós-operatório, o animal recebia 1g de ampicilina sódica intramuscular (IM) e 1g de cefazolina sódica, via intramuscular duas vezes ao dia. Era administrado, para controle da dor, flunixin IM (Banamine) 2,5mg por Kg de peso a cada 24 horas, por três dias. A temperatura retal era monitorada, pelo menos, uma vez por semana.

O animal recebia alta a partir do sétimo dia pós-operatório, caso sua temperatura retal estivesse abaixo de 40,5°C e suas condições estivessem

satisfatórias. Caso apresentasse febre, o animal continuaria recebendo a terapia antibiótica, ou essa poderia ser alterada.

B – Cuidados a longo prazo

O animal era observado diariamente nos primeiros sete dias de pós-operatório. Se fosse considerado livre de complicações, após sete dias, era transferido para o biotério de pós-operatório mediato. Lá, o animal continuava a ser observado e avaliado diariamente durante o período pré-determinado de 150 dias, ou enquanto sobrevivesse. Planilhas de cuidados pós-operatórios eram utilizadas diariamente. Quaisquer alterações ou mudanças nas condições dos animais eram registradas.

C – Mortes imediatas

Qualquer animal que não sobrevivesse às primeiras 24 horas de pós-operatório era considerado como falha técnica de implante e era eliminado do estudo. A causa da morte era determinada, por necropsia, para cada caso. Todo animal que sobrevivesse às primeiras 24 horas, após a cirurgia, mas morresse antes do fechamento do período de acompanhamento pré-determinado para estudo, era submetido a uma necropsia para se determinar a causa *mortis*. Todos os animais implantados foram submetidos à necropsia.

D – Amostragem sanguínea

Amostras eram coletadas de todos os animais implantados, tanto do grupo de controle quanto do grupo de teste. A primeira coleta era feita no período de quarentena, para que o animal entrasse em cirurgia com o exame sanguíneo avaliado. A segunda, aos 07 dias após a cirurgia, a terceira amostra aos 90 dias, ou quando fosse necessário, durante o período do estudo. A última coleta era feita durante o estudo angiográfico, que precedia o sacrifício do animal.

Todas as coletas de sangue eram feitas assepticamente. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- **HEMATOLOGIA:** Hemoglobina, hematócrito, plaquetas, leucocitos.
- **BIOQUÍMICA DO SANGUE:** Sódio, potássio, cálcio, fósforo, ferro, fosfatase alcalina, CPK, proteína glicosilada, desidrogenase láctica, creatinina, uréia, TGP, TGO, gama GT, bilirrubinas (totais e frações), glicemia, colesterol, triglicérides, proteínas totais.

E – Protocolo de angiografia e medidas hemodinâmicas

Estudos foram realizados a partir do 150º dia de pós-operatório, precedendo ao sacrifício e à necropsia. Antes da anestesia, cada animal foi

pesado e foram coletadas, assepticamente, amostras de sangue da veia jugular externa para hematologia e bioquímica do sangue.

O animal era anestesiado através da administração intravenosa de thiopental na dose de 12,5mg/kg. O animal era então intubado com um tubo endotraqueal e ventilado mecanicamente. A anestesia era mantida com halotano e propofol (diluído ao soro na proporção de 30ml de soro e 20ml de medicamento) em infusão lenta e contínua. Oxigênio suplementar era administrado.

O animal era colocado na mesa em decúbito lateral esquerdo e contido. Era feita a assepsia do lado esquerdo do pescoço, já tricotomizado, cobrindo-se então com campos cirúrgicos. Uma pequena incisão era feita na lateral esquerda do pescoço e a artéria carótida e a veia jugular externa eram expostas e isoladas. Ambos os vasos eram ligados distalmente e circundados proximalmente. O animal era heparinizado à razão de 350UI/kg.

Um catéter (6F) *Pigtail* era introduzido a partir da artéria carótida comum esquerda até a aorta torácica. Uma medida da pressão arterial sistêmica era obtida. A posição de todo o catéter era verificada por tomadas de pressão e por visão direita através de fluoroscopia.

Um catéter (7F) de *Swan-Ganz* era introduzido a partir da veia jugular externa esquerda. Eram registradas: **a)** Pressão venosa central, ao

nível do átrio direito; **b)** Pressão de ventrículo direito, ao nível do VD; **c)** Pressão de artéria pulmonar, ao nível do tronco da artéria pulmonar.

A posição da extremidade do catéter era confirmada por tomadas de pressão e visão direita através de fluoroscopia posicionada em posição antero-posterior. As pressões venosa central e do leito pulmonar eram gravadas simultaneamente numa escala de zero a 40mmHg. Débitos cardíacos eram então obtidos, usando-se a técnica de termodiluição. Três injeções para débito cardíaco eram executadas e a média do débito cardíaco gravada. O catéter de *Swan-Ganz* era então recuado até o pescoço.

Era efetuada a injeção de 40 a 60ml, através de seringa, de contraste iodado diluído em SF 0,9% na proporção 1:1, no ventrículo direito, próximo à artéria pulmonar. Todos os resultados foram gravados em CD. Antes de sacrificar o animal, eram administrados 20ml de Thiopental e o animal era sacrificado com uma injeção de 30ml de Cloreto de Potássio IV.

Na avaliação das imagens angiográficas, as variáveis foram analisadas por hemodinamicista, sem que este soubesse o grupo que estaria analisando (avaliação “cega”), sendo interpretadas da seguinte maneira:

1. Refluxo valvar pulmonar: Análise semi-quantitativa (leve, moderada ou importante), baseada na comparação entre as amostras.
2. Refluxo tricuspídeo: Análise semi-quantitativa (leve, moderada ou importante), baseada na comparação entre as amostras.

3. Estenose valvar ou da artéria pulmonar: a) discreta - quando havia redução inferior a 20% do diâmetro do conduto; b) moderada - quando havia redução de 20 a 50% do diâmetro do conduto; c) importante - quando havia redução de mais de 50% do diâmetro do conduto.

4. Contratilidade do VD: a) preservada - quando todo o contraste era expulso da cavidade ventricular; b) reduzida - quando permanecia contraste no interior do VD após a sístole ventricular.

5. Obstrução da VSVD: a) discreta - quando havia redução inferior a 20% da área da VSVD; b) moderada - quando havia redução de 20 a 50% da área da VSVD; c) importante - quando havia redução de mais de 50% da VSVD.

F – Patologia

1. Avaliação macroscópica

O estudo pesquisou:

- Perviedade após um mínimo de 150 dias de implante;
- Análise de falência;
- Funcionalidade e integridade da prótese;
- Recuperação/endotelização;
- Coágulos/trombos;
- Colonização microbiológica;
- Reação do organismo à presença da prótese;
- Existência de doença intercorrente no animal.

O grau de calcificação foi quantificada (avaliação semi quantitativa) pelo exame anátomo patológico considerando a graduação: **0**- Calcificação inexistente; **1**- Calcificação leve; **2**- Calcificação moderada; **3**- Calcificação importante.

2. Avaliação microscópica

Após o exame macroscópico, as próteses explantadas foram fixadas em solução de formaldeído a 10%. O estudo histológico foi realizado para avaliar a deposição de cálcio e material trombótico na superfície das próteses. As biopróteses foram cortadas, desidratadas em álcool, embebidas em parafina e seccionadas em fragmentos de quatro micrômetros e, então, foram tratadas com hematoxilina-eosina para avaliação de depósitos de cálcio. As lâminas foram observadas em microscópio óptico, por patologista, sem que este soubesse o grupo que estaria analisando (avaliação “cega”).

O grau de calcificação foi quantificado (avaliação semi quantitativa) pelo exame anátomo patológico considerando a graduação: **0**- Calcificação inexistente; **1**- Calcificação leve; **2**- Calcificação moderada; **3**- Calcificação importante.

3. Necropsia

As necrópsias foram realizadas em todos os casos. No começo da necropsia, o coração e o tronco pulmonar eram retirados integralmente. Depois de tirar o conjunto da carcaça, o mesmo era totalmente lavado com solução salina estéril. Os cotos dos vasos e os átrios eram secos, com gaze, para que fosse removido o excesso de líquido. O conjunto era, então, colocado sobre uma toalha e fotografado. A prótese era inspecionada através da inspeção usual e leve palpação.

Após o coração ter sido removido da carcaça, os pulmões, o fígado, os rins e o cérebro eram removidos, um de cada vez, e examinados em fatias múltiplas. Secções múltiplas do cérebro eram inspecionadas e quaisquer lesões observadas, registradas no relatório de necropsia. Os órgãos remanescentes eram apenas inspecionados e, quaisquer lesões, eram registradas no relatório de necropsia.

Todos os cortes dos órgãos eram colocados em solução neutra tamponada com 10% de formalina para fixação. Um relatório da necropsia era escrito depois de completa a dissecação da carcaça.

4. Dissecação do coração e da bioprótese

Toda a superfície dos átrios, ventrículos, vasos, endotélio, do miocárdio e da artéria pulmonar foi examinada e inspecionada detalhadamente. Quaisquer lesões ou alterações observadas eram

registradas. Foram coletadas amostras para bacteriologia com *swabs*. A prótese com suas extensões foram fotografadas e imersas para fixação em uma solução neutra tamponada com 10% de formalina.

G – Radiologia

As amostras foram submetidas ao estudo radiológico para determinação da distribuição e intensidade dos depósitos de cálcio nos folhetos valvulares, bem como no tubo.

Foi utilizado um mamógrafo *Senographe DMR (GE, Buc. França)* com voltagem de aceleração em 22kV. O grau de calcificação foi classificado de zero a três (0 a 3), de acordo com o método de Grabenwöger (GRABENWÖGER *et al*, 1992), que se baseia na quantidade de cálcio detectada pela radiografia, considerando o folheto valvular e o tubo.

H - Espectrofotometria por absorção atômica

Fragmentos do tubo e das cúspides foram desidratados em estufa a 50°C e mineralizados em forno de Mufla a 800°C. As amostras mineralizadas foram dissolvidas em ácido nítrico (HNO₃ - 2,5M) determinado-se a quantidade de cálcio (expressa em *ug/mg* de tecido seco) pelo método da espectrofotometria de absorção atômica, através do espectrofotômetro *Perkin Elmer* de 1,000mg/L com adição de cloreto de latânio a 1% (BAUCIA *et al*, 2006).

I - Análise estatística

Os dois grupos foram comparados quanto aos dados da angiografia, medidas hemodinâmicas, macroscopia, microscopia, radiologia e espectrofotometria por absorção atômica.

Todos os dados categóricos estão expressos em proporções, enquanto que as variáveis quantitativas estão expressas em média \pm desvio padrão. Foram construídos histogramas para avaliar a distribuição normal dos dados quantitativos. Optou-se por utilizar o teste exato de Fisher para comparar as frequências observadas no Grupo *L-Hydro*^R (grupo teste) com as frequências observadas no Grupo Glutaraldeído (grupo controle). Para comparar os dados quantitativos entre os grupos (casos *versus* controles), escolheu-se o teste T de Student ou o teste de Mann-Whitney, quando apropriado. O nível de significância foi pré-estabelecido em 5%. O *software*^R utilizado foi o *SPSS* na sua versão 2008.

RESULTADOS

Resultados

Dezenove animais foram submetidos ao procedimento de substituição do tronco pulmonar por enxerto tubular valvado. A mortalidade operatória foi de 10,53% (dois animais). A causa da mortalidade foi choque hipovolêmico secundário a sangramento intra operatório. Os dezessete animais restantes foram incluídos no estudo. O **Quadro 01** resume as informações relacionadas ao estudo.

QUADRO 01: Dados cirúrgicos

	GÊNERO	PESO (Kg)	IDADE (meses)	CEC (min)	Sobrevida (dias)	TAMANHO PRÓTESE	STATUS
GRUPO <i>L-Hydro</i>^R							
1	F	34	8,13	76	165	17	Óbito
2	M	30	7,93	93	197	17	Sacrificado
3	F	35	6,77	79	194	17	Sacrificado
4	M	30	6,13	76	151	17	Sacrificado
5	M	27	6,20	62	168	15	Sacrificado
6	M	30	7,37	100	174	17	Sacrificado
7	M	35	6,73	49	162	17	Sacrificado
8	M	35	6,73	71	162	17	Sacrificado
9	M	33	6,60	48	86	17	Óbito
10	M	33	6,67	28	161	17	Sacrificado
11	M	32	6,77	34	161	17	Sacrificado
12	M	32	6,77	30	162	17	Sacrificado
16	F	30	7,67	39	154	19	Sacrificado
17	M	28	8,33	35	154	19	Sacrificado
	GÊNERO	PESO (Kg)	IDADE (meses)	CEC (min)	Sobrevida (dias)	TAMANHO PRÓTESE	STATUS
GRUPO Glutaraldeído							
13	M	35	6,30	38	161	17	Sacrificado
14	M	33	6,30	30	161	17	Sacrificado
15	M	33	6,50	25	161	17	Sacrificado

No Grupo *L-Hydro*^R, dois animais morreram antes do sacrifício. O primeiro, no 86º dia de pós operatório, teve como causa *mortis* endocardite,

confirmada por necropsia. Clinicamente, aquele animal havia apresentado febre nos dias que antecederam sua morte. Conforme definido pelo protocolo da pesquisa, foi isolado dos demais animais e recebeu tratamento antibiótico por seis dias. O segundo animal foi encontrado morto no 165º dia de pós operatório, enquanto aguardava o sacrifício. Clinicamente o animal apresentava febre e hipoatividade. Leucograma dosado na véspera do óbito revelou leucocitose importante ($20.100/\text{mm}^3$) sem desvio. Necropsia não mostrou evidência de endocardite. Havia, entretanto, sinais de infecção respiratória no pulmão direito (congestão e edema).

As **Figuras 2 e 3** mostram o aspecto final, pós implante, dos Grupos *L-Hydro^R* e Glutaraldeído, bem como a verificação dos parâmetros hemodinâmicos por catéter tipo *jelco* e pelo catéter de *Swan-Ganz*, pós implante e no sacrifício, respectivamente, de ambos os grupos.

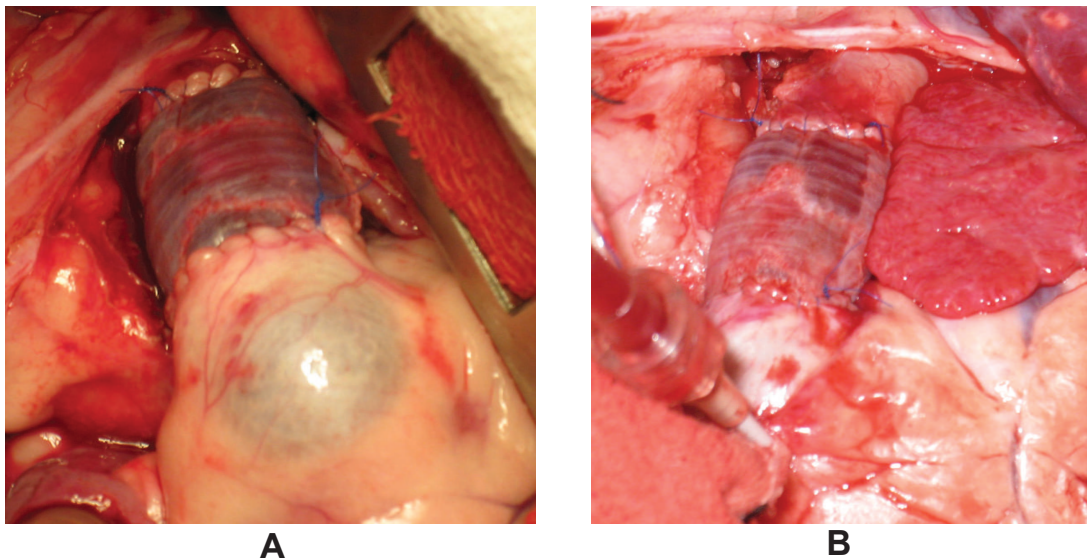


FIGURA 2 - A) Aspecto final pós implante Grupo *L-Hydro^R*; **B)** Aspecto final pós implante Grupo Glutaraldeído

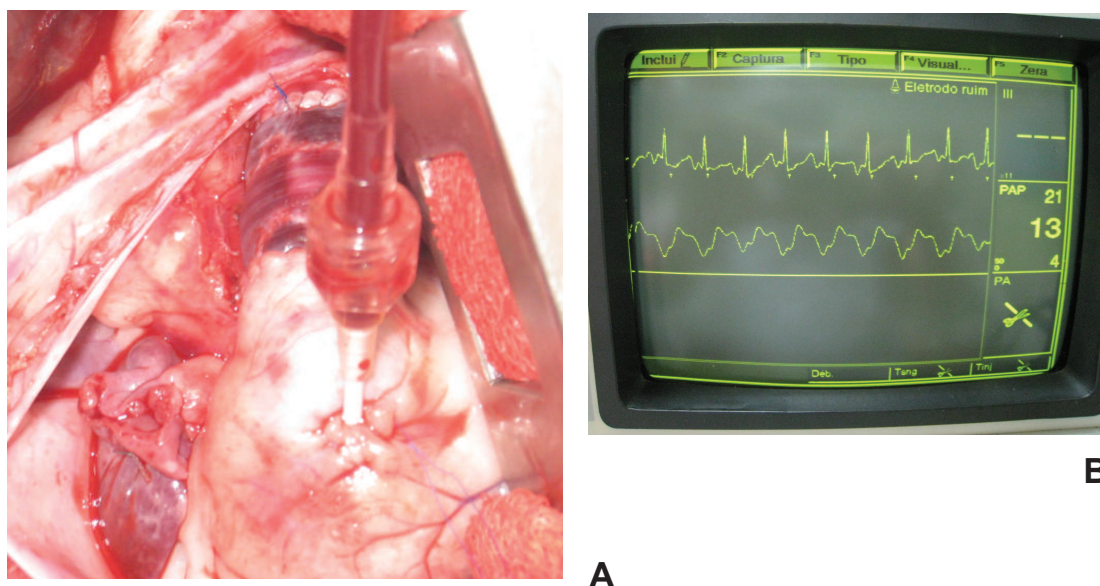


FIGURA 3 - A) Verificação dos parâmetros hemodinâmicos por catéter (pós implante); **B)** Verificação dos parâmetros hemodinâmicos por Swan-Ganz (sacrifício).

Todos os animais foram submetidos à avaliação laboratorial no pré-operatório, no sétimo dia de pós operatório (PO), no nonagésimo PO e antes do sacrifício. Os resultados desses exames não demonstraram alterações significantes. Os dados com os resultados destes exames encontram-se relacionados no Anexo 3.

1. Avaliação Hemodinâmica

Na cirurgia de implante das próteses, no Grupo *L-Hydro^R*, a média das pressões médias de ventrículo direito (PMVD) foram de 13,7 (+/-5,0), enquanto que no Grupo Glutaraldeído a média das PMVD foi de 10,0 (+/-2,2) ($p= 0,259$) - (Figura 4). Em relação à média das pressões médias da artéria pulmonar (PMAP) foi de 13,1 (+/-6,5) no Grupo *L-Hydro^R*, e de 7,3 (+/-1,2) no Grupo Glutaraldeído (Figura 5).

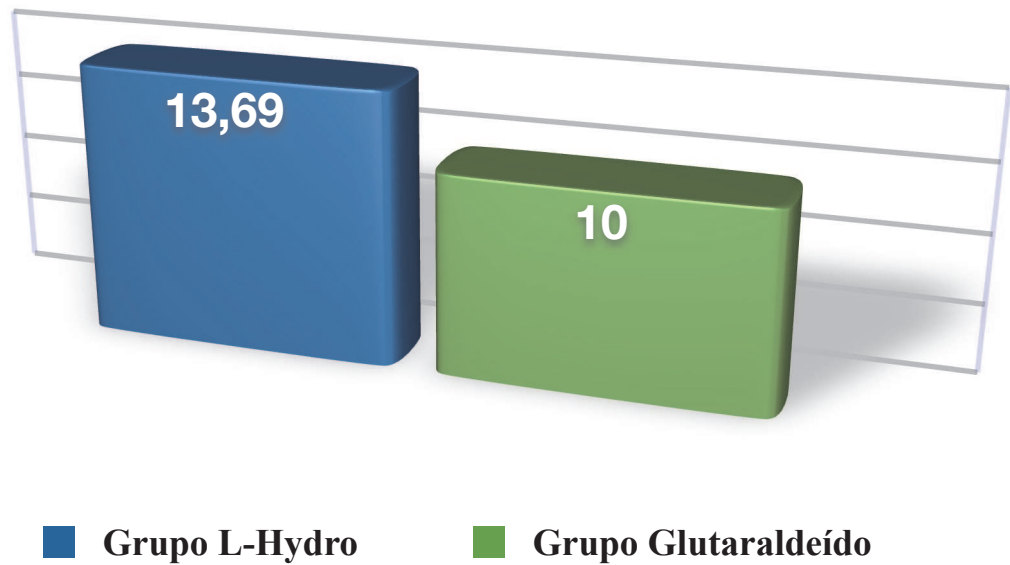


FIGURA 4: PMVD Grupos *L-Hydro*^R e Glutaraldeído (pós implante)

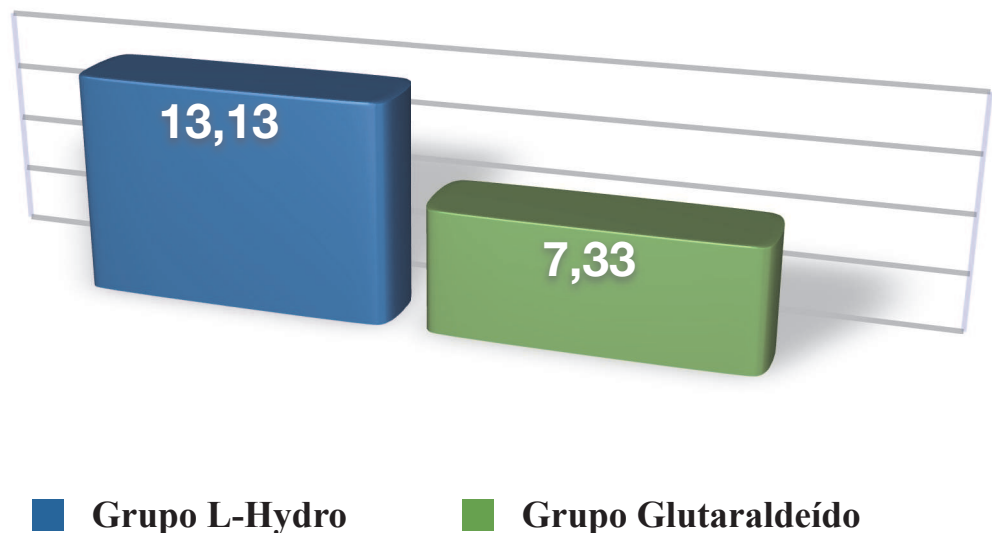


FIGURA 5: PMAP Grupos *L-Hydro*^R e Glutaraldeído (pós implante)

A média dos gradientes VD-AP foi de 10,0 (+/-7,6) no Grupo *L-Hydro*^R e 10,67 (+/-1,2) no Grupo Glutaraldeído ($p= 0,788$), conforme demonstrado na Figura 6.

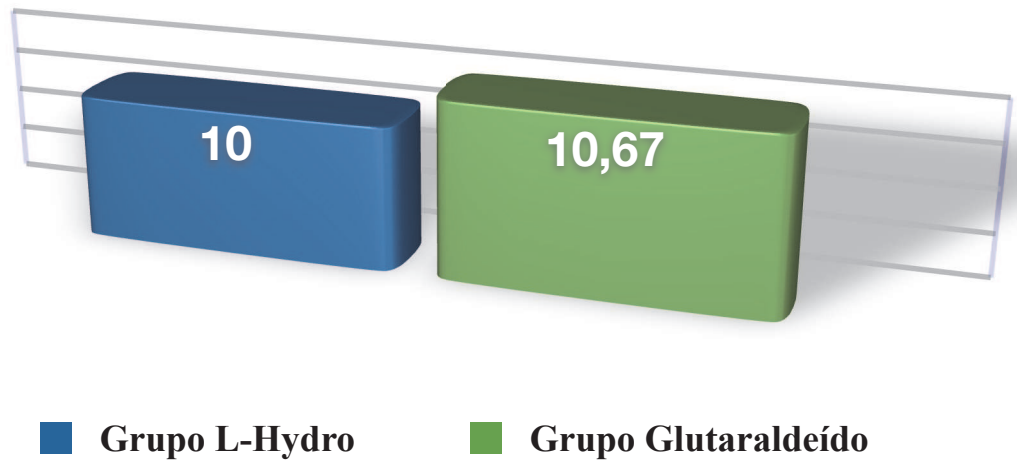


FIGURA 6: Gradiente VD-AP - Grupos *L-Hydro*^R e Glutaraldeído

Os valores médios da pressão sistólica da artéria pulmonar (PSAP), após o implante do enxerto (PSAP₁) foram de 24,4mmHg (+/-11,7) no Grupo *L-Hydro*^R e de 13,3mmHg (+/-2,9) no grupo Glutaraldeído (**p=0,036**). Já no sacrifício, a média da PSAP (PSAP₂) foi de 13,6mmHg (+/-7,6) no Grupo *L-Hydro*^R e de 17,7mmHg (+/-3,5) no Grupo Glutaraldeído (p= 0,070). Ver Figuras 7 e 8. A variação da PSAP entre os grupos foi significativa (**p= 0,030**), de acordo com a análise estatística de Mann-Whitney.

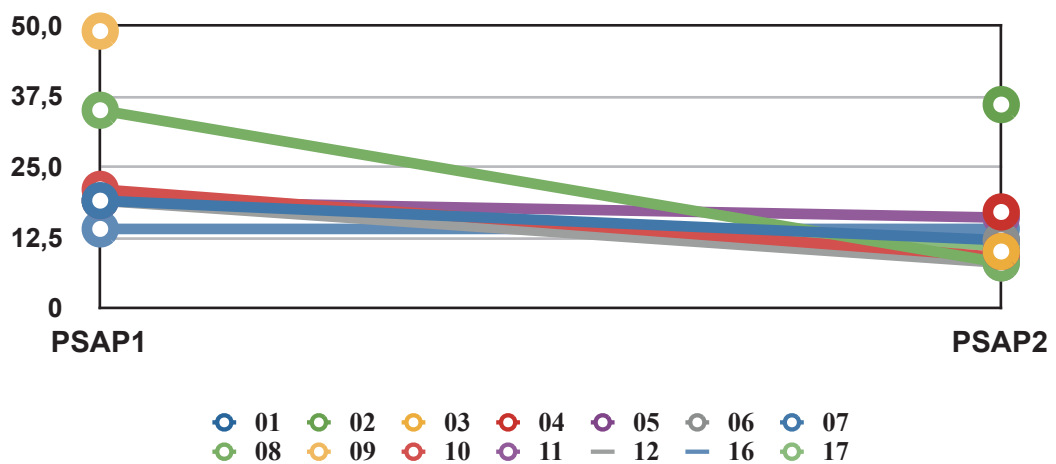


FIGURA 7: PSAP₁ X PSAP₂ - Grupo *L-Hydro*^R

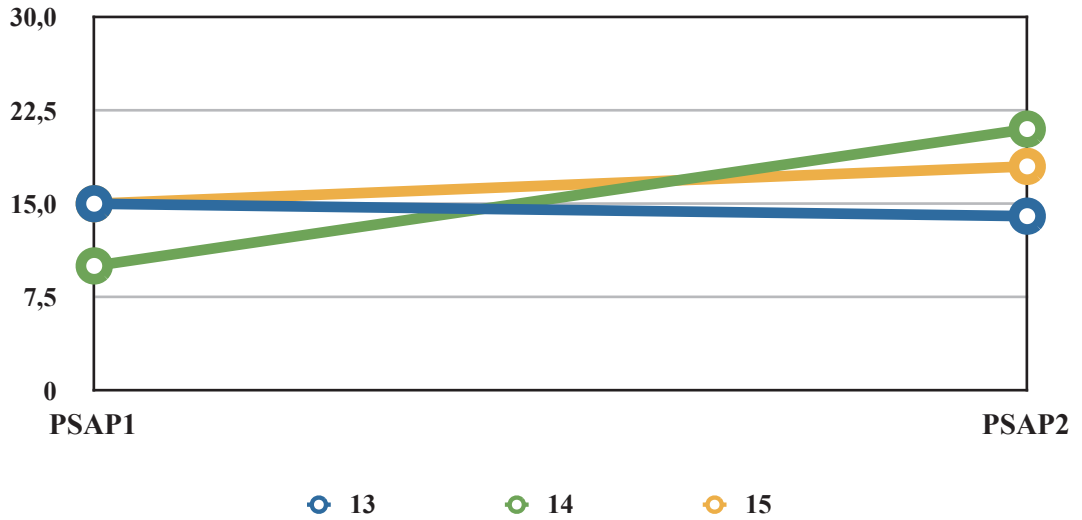


FIGURA 8: PSAP₁ X PSAP₂ - Grupo Glutaraldeído

Já a média das pressões médias do ventrículo direito (PMVD₁) no Grupo *L-Hydro*^R, após o implante do enxerto, foi de 13,7mmHg (+/-5,0), enquanto que antes do sacrifício (PMVD₂) foi de 15,8mmHg (+/-6,0). No Grupo Glutaraldeído, a média das PMVD₁, após o implante das próteses, foi de 10,0mmHg (+/-2,2), enquanto que antes do sacrifício a média das PMVD₂ foi de 17,5mmHg (+/-5,1) (Figuras 9 e 10).

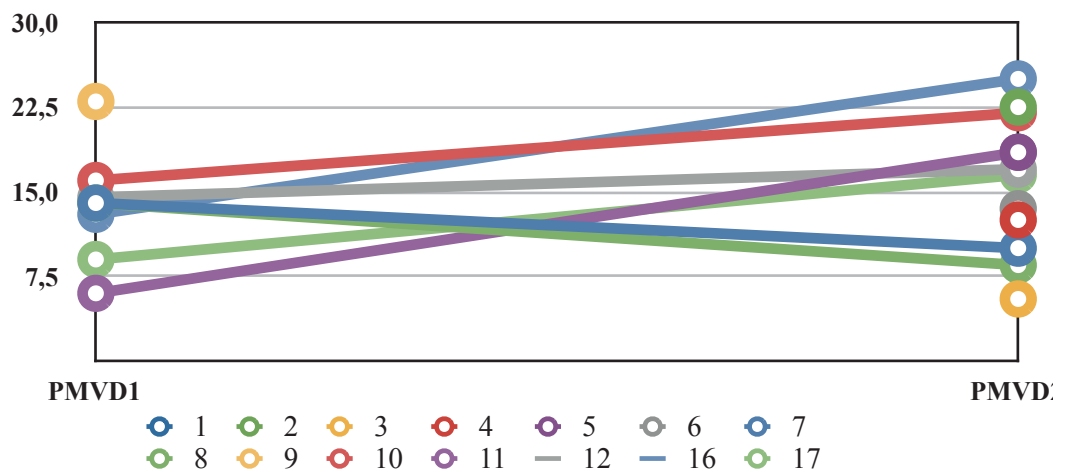


FIGURA 9: PMVD₁ X PMVD₂ - Grupo *L-Hydro*^R

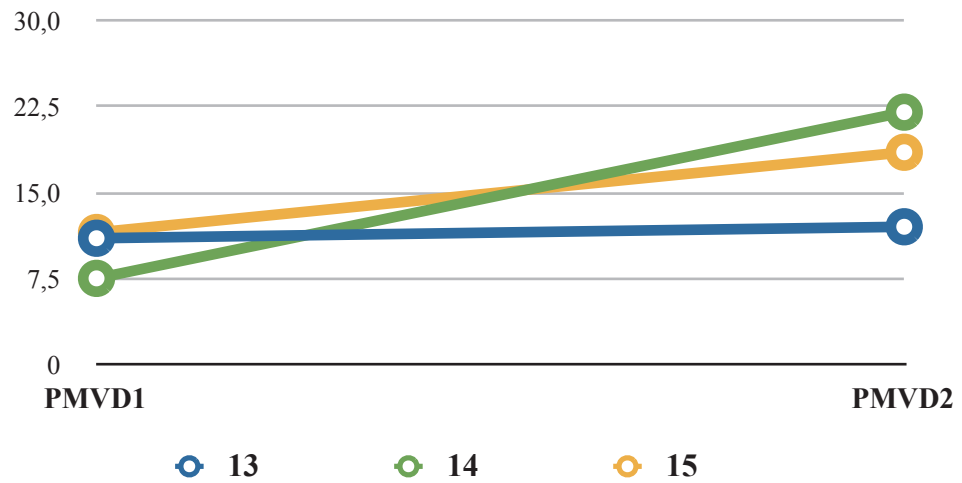


FIGURA 10: PMVD1 X PMVD2 - Grupo Glutaraldeído

Não houve significância na comparação dos dados inter grupos: Implante ($p= 0,259$) / Sacrificio ($p= 0,666$), assim como na análise de variação da PMVD ($p= 0,546$).

O gradiente sistólico (VD-AP) nos animais do Grupo *L-Hydro*^R variou após o implante do enxerto, entre zero e 19mmHg, média de 10,0mmHg ($\pm 7,6$), enquanto que no Grupo Glutaraldeído esse gradiente variou de 10 a 12, média de 10,7mmHg ($\pm 1,2$) ($p= 0,788$). Já antes do sacrificio, o gradiente sistólico (VD-AP) variou no Grupo *L-Hydro*^R entre hum e 23mmHg, média de 10,4mmHg ($\pm 7,6$) e no Grupo Glutaraldeído entre 4 e 8mmHg, média de 6,0mmHg ($\pm 2,0$) ($p= 0,346$). Ver Figuras 11 e 12.

Não houve significância na análise de variação do gradiente sistólico VD-AP entre os Grupos *L-Hydro*^R e Glutaraldeído ($p= 0,288$).

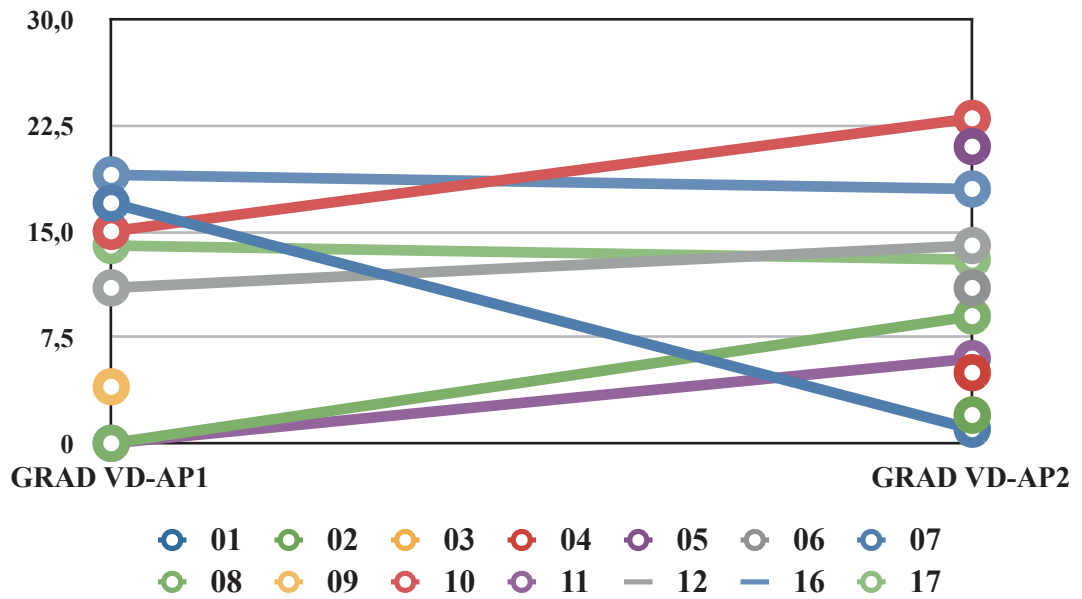


FIGURA 11: GRAD. VD-AP₁ X GRAD. VD-AP₂ - Grupo *L-Hydro*^R

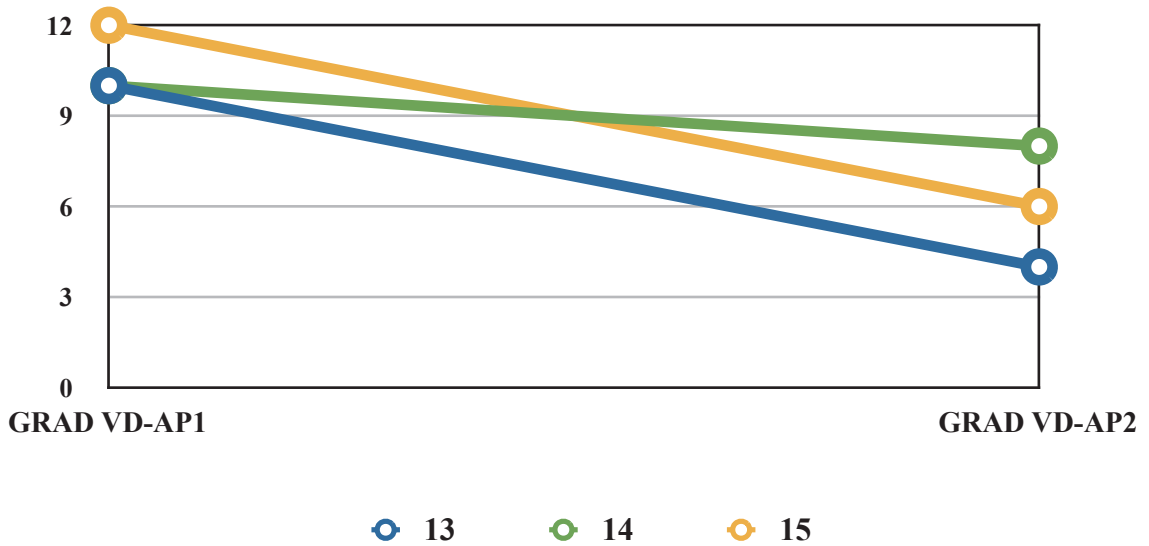


FIGURA 12: GRAD. VD-AP₁ X GRAD. VD-AP₂ - Grupo Glutaraldeído

Ainda em relação ao perfil hemodinâmico, a PAM variou no Grupo *L-Hydro*^R entre 85 e 137mmHg, média de 118,1mmHg (+/-17,0) e no Grupo Glutaraldeído entre 119 e 131, média de 126,3mmHg (+/-6,4) (p= 0,267). Ver Figura 13.

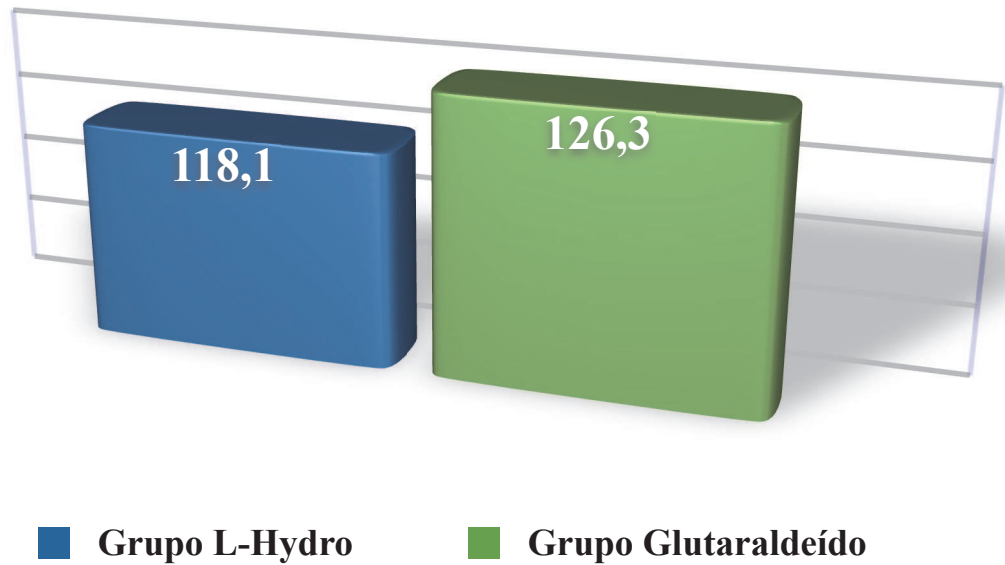


FIGURA 13: Média da PAM - Grupos *L-Hydro*^R e Glutaraldeído

A PCP variou no Grupo *L-Hydro*^R entre zero e 9 mmHg, média de 5,7mmHg (+/-2,5) e no Grupo Glutaraldeído, entre 6 e 11, média de 8,3mmHg (+/-2,5) (p= 0,327). Ver Figura 14.

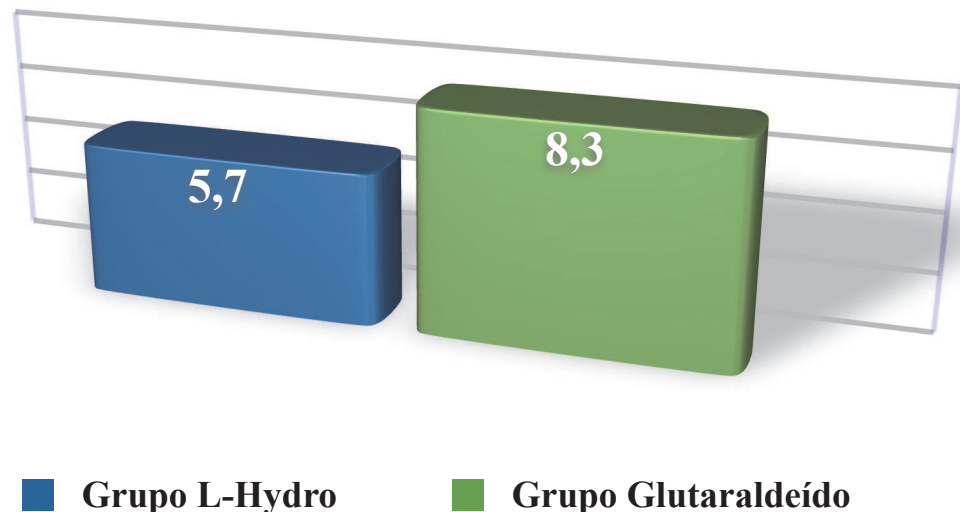


FIGURA 14: Média da PCP - Grupos *L-Hydro*^R e Glutaraldeído

Já o débito cardíaco médio (DCM) variou no Grupo *L-Hydro*^R entre 3,6 e 5,0 mmHg, média de 4,8mmHg (+/-1,5) e no Grupo Glutaraldeído, entre 4,5 e 7,8mmHg, média de 4,7mmHg (+/-0,3) - (p=0,484). Figura 15.

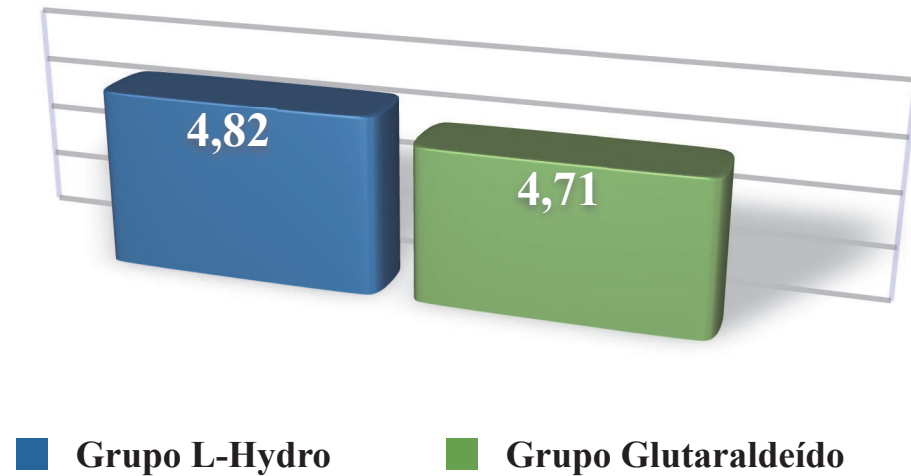


FIGURA 15: Média do DCM - Grupos *L-Hydro*^R e Glutaraldeído

As Tabelas 1 e 2 mostram as medidas hemodinâmicas obtidas por ocasião do sacrifício dos animais.

TABELA 1: Medidas hemodinâmicas (sacrifício)

GRUPO <i>L-Hydro</i> ^R	PVC	PSVD	PDVD	PMVD	PSAP	PDAP	PMAP	Grad S (VD-AP)
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	1	38	7	22,5	36	33	34	2
3	0	12	0	5,5	10	4	7	2
4	0	22	3	12,5	17	7	12	5
5	1	31	6	18,5	10	6	8	21
6	2	23	4	13,5	12	7	10	11
7	2	13	7	10	12	9	11	1
8	1	17	0	8,5	8	4	0	9
9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10	1	32	12	22	9	4	7	23
11	2	22	15	18,5	16	8	12	6
12	0	22	12	17	8	5	7	14
16	2	32	18	25	14	10	13	18
17	5	24	9	16,5	11	9	10	13
GRUPO Glutarald.	PVC	PSVD	PDVD	PMVD	PSAP	PDAP	PMAP	Grad S (VD-AP)
13	0	18	6	12	14	9	12	4,0
14	2	29	15	22	21	18	20	8,0
15	3	24	13	18,5	18	15	17	6,0

PVC: Pressão venosa central / **PSVD:** Pressão sistólica do ventrículo direito / **PDVD:** Pressão diastólica do ventrículo direito / **PMVD:** Pressão média do ventrículo direito / **PSAP:** Pressão sistólica da artéria pulmonar / **PDAP:** Pressão diastólica da artéria pulmonar / **PMAP:** Pressão média da artéria pulmonar / **Grad S(VD-AP):** Gradiente sistólico (ventrículo direito-artéria pulmonar). **NA:** Não avaliada.

TABELA 2: Medidas hemodinâmicas (sacrifício)

GRUPO <i>L-Hydro</i> ^R	PCP	PAS	PAD	PAM	DC 1	DC2	DC3	DCM
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	NA	99	68	85	4,33	4,14	4,06	4,18
3	8	139	102	122	3,77	3,77	3,64	3,73
4	5	126	101	114	3,73	4,09	3,57	3,80
5	7	144	106	122	5,25	3,81	4,52	4,53
6	5	152	116	137	4,79	5,19	4,75	4,91
7	7	118	92	95	4,1	3,58	3,72	3,80
8	0	146	110	127	5	4,8	5,21	5,00
9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10	3	145	114	129	NA	NA	NA	NA
11	6	139	100	118	4,39	3,16	3,34	3,63
12	7	124	96	112	4,26	4,03	4,77	4,35
16	6	138	91	109	7,84	8,73	7,5	8,02
17	9	163	129	147	7,83	7,96	5,56	7,12
GRUPO Glutarald.	PCP	PAS	PAD	PAM	DC 1	DC2	DC3	DCM
13	8	157	116	131	4,63	4,81	4,46	4,63
14	11	175	100	129	4,26	4,54	6,16	4,99
15	6	148	106	119	4,25	4,74	4,55	4,51

PCP: Pressão capilar pulmonar / **PAS:** Pressão arterial sistólica / **PAD:** Pressão arterial diastólica / **PAM:** Pressão arterial média / **DC₁:** Débito cardíaco (primeira medida) / **DC₂:** Débito cardíaco (segunda medida) / **DC₃:** Débito cardíaco (terceira medida) / **DCM:** Débito cardíaco médio. **NA:** Não avaliada.

A análise estatística das pressões obtidas na cirurgia do implante da prótese mostraram significância apenas na avaliação das pressões sistólicas de artéria pulmonar. Nessa variável, inclusive, a variação das PSAP entre os Grupos *L-Hydro*^R e Glutaraldeído também mostrou significância, conforme resumido na Tabela 3. Apesar disso, podemos afirmar que, do ponto de vista de comportamento hemodinâmico, ambas as próteses (preservadas em *L-Hydro*^R ou Glutaraldeído), possuem perfis semelhantes.

TABELA 3: Análise estatística variáveis quantitativas (hemodinâmica).

Variável*	Grupo <i>L-Hydro</i> ^R (n=14)	Grupo Glutaraldeído (n=3)	Valor de p†
Variáveis quantitativas			
PAM (sacrifício)	117(+/- 15)	129(+/- 19)	0,267
PVC	1,0(+/- 1,6)	1,7(+/- 1,5)	0,336
PCP (sacrifício)	5,9(+/- 2,8)	7,7(+/- 1,5)	0,327
PSAP (cirurgia)	24,4(+/-10,9)	13,3(+/-2,9)	0,036
PSAP (sacrifício)	13,6(+/- 7,6)	17,7(+/- 3,5)	0,070
Variação PSAP	9,7(+/- 8,7)	-4,3(+/- 6,1)	0,030
PMVD (cirurgia)	13,7(+/- 5,0)	10,0(+/- 2,2)	0,259
PMVD (sacrifício)	15,8(+/- 6,0)	17,5(+/- 5,1)	0,666
Variação PMVD	-4,4(+/- 7,2)	-7,5(+/- 6,8)	0,546
Gradiente sistólico VD-AP (cirurgia)	9,9(+/- 7,8)	10,7(+/- 1,2)	0,788
Gradiente sistólico VD-AP (sacrifício)	10,4(+/- 7,6)	6,0(+/- 2,0)	0,346
Variação gradiente sistólico VD-AP	-1,2(+/- 8,7)	4,7(+/- 2,3)	0,288
DCM	4,8(+/- 1,5)	4,7(+/- 0,25)	0,484
*Dados em média / desvio-padrão — variáveis quantitativas			
†Teste t de Mann-Whitney (variáveis quantitativas)			

4. Avaliação Angiográfica

A angiografia verificou as seguintes variáveis:

- a. Contratilidade do ventrículo direito;
- b. Obstrução da via de saída do ventrículo direito;
- c. Estenose valvar pulmonar;
- d. Refluxo valvar pulmonar;
- e. Estenose da artéria pulmonar;
- f. Refluxo tricúspide.

No momento da cirurgia de implante do tubo valvado, a contratilidade do ventrículo direito estava preservada em todos os animais. Do mesmo modo, não foi verificada obstrução da VSVD, estenose pulmonar valvar ou refluxo tricúspide em qualquer dos animais. Apenas um animal apresentava discreto refluxo da válvula pulmonar. Um outro animal apresentava discreta estenose da artéria pulmonar.

Do mesmo modo, no momento do sacrifício, apenas dois casos do grupo teste apresentaram redução discreta da contratilidade do ventrículo direito e apenas um caso do mesmo grupo apresentava discreta obstrução da via de saída do ventrículo direito (Tabela 4).

TABELA 4: Contratilidade do VD e obstrução da VSVD pela angiografia

GRUPO <i>L-Hydro</i> ^R	Contratilidade do VD (sacrifício)	Obstrução VSVD (sacrifício)
1	NA	NA
2	Preservada	Não
3	Preservada	Não
4	Diminuída	Não
5	Preservada	Discreta
6	Preservada	Não
7	Preservada	Não
8	Preservada	Não
9	NA	NA
10	Preservada	Não
11	Preservada	Não
12	Preservada	Não
16	Preservada	Não
17	Diminuída	Não
GRUPO Glutaraldeído	Contratilidade do VD (sacrifício)	Obstrução VSVD (sacrifício)
13	Preservada	Não
14	Preservada	Não
15	Preservada	Não

NA: Não avaliado

No sacrifício, quatro animais do grupo teste apresentavam discreta estenose ao nível da válvula pulmonar. Não foi detectada estenose do tubo valvado em nenhum animal no momento do sacrifício (Tabela 5). Já a variável refluxo valvar demonstrou que seis animais do grupo teste e um do grupo controle apresentavam refluxo discreto, três apresentavam refluxo moderado (dois do grupo controle) e dois animais (do grupo teste) apresentavam refluxo importante. Três animais (dois do grupo teste) apresentavam refluxo tricúspide discreto. Em outros três (grupo teste), o refluxo era moderado (Tabela 6). Apesar disso, não houve significância na avaliação de refluxo valvar pulmonar ($p= 0,242$) e refluxo tricúspide ($p= 1,0$).

TABELA 5: Estenose valvar e estenose da AP pela angiografia

GRUPO <i>L-Hydro^R</i>	Estenose Valvar (sacrifício)	Estenose AP (sacrifício)
1	NA	NA
2	Discreta	Não
3	Não	Não
4	Não	Não
5	Discreta	Não
6	Não	Não
7	Não	Não
8	Discreta	Não
9	NA	NA
10	Discreta	Não
11	Não	Não
12	Não	Não
16	Não	Não
17	Não	Não
GRUPO Glutaraldeído	Estenose Valvar (sacrifício)	Estenose AP (sacrifício)
13	Não	Não
14	Não	Não
15	Não	Não

TABELA 6: Refluxo valvar pulmonar e refluxo tricúspide - angiografia

GRUPO <i>L-Hydro^R</i>	Refluxo Valvar Pulmonar (sacrifício)	Refluxo Tricúspide (sacrifício)
1	NA	NA
2	Discreto	Moderado
3	Não	Discreto
4	Importante	Não
5	Discreto	Não
6	Importante	Moderado
7	Discreto	Não
8	Discreto	Não
9	NA	NA
10	Não	Não
11	Não	Não
12	Discreto	Não
16	Discreto	Discreto
17	Moderada	Moderado
GRUPO Glutaraldeído	Refluxo Valvar Pulmonar (sacrifício)	Refluxo Tricúspide (sacrifício)
13	Moderada	Discreto
14	Moderada	Não
15	Discreto	Não

3. Avaliação Radiológica (mamografia)

A detecção de calcificação, pela técnica mamográfica, das próteses preservadas em *L-Hydro^R*, limitou-se à zona de costura da prótese (Figuras 16 e 17).

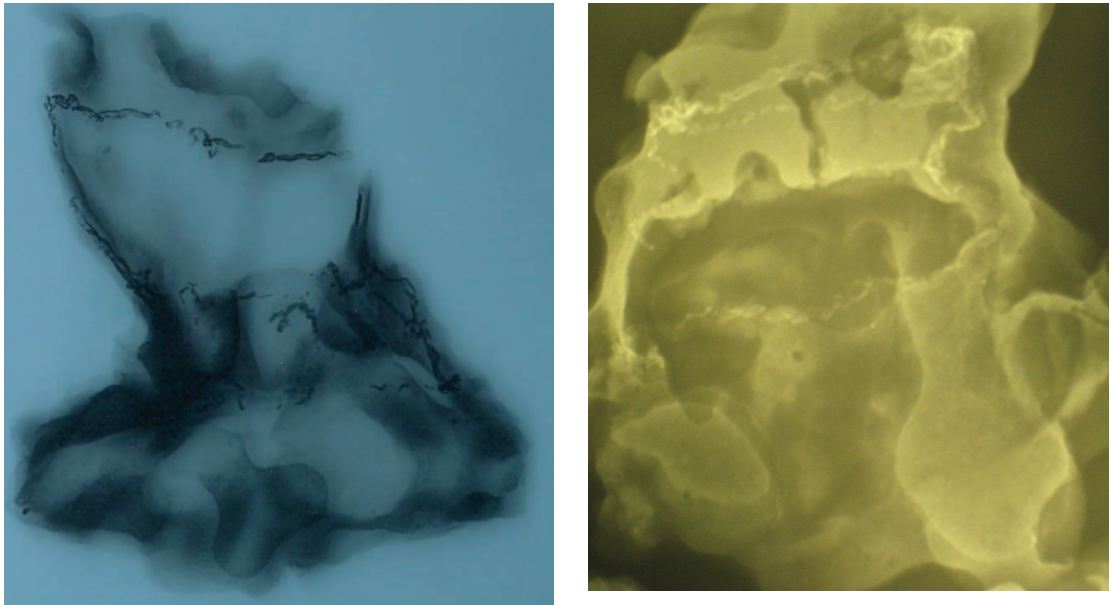


FIGURA 16: Aspecto radiológico de prótese preservada em *L-Hydro^R*

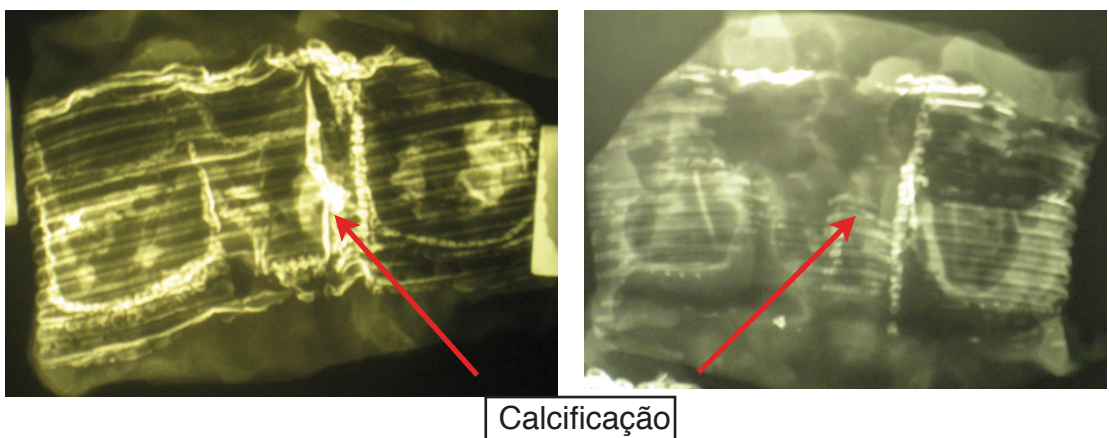


FIGURA 17: Aspecto radiológico de próteses preservada em glutaraldeído - setas indicando calcificação difusa.

Já nas próteses preservadas em glutaraldeído, essa calcificação ocorreu em todas as próteses e se estendeu à parede do tubo e das cúspides valvares. De acordo com a classificação de Grabenwöger (GRABENWÖGER *et al*, 1992), o caso 13 apresentou calcificação moderada (grau 2), os casos 14 e 15 apresentaram calcificação importante (grau 3) - (Tabela 7).

TABELA 7: Mensuração de calcificação: **0**- Ausência de calcificação; **1**- Calcificação leve; **2**- Calcificação moderada; **3**- Calcificação importante.

GRUPO <i>L-Hydro</i> ^R	Calcificação de folheto mamografia	Calcificação do tubo mamografia
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
16	0	0
17	0	0
GRUPO Glutaraldeído	Calcificação de folheto mamografia	Calcificação do tubo mamografia
13	2	2
14	3	3
15	3	3

A análise estatística revelou diferença significativa ($p = 0,001$) na comparação entre os Grupos *L-Hydro*^R e Glutaraldeído, conforme demonstrado na Tabela 8.

TABELA 8: Análise estatística mamografia (Grupos *L-Hydro^R* e Glutaraldeído).

Variável*	Grupo <i>L-Hydro^R</i> (n=14)	Grupo Glutaraldeído (n=3)	Valor de p†
Calcificação dos folhetos (mamog.)	0(0%)	3 (100%)	0,001
Calcificação do tubo (mamog.)	0(0%)	3 (100%)	0,001
*Dados em número absoluto (porcentagem) — variáveis categóricas			
†Teste do exato de Fisher			

4. Avaliação Macroscópica

A avaliação macroscópica das próteses foi realizada em todos os animais. Em quatro animais (Grupo *L-Hydro^R*), foi observada a presença de vegetação compatível com endocardite. Um desses animais foi encontrado morto no 86º PO. Apesar disso, não houve crescimento bacteriano que confirmasse a impressão macroscópica. Todas as próteses do Grupo Glutaraldeído mostravam calcificação macroscópica dos folhetos e do tubo. Em duas destas próteses a calcificação foi quantificada como severa. Já dentre as próteses do Grupo *L-Hydro^R*, duas (14,3%) demonstravam calcificação quantificada como leve, do tubo. Apenas em um dos folheto de uma das próteses foi verificada a presença de calcificação, quantificada como leve (Tabela 9).

Outro achado verificado na avaliação macroscópica foi a aderência parcial ou total dos folhetos à parede do tubo. Isso ocorreu em 7 (50%) animais, todos do Grupo *L-Hydro^R*. Em três animais (21,4%), todos os folhetos da prótese estavam aderidos à parede do tubo. Dois animais

(14,3%) apresentavam hum dos folhetos aderidos e em outros dois animais (14,3%), dois folhetos encontravam-se aderidos à parede do tubo. Não havia sinais de aderência de folhetos à parede do tubo nos animais do Grupo Glutaraldeído.

TABELA 09: Mensuração de calcificação: **0-** ausência de calcificação; **1-** calcificação leve; **2-** calcificação moderada; **3-** calcificação importante. Avaliação de aderência de folhetos (N: número de folhetos aderidos).

GRUPO <i>L-Hydro</i>^R	Calcificação de folheto	Calcificação do tubo	Aderência de folheto(s) - (N)
1	0	0	3
2	0	1	0
3	0	0	0
4	0	0	2
5	1	0	0
6	0	1	0
7	0	0	1
8	0	0	1
9	0	0	3
10	0	0	0
11	0	0	3
12	0	0	2
16	0	0	0
17	0	0	0
GRUPO Glutaraldeído	Calcificação de folheto	Calcificação do tubo	Aderência de folheto(s) - (N)
13	2	2	0
14	3	3	0
15	3	3	0

Nas variáveis calcificação de tubos e calcificação de folhetos houve significância ($p= 0,001$) na comparação entre os Grupos *L-Hydro*^R e Glutaraldeído. Já na variável aderência de folhetos, essa diferença

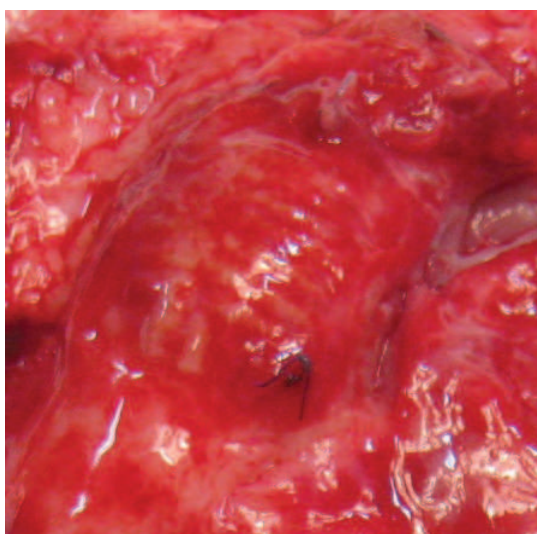
estatística não foi observada ($p= 0,228$), conforme demonstrado na Tabela 10.

TABELA 10: Análise estatística da macroscopia (Grupos *L-Hydro*^R e Glutaraldeído)

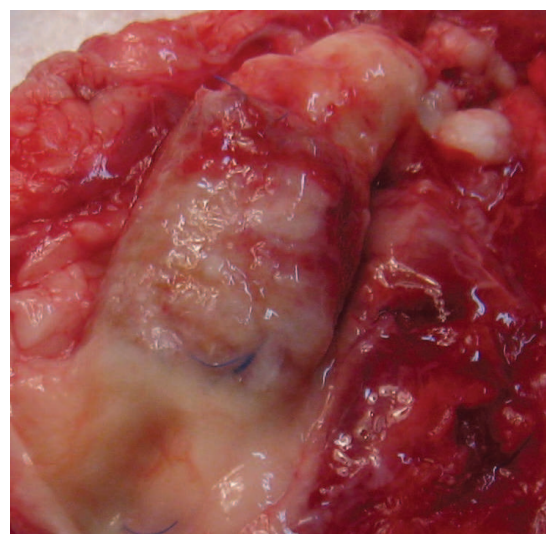
Variável*	Grupo <i>L-Hydro</i> ^R (n=14)	Grupo Glutaraldeído (n=3)	Valor de p†
Calcificação das cúspides (macroscopia)	0(0%)	3(100%)	0,001
Calcificação do tubo (macroscopia)	0(0%)	3(100%)	0,001
Aderência dos folhetos (microscopia)	7(50%)	0(0%)	0,228

*Dados em número absoluto (porcentagem) — variáveis categóricas
†Teste do exato de Fisher (variáveis categóricas)

As Figuras 18 e 19 mostram o aspecto macroscópico das próteses explantadas (Grupo *L-Hydro*^R e Glutaraldeído).

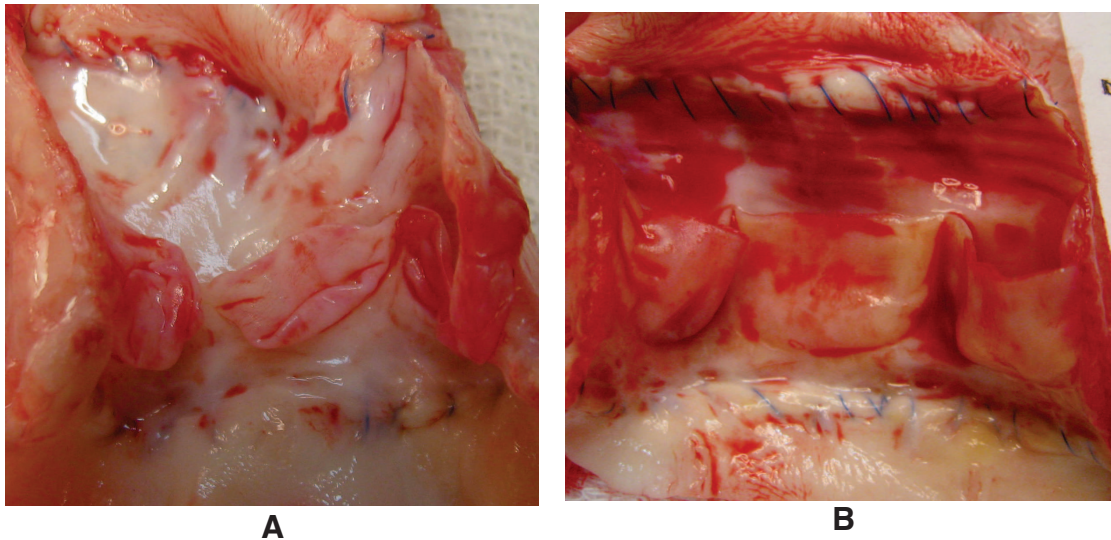


A



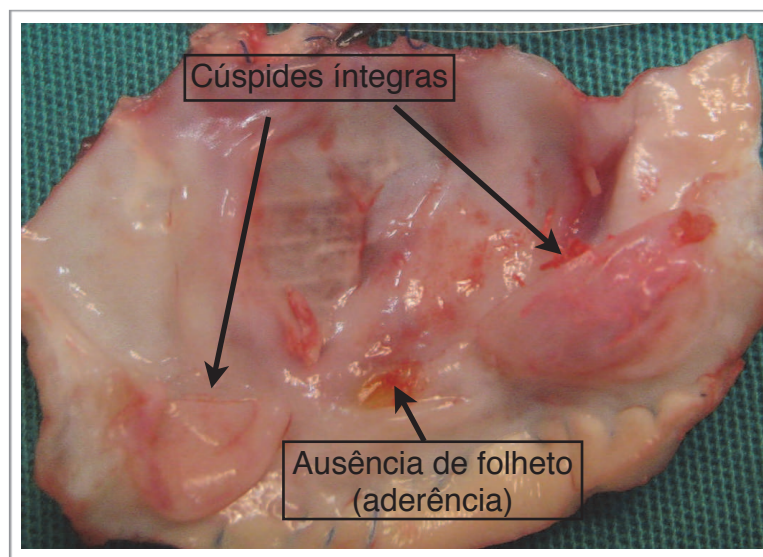
B

FIGURAS 18 - Aspecto macroscópico pós explante: **A)** Tubo Grupo *L-Hydro*^R; **B)** Tubo Grupo Glutaraldeído.

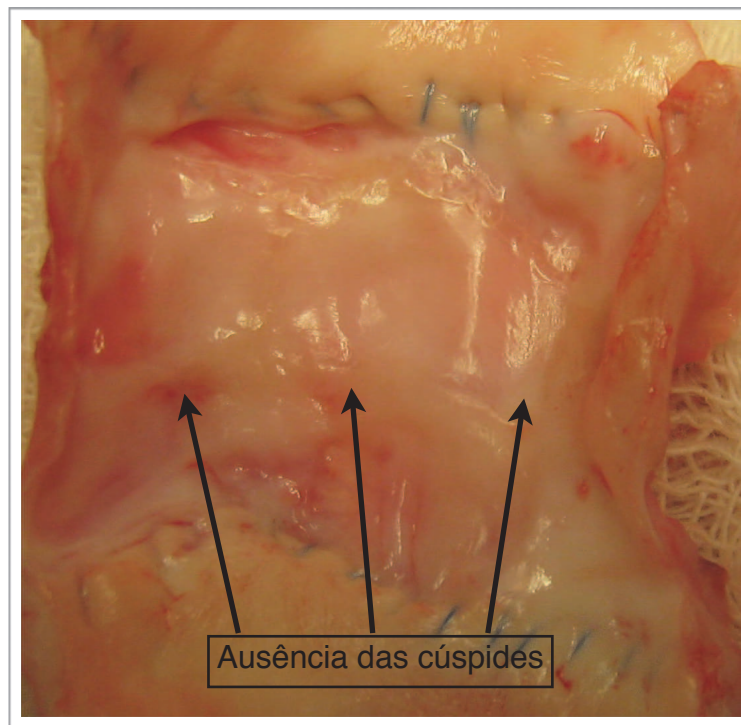


FIGURAS 19 - Aspecto macroscópico pós explante: **A)** Cúspides Grupo *L-Hydro*^R; **B)** Cúspides Grupo Glutaraldeído.

As Figuras 20 e 21 mostram o aspecto macroscópico das próteses explantadas do Grupo *L-Hydro*^R, que apresentavam aderência parcial ou total dos folhetos à parede do tubo.



FIGURAS 20 - Aspecto macroscópico pós explante - Aderência parcial de cúspide à parede do tubo - Grupo *L-Hydro*^R.



FIGURAS 21 - Aspecto macroscópico pós explante - Aderência total das cúspides à parede do tubo Grupo *L-Hydro^R*.

5. Avaliação Microscopia Ótica

A avaliação microscópica foi realizada em 16 animais, sendo 13 do Grupo *L-Hydro^R* e três do Grupo Glutaraldeído (Tabela 11). A coloração pelo método hematoxilina-eosina mostrou sinais de calcificação nas cúspides de sete dos 13 animais do Grupo *L-Hydro^R* (53,8%), bem como no tubo de dez dos 13 animais deste mesmo grupo (77%). Essa calcificação, entretanto foi quantificada como leve em todos os casos. Nenhum animal do Grupo *L-Hydro^R* teve calcificação moderada ou severa de suas cúspides ou tubo (Figuras 22, 23 e 24).

TABELA 11: Mensuração de calcificação: **0-** ausência de calcificação; **1-** calcificação leve; **2-** calcificação moderada; **3-** calcificação importante.

GRUPO <i>L-Hydro</i> ^R	Calcif. folheto	Calcif. tubo
1	NA	NA
2	1	1
3	1	1
4	0	0
5	1	1
6	0	1
7	0	1
8	0	0
9	1	1
10	0	1
11	1	1
12	1	1
16	1	1
17	0	0
GRUPO Glutaraldeído	Calcif. folheto	Calcif. tubo
13	3	3
14	3	3
15	3	3

NA: Não avaliada

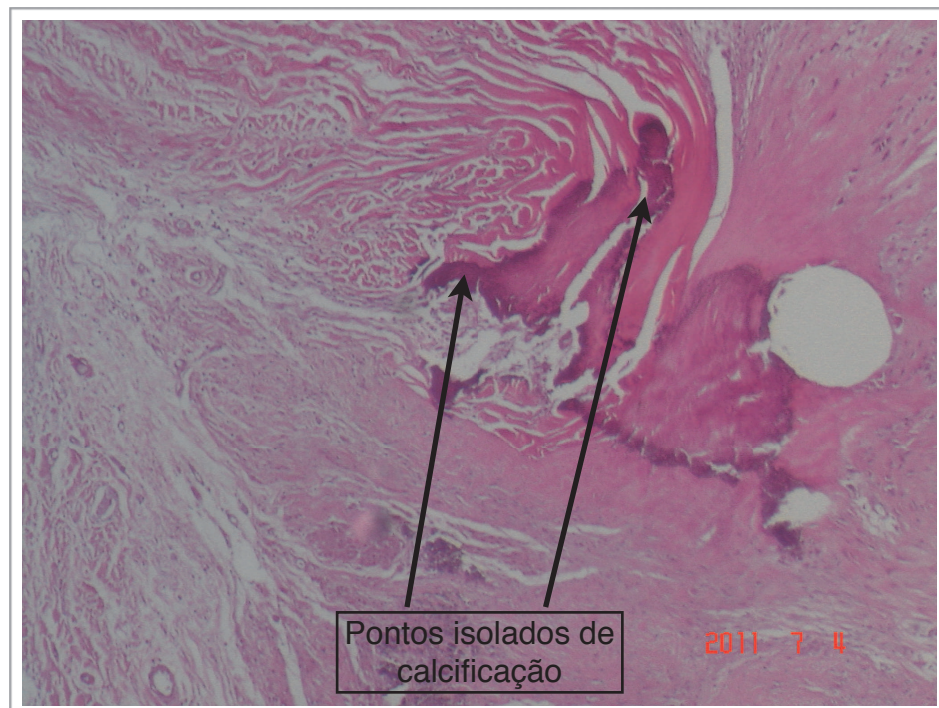


FIGURA 22: Aspecto microscópico das próteses preservadas em *L-Hydro*^R (coloração em hematoxilina-eosina), mostrando, em lilás, os pontos isolados de calcificação.

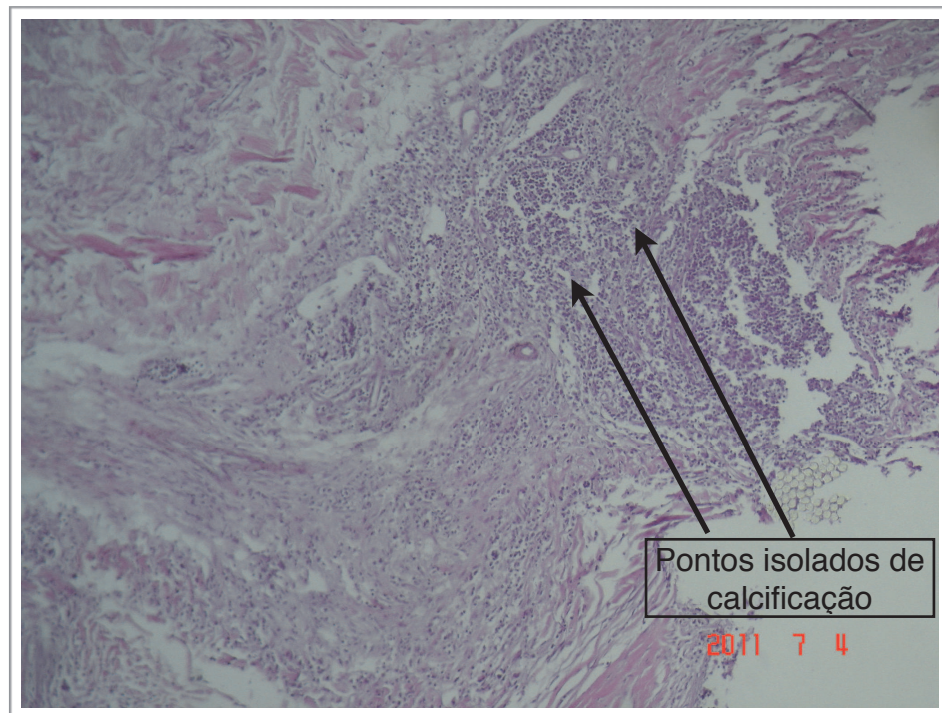


FIGURA 23: Aspecto microscópico das próteses preservadas em *L-Hydro^R* (coloração em hematoxilina-eosina), mostrando, em lilás, os pontos isolados de calcificação.

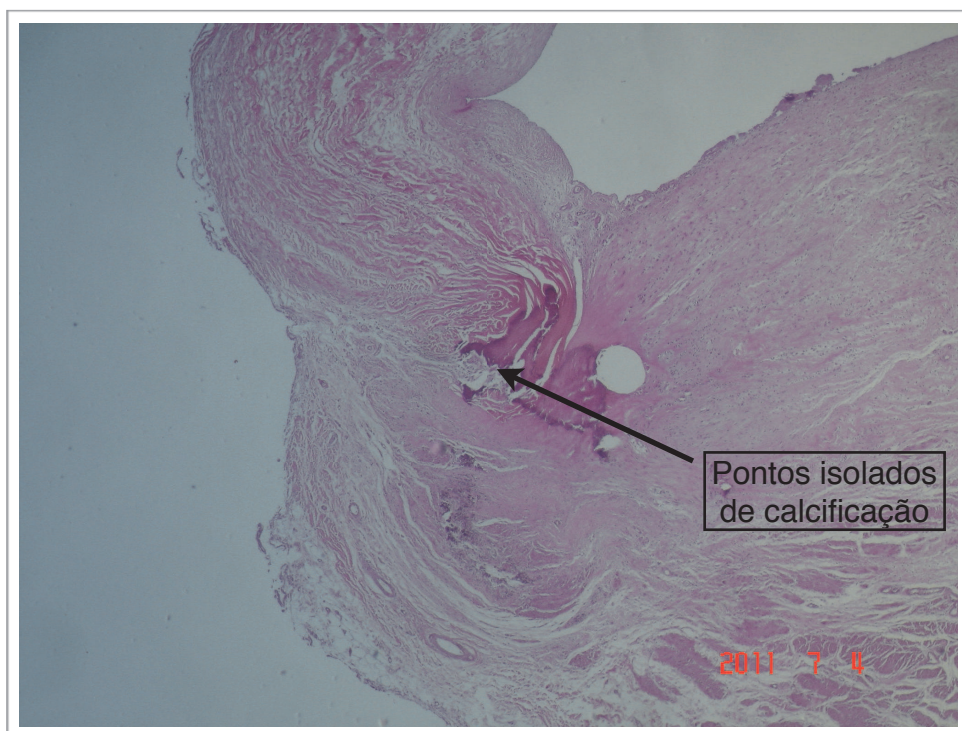
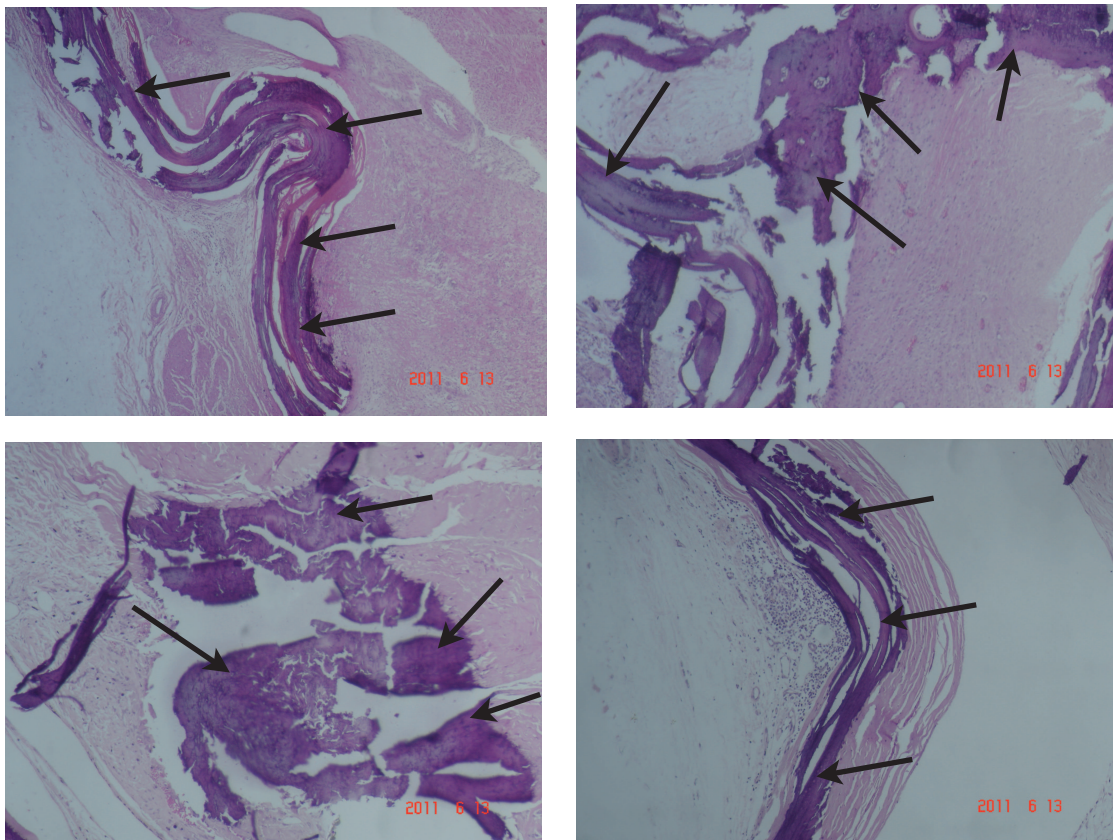


FIGURA 24: Aspecto microscópico das próteses preservadas em *L-Hydro^R* - coloração em hematoxilina-eosina. Em lilás, os pontos isolados de calcificação.

A avaliação microscópica dos animais do Grupo Glutaraldeído mostrou calcificação importante de todas as cúspides e fragmentos de tubo avaliados. A microscopia mostrou, ainda, processo inflamatório macrófagico com depósitos fibrinóides e ausência de trombos ou coágulos nas amostras analisadas de ambos os Grupos (Figuras 25).



FIGURAS 25: Aspecto microscópico (microscopia ótica) das próteses preservadas em glutaraldeído - coloração em hematoxilina-eosina. Em lilás, regiões de calcificação difusa e severa (setas).

A análise estatística dos resultados demonstra diferença significativa ($p=0,001$) nas variáveis calcificação de cúspides e de tubo na comparação entre os Grupos *L-Hydro^R* e Glutaraldeído - (Tabela 12).

TABELA 12: Análise estatística microscopia (Grupos *L-Hydro^R* e Glutaraldeído)

Variável*	Grupo <i>L-Hydro^R</i> (n=14)	Grupo Glutaraldeído (n=3)	Valor de p†
Calcificação das cúspides (microscopia)	0(0%)	3(100%)	0,001
Calcificação do tubo (microscopia)	0(0%)	3(100%)	0,001

*Dados em número absoluto(porcentagem)- †Teste exato de Fisher (variáveis categóricas)

6. Espectrofotometria de Absorção Atômica

A dosagem de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica demonstrou maior concentração de cálcio nas próteses preservadas em glutaraldeído, quando comparadas àquelas preservadas em *L-Hydro^R*.

A análise estatística dos dados demonstraram diferença significativa quanto à dosagem de cálcio, quando comparados os Grupo *L-Hydro^R* e Glutaraldeído ($p= 0,017$). A Tabela 13 mostra os valores obtidos a partir dessa técnica.

TABELA 13: Dosagem de Cálcio (ug/mg) por espectrofotometria de absorção atômica.

GRUPO <i>L-Hydro</i>^R	Abs. Atômica
1	43,84
2	139,44
3	48,7
4	14,2
5	25,7
6	240,9
7	206,6
8	98,3
9	58,39
10	53,76
11	38,97
12	22,4
16	64,04
17	50,01
GRUPO Glutaraldeído	Abs. Atômica
13	318,3
14	193,32
15	720,3

(p = 0,017)

†Teste t de Mann-Whitney (variáveis quantitativas)

DISCUSSÃO

O uso de substitutos valvares para tratamento de doenças que acometem as valvas cardíacas datam da década de 60 do século passado. Essa modalidade terapêutica tem conferido melhora da qualidade de vida e da própria sobrevida dos pacientes, quando comparada ao tratamento clínico.

O desenvolvimento de método de preservação deve contemplar também mecanismo confiável de esterilização, manutenção das propriedades mecânicas e prevenção da desnaturação do colágeno, bem como das reações imunológicas, a partir da formação de compostos antigênicos. Tais fatores, aliás, respondem em grande proporção pelo processo de calcificação das próteses, sobretudo, daquelas preservadas em glutaraldeído.

O implante de próteses valvares biológicas que permitam e promovam o revestimento espontâneo com células do hospedeiro foi proposta por FRATER *et al.* (1992) e é o princípio que embasou o desenvolvimento da preservação em *L-Hydro*^R, utilizada neste estudo.

A pesquisa em torno desse assunto tem mobilizado estudiosos na busca por métodos que diminuam as reações adversas citadas acima. Neste contexto, o glutaraldeído, além de ser um dos primeiros compostos utilizados na preservação de próteses valvares biológicas, é também o mais usado na prática clínica atualmente (GRABENWÖGER *et al.*, 1996; VICENTELLI *et al.*, 1998; MIRZAE *et al.*, 2000).

No presente estudo, utilizou-se como agente de preservação o *L-Hydro^R* em tubo valvado de pericárdio bovino, implantado na via de saída do ventrículo direito de carneiros. Esses animais têm sido utilizados por diversos autores e possuem a característica de serem dóceis e permitirem o fácil manejo durante todo o período de teste. Por se tratar de animal de grande porte e por possuir crescimento e desenvolvimento rápido, as alterações fisiopatológicas se assemelham àquelas que ocorrem no homem durante a vida. O tempo de, pelo menos 150 dias, foi necessário para que o carneiro apresentasse seu desenvolvimento pômbero-estatural adequado compatível com a vida adulta (GREHAN *et al.*, 2001) podendo-se constatar ou não a ocorrência de calcificação, assim como analisar, nesse tipo de bioprótese, o desempenho hemodinâmico da mesma, tanto quanto seu desgaste.

O comportamento intra-operatório não diferiu nos dois grupos, sendo que, o tempo de CEC e a baixa mortalidade (dois animais) demonstram a exequibilidade e reprodutibilidade do procedimento.

Apesar de ter ocorrido discreto aumento na pressão média do ventrículo direito (PMVD) quando se comparou tais valores no momento do implante e antes do sacrifício dos animais, esse comportamento foi uniforme nos dois grupos. Os demais parâmetros hemodinâmicos tiveram o mesmo comportamento. Isso nos permite afirmar que o PEG manteve as propriedades do enxerto e, portanto, sua funcionalidade. A exemplo do demonstrado por SANTOS *et al.*, em 2007, que testou a incidência de calcificação em próteses porcinas preservada em *L-Hydro^R*, implantada em posição aórtica de carneiros, comparando-as com próteses preservadas em

glutaraldeído, no presente estudo, não foram observadas diferenças no desempenho hemodinâmico das duas próteses. Ao contrário, NINA *et al.*, 2003, ao analisar o comportamento hemodinâmico de próteses porcinas preservadas em *L-Hydro*^R e compará-las às preservadas em glutaraldeído, encontrou pressões capilares pulmonares maiores neste grupo, sendo esta diferença significativa.

No presente estudo, a avaliação angiográfica mostrou maior incidência de refluxo nas próteses do grupo *L-Hydro*^R quando comparadas ao grupo Glutaraldeído. Isso pode ser explicado pela ocorrência, no grupo teste, de aderência parcial ou total das cúspides à parede do tubo em 07/14 próteses (50%). As demais variáveis (estenose valvar ou do tubo, contratilidade ou obstrução da via de saída do VD, refluxo tricúspide), mostraram comportamento uniforme, Nenhuma das variáveis hemodinâmicas revelou diferença significativa.

A exemplo dos estudos de NINA *et al.*, em 2003, SANTOS *et al.*, em 2007 e REY *et al.*, em 2011, a avaliação radiológica, no presente estudo, demonstrou diferença significativa na verificação de calcificação das próteses que tiveram preservação em *L-Hydro*^R, *versus* aquelas que foram preservadas em glutaraldeído. Essas últimas com maior grau de calcificação.

Do mesmo modo, a exemplo desses estudos, a avaliação macroscópica e microscópica demonstraram maior grau de calcificação nas biopróteses preservadas em glutaraldeído. A avaliação macroscópica analisou a presença de pontos de calcificação, o que foi verificado em todas as próteses do Grupo Glutaraldeído. Macroscopicamente, apenas uma das

cúspides do Grupo *L-Hydro*^R apresentava calcificação quantificada como leve. Não foi observada a presença de trombos em nenhum dos grupos. Ao contrário, REY *et al.* (2011) encontraram trombo em cúspide e no seio de Valsalva de homoenxertos preservados em *L-Hydro*^R.

Em relação à microscopia, os resultados demonstram maior calcificação das próteses preservadas em glutaraldeído, assim como os estudos de NINA *et al.* (2003) e SANTOS *et al.* (2007). No caso das próteses preservadas em *L-Hydro*^R, NINA *et al.* (2003), constataram, através da microscopia eletrônica de varredura, a formação de um novo endotélio, resistente à insudação de proteínas plasmáticas e sais, que são precursoras da degeneração bioprotética. Em suas observações, NINA *et al.* (2003) concluíram que a ausência de toxicidade, característica da preservação em *L-Hydro*^R, permitiu que a matriz das próteses do grupo teste se tornasse biocompatível, possibilitando a reendotelização espontânea, favorecendo maior resistência à calcificação e trombogenicidade. Através da microscopia eletrônica de varredura e da microscopia eletrônica de transmissão, REY *et al.*, (2011) demonstraram evidência histológica de repopulação intersticial e endotelial, na superfície de homoenxertos preservados em *L-Hydro*^R, implantados em carneiros.

É atribuída ao PEG a propriedade imunossupressora, na qual se fundamenta a preservação *L-Hydro*^R. Conforme demonstrado por COLLINS *et al.* (1991), antígenos que se combinam com o PEG, apresentam redução da antigenicidade. WICOMB *et al.*, (1992) demonstraram a reduzida toxicidade do PEG, quando adicionaram essa substância à solução de preservação miocárdica, garantindo viabilidade ao

órgão por tempo mais prolongado, quando comparadas às soluções cardioplégicas convencionais.

Outros estudos tentaram mostrar essa mesma capacidade de endotelização. GOLDSTEIN *et al.* (2000) demonstraram a descelularização de heteroenxertos e homoenxertos associada à endotelização autógena *in vitro*. SHINOKA *et al.* (1995), propuseram a construção de prótese por meio da semeadura de células endoteliais e fibroblastos de ovinos sobre esqueleto polimérico biodegradável formado por fibras de ácido poliglicólico e poliglactina. Esse estudo mostrou evidência de crescimento endotelial. Apesar disso, as próteses apresentaram alta porosidade e rigidez, o que limitava sua aplicabilidade clínica.

Constatou-se a ocorrência de aderência de parte ou de todas as cúspides das próteses do Grupo *L-Hydro*^R (sete animais), em comparação ao Grupo Glutaraldeído, onde esse evento não foi verificado. Uma possível explicação para tal aderência é o fato das biopróteses preservadas em *L-Hydro*^R terem, desde sua preparação, uma característica menos espessa e mais flexível, se comparadas às próteses preservadas em glutaraldeído. Sendo a via de saída do ventrículo direito uma zona de baixa pressão, as cúspides mais flexíveis estariam susceptíveis a aderirem à parede do tubo. A alteração do desenho da prótese com a confecção de seios imediatamente acima do plano valvar poderia, talvez, reduzir a incidência das aderências. Nesse sentido, estudos posteriores, testando esse novo modelo de prótese, permitiriam a avaliação do seu desempenho. REY *et al.*, (2011), em seu estudo experimental com homoenxertos preservados em *L-Hydro*^R,

encontraram, a partir da microscopia óptica, cúspides pouco retraídas, com adelgaçamento progressivo em direção à borda livre.

A espectrofotometria por absorção atômica, assim como as avaliações macro e microscópica, demonstraram maiores concentrações de cálcio nas próteses do Grupo Glutaraldeído. Houve significância, o que comprova a viabilidade na avaliação de cálcio por esse método (BAUCIA *et al.*, 2006).

Apesar de não ter sido alvo desse estudo, a busca por um substituto valvar ideal ainda esbarra na dificuldade de identificar uma prótese que, além de ampliar sua durabilidade, seja capaz de acompanhar o crescimento do hospedeiro. Recentemente, FURLANETTO *et al.* (2009) demonstraram que xenoenxerto valvado pulmonar porcino, com preservação *L-Hydro*^R, colocado em posição pulmonar de carneiros recém nascidos e acompanhados até a fase adulta, apresentavam crescimento do enxerto, ausência de calcificação e preservação da função valvar pulmonar.

O presente estudo apresenta como limitação a impossibilidade de reproduzir o efeito da doença cardíaca e o perfil de coagulação comparável ao do homem, a exemplo de outros que utilizaram animais de grande porte na avaliação de novas tecnologias de preservação ou substituição de tecidos cardíacos (LEVY, 1994; SCHOEN, 1999). Ademais, os modelos animais, apesar da anatomia semelhante à humana, possuem antigenicidade diferente, o que pode levar a resultados não reprodutíveis quando do uso clínico (LOPES *et al.*, 2011).

Ainda como fator limitante desse estudo, o número de animais alocados no Grupo Glutaraldeído (controle), apesar de se justificar pelo amplo conhecimento acerca da evolução e desfecho das próteses preservadas por este método, restringe a comparação entre os grupos nas variáveis hemodinâmicas, onde houve comportamento semelhante entre os grupos *L-Hydro^R* e Glutaraldeído.

No presente estudo, a substituição do tronco pulmonar por enxerto tubular valvado com preservação em *L-Hydro^R* mostrou-se adequado para avaliação, como modelo experimental já que permite analogia ao que possa ocorrer com a espécie humana. A preservação com *L-Hydro^R* indicou redução significativa da calcificação no tubo e nas cúspides da bioprótese utilizada.

Novas avaliações de desempenho deverão ser realizadas, a partir deste estudo, visando a observação e aplicabilidade clínica. A comprovação quanto à existência e viabilidade de repopulação tecidual e intersticial poderá ser obtida através de estudos complementares.

CONCLUSÕES

As próteses preservadas em *L-Hydro^R* (não aldeídicas) mostraram-se mais resistente ao processo de degeneração tecidual, especialmente à calcificação, quando comparadas àquelas preservadas em glutaraldeído.

REFERÊNCIAS

Abolhoda A, Yu S, Oyarzun JR, McCormick JR, Bogden JD, Gabbay S. Calcification of bovine pericardium: glutaraldehyde versus No-React biomodification. *Ann Thorac Surg.* 1996 Jul; 62(1): 169-74.

Abolhoda A, Yu S, Oyarzun JR, Allen KR, McCormick JR, Han S, Kemp FW, Bogden JD, Lu Q, Gabbay S. No-react detoxification process: a superior anticalcification method for bioprostheses. *Ann Thorac Surg.* 1996 Dec; 62(6): 1724-30.

Absolon KB, Hunter SW, Quattlebaum FW. A new technique for cardiac valve reconstruction from autologous diaphragm. *Surgery.* 1959; 46:1078-83.

Angell WW, wuerflein RD, Shumway NE. Mitral valve replacement with fresh aortic valve homograft: experimental results and clinical application. *Surgery.* 1967; 62: 807-13.

Arbustin E, Jones M, Moses RD, Eidbo EE, Carrol RJ, Ferrans VJ. Modification by the Hancock T6 process of calcification of bioprosthetic cardiac valves implanted in sheep. *Am J Cardiol.* 1984; 53: 1388-98.

Archer GG. A method of moulding autogenous tissue with a view to the manufacture of living cardiac valve prostheses. *Brit J Surg.* 1965; 52: 973-6.

Bhayana JN, Tan ZT, Bergsland J, Balu D, Singh JK, Hoover EL. Beneficial effects of fluosol-polyethylene glycol cardioplegia on cold, preserved rabbit heart. *Ann Thorac Surg.* 1997; 63: 459–64.

Baucia JA, Leal Neto RM, Rogero JR, Nascimento N. Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído: comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2006; 21(2): 180-7.

Barratt-Boyes BG. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax.* 1964; 19:131-50.

Beall Jr. AC, Morris Jr. GC, Cooley DA, DeBakey ME. Homotransplantation of the aortic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1961; 42: 497-506.

Bengtsson 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.* 1993; Sep; 106(3): 434-43.

Binet JP, Duran CG, Carpentier A, Langlois J. Heterologous aortic valve transplantation. *Lancet.* 1965; 2:1275.

Bloomfield P, Wheatley DJ, Prescott RJ, Miller HC. Twelve-year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses. *N Engl J Med*. 1991 Feb, 28;324(9): 573-9.

Bortolotti U, Gallix P. Experimental evaluation of porcine-valved conduits processed with a calcium-retarding agent (T6). *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1986; 91: 215-24.

Braile MC, Carnevalli NC, Goissis G, Ramirez VA, Braile DM. In vitro properties and performance of glutaraldehyde-crosslinked bovine pericardial bioprostheses treated with glutamic Acid. *Artif Organs*. 2011 May; 35(5):497-501.

Braile DM, Ardito RV, Greco OT, Lorga AM. IMC bovine pericardial valve: 11 years. *J Card Surg*. 1991; 6 (suppl): 580-8.

Braunwald NS, Cooper T, Morrow AG. Complete replacement of the mitral valve. Successful clinical application of a flexible polyurethane prostheses. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1960; 40: I-II.

Buffolo E. Substituição da válvula aórtica ou mitral por válvula aórtica homóloga montada em suporte. São Paulo. 1973. Tese de doutoramento - Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo.

Carpentier A, Chanard J, Briotet JM, Harada S, Archundia H, Salamagne JC, Vigano M, Laurens P, Laurent D, Dubost C. Remplacement da Iáppareil valvulaire mitral par des heetrogreffs héterotopiques. *Presse Méd.* 1967; 75: 1603-6.

Carpentier A, Deloche A, Relland J, Fabiani JN, Forman J, Camilleri JP, 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.* 1974 Nov; 68(5): 771-82.

Carpentier A., Nashef A., Carpentier S., Ahmed A., Goussef N. Techniques for prevention of calcification of valvular bioprostheses. *Circulation.* 1984, 70, I165–8.

Carpentier S., Carpentier A., Chen L., Shen M., Quintero L., Witzel T. Calcium mitigation in bioprosthetic tissues by iron pretreatment: the challenge of iron leaching. *Ann Thorac Surg.* 1995, 60 (suppl. 2), S332–8.

Carpentier S., Chen L., Shen M., Fornes P., Martinet B., Quintero L. *et al.*, Heat treatment mitigates calcification of valvular bioprostheses, *Ann Thorac Surg.* 1998, 66(suppl. 6), S264–6.

Cebotari S, Tudorache I, Schiling T, Haverich A. Heart valve and myocardial tissue engineering. *Herz.* 2010 Aug; 35(5): 334-41.

Collins GM, Wicomb WN, Levin BS, Verma S, Avery J, Hill JD. Heart preservation solution containing polyethyleneglycol: an immunosuppressive effect? *Lancet*. 1991; 338; 890–1.

Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas. Normas para apresentação de artigos propostos para publicação em revistas médicas. In: Miranda JA. Normas de Vancouver. 1998 Fev 14: (69 ecrans). Disponível em: URL: <http://homepage.esoterica.pt/~nx2fmd/Normas.html>.

Cohn LH, Collins JJ, Disesa VJ, Couper GS. Fifteen-years experience with 1678 Hancock porcine bioprosthetic heart valve replacements. *Ann Surg*. 1989; 210: 435-42.

Cunanan CM, Cabiling CM, Dinh TT, Shen S, Tranhata P, Rutledge JH III, Fishbein MC, Tissue characterization and calcification potencial of commercial bioprosthetic heart valves. *Ann Thorac Surg*. 2001 (suppl); 71, 417-21.

Dohmen PM, Konertz W. Tissue-engineered heart valve scaffolds. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2009 Dec; 15(6): 362-7.

Duran CG, Gunning AJ. A method for placing a total homologous aortic valve in the subcoronary position. *Lancet*. 1962; 2: 488-9.

Eybl E, Grimm M, Grabenwöger M, Böck P, Müller MM, Wolner E. Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve materials. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Sep, 104(3): 763-9.

Fadali MA, Ramos MD, Topaz SR, Gott VL. The use of autogenous peritoneum for heart valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1970, 60: 188-95.

Ferrans VJ, Spray TL, Billingham ME, Roberts WC. Structural changes in glutaraldehyde-treated porcine heterografts used as substitute cardiac valves. *Am J Cardiol.* 1978, 41: 1159-84.

Fischlein T, Lehner G, Lante W, Reichart B. Endothelialization of aldehyde-fixed cardiac valve bioprostheses. *Transplant Proc.* 1992, 24: 2988.

Fischlein T, Lehner G, Lante W, Fittkau M, Murphy JG, Weinhold C, Reichart B. Endothelialization of cardiac valve bioprostheses. *Int J Artif Organs.* 1994; 17: 345-52.

Fischlein T, Fasol R. In vitro endothelialization of bioprosthetic heart valves. *J Heart Valve Dis.* 1996; 5: 58-65.

Flege Jb, Rossi NP, Auer JE, Ehrenhaft JL. Technique of mitral valve replacement with autologous fascia-lata. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1967, 54: 222-6.

Frater RWM, Gong G, Hoffman D, Liao K. Endothelial covering of biological artificial heart valves. *Ann Thorac Surg.* 1992, V53, 371-2;

Fuchs JCA, Bonchek LI, Brauwald NS. Homograft aortic valves supported by nonthrombogenic prosthetic frames. *Surg. Forum.* 1967, 18: 118-23;

Furlanetto G, Passerino CH, Siegel R, Chueng DT, Levitsky S, Casagrande IS. Biointegration and growth of porcine valved pulmonary conduits in a sheep model. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2009 Aug,17(4): 350-6.

Gabbay S, Kadam P, Factor S, Cheung TK. Do heart valve bioprotheses degenerate for metabolic or mechanical reasons ? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988, Feb; 95(2): 208-15.

Geha AS, Titus JL, McGoon DC. Fixation of aortic valve homografts with metal rings. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1967, 54: 605-15.

Geha AS, Salaymeh MT, Davis GL, Baue AE. Replacement of the aortic valve with molded autogenous grafts grown in response to implanted silastic. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1970, 60: 661-72.

- Girardot J., Girardot M. Amide cross-linking: an alternative to glutaraldehyde fixation. *J Heart Valve Dis.* 5 (1996) (5), 518–25.
- Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, Black KS, O'Brien MF. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-graft. *Ann Thorac Surg.* 2000, 70: 1962-9.
- Gott J., Pan C., Dorsey L., Jay J., Jett G., Schoen F. *et al.* Calcification of porcine valves: a successful new method of antimineralization. *Ann Thorac Surg.* 1992, 53(2), 207–15.
- Grabenwöger M, Grimm M, Eybl E, Kadletz M, Havel M, Köstler P, Plenk H, Böck P, Wolner E. New aspects of the degeneration of bioprosthetic heart valves after long-term implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Jul, 104(1): 14-21.
- Grabenwöger M, Sider J, Fitzal F, Zelenka CJ, Windrerger U, Grimm M, *et al.* Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material. *Ann Thorac Surg.* 1996, 62: 772-7.
- Grehan JF, Casagrande I, Oliveira E, Santos PC, Pessa CJ, Gerola LR, *et al.* A juvenile sheep model for the long term evaluation of stentless bioprostheses implanted as aortic root replacements. *J Heart Valve Dis.* 2001, 10(4): 505-12.

Grimm M., Grabenwoger M., Eybl E., Moritz A., Bock P., Muller M. *et al.* Improved biocompatibility of bioprosthetic heart valves by L-glutamic acid treatment. *J Cardiovasc Surg.* 1992, 7(1): 58–64.

Gulbins H, Goldemund A, Anderson I, Haas U, Uhlig A, Meiser B, Reichart B. Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003,125: 592-601.

Harken DE, Soroff HS, Taylor WJ, Lefemine AA, Gupta SK, Lunzer S. Partial and complete prostheses in aortic insufficiency. *J. Thorac Cardiovasc. Surg.* 1960, 40: 744-762.

Hoffman D, Gong G, Liao K, Macaluso F, Nikolic SD, Frater RW. Spontaneous host endothelial growth on bioprostheses. Influence of fixation. *Circulation.* 1992, 86: II75-9.

Hufnagel CA, Conrad PW. The direct approach for correction of aortic insufficiency. *J Amer Med Ass.* 1961, 178: 275-79.

Hughes H, Lilburn S, Tipton S, Aboul-Enein HY, Duran CM. Chemical assay of glutaraldehyde incorporation into pericardial tissue. *J Heart Valve Dis.* 1994 Jan, 3(1): 105-10.

Ionescu MI, Wooler GH, Smith DR, Grimshaw VA. Mitral valve replacement with aortic heterografts in humans. *Thorax*. 1967, 22: 305-13.

Jamieson WR, Munro AL, Miyagishima RT, Allen P, Burr LH, Tyers GFO. Carpentier-Edwards standard porcines bioprosthesis clinical performance to seventeen years. *Ann Thorac Surg*. 1995, 60: 999-1006.

Jorge-Herrero E, Fonseca C, Barge AP, Turnay J, Olmo N, Fernández P, Lizarbe MA, García Páez JM. Biocompatibility and calcification of bovine pericardium employed for the construction of cardiac bioprostheses treated with different chemical crosslink methods. *Artif Organs*. 2010 May, 34(5): E168-76.

Kay EB, Mendelsohn Jr. D, Suzuki A, Zimmerman H. Correction of aortic regurgitation using plastic valves. *J Amer Med Ass*. 1961, 176: 1077-81.

Kim SS, Lim SH, Cho SW, Gwak SJ, Hong YS, Chang BC, Park MH, Song KW, Choi CY, Kim BS. Tissue engineering of heart valves by recellularization of glutaraldehyde-fixed porcine valves using bone marrow-derived cells. *Exp Mol Med*. 2006 Jun, 38(3): 273-83.

Knight RL, Wilcox HE, Korossis SA, Fisher J, Ingham E. The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves. *Proc Inst Mech Eng H*. 2008 Jan; 222(1): 129-43.

Lehner G, Fischlein T, Baretton G, Murphy JG, Reichart B. Endothelialized biological heart valve prostheses in the non-human primate model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1997 Mar, 11(3): 498-504.

Lentz DJ, Pollock EM, Olsen DB, Andrews EJ, Murashita J, Hastings WL. Inhibition of mineralization of glutaraldehyde-fixed Hancock bioprosthetic heart valves. In: Cohn LH, Gallucci V. *Cardiac bioprostheses.* New York: Medical. 1982, 306-19.

Levy RJ, Hawley MA, Schoen FJ. Inhibition by diphosponate compounds of calcification of porcine bioprosthetic heart valve cusps implanted subcutaneously in rats. *Circulation.* 1985, 71: 349-56.

Levy RJ. Glutaraldehyde and calcification mechanism of bioprotheses heart valves. (Editorial). *J. Heart Valves Dis.* 1994, 3: 101-4.

Lillehei WC, Barnard CN, Long Jr. DM, Sellers RD, Schimert G, Vargo RL. Aortic valve reconstruction and replacement by total valve prostheses. In: MERENDINO AK. - *Prosthetic valve for cardiac surgery.* Springfield ILL, Charles C. Thomas. 1961, 527-73.

Littlefield JB, Muller Jr. WH. Prosthetic replacement of diseased heart valves. *New York J Med.* 1961, 61: 3451-53.

Long Jr. DM, Sterns LP, Deriemer RH, Warden HE, Lillehei WC. Sub-total and total replacement of the aortic valve with plastic application utilizing selective cardiac hypothermia. Surg Forum. 1959, 10: 660-5.

Lopes SAV, Costa FDA, Paula JB, Dholmen P, Phol F, Vilani R, et al. Análise do comportamento biológico de heteroenxertos descelularizados e homoenxertos criopreservados: estudo em ovinos. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2009, 24(1): 15-22.

Loughridge BP, Roberts LB, Seetapun A, Shadid EA, Willians RG. Use of structured fibrocollagenous tissue in cardiac valves. Surg. Forum. 1965, 16: 168-70.

Meuris B, Phillips R, Moore MA, Flameng W. Porcine stentless bioprostheses: prevention of aortic wall calcification by dye-mediated photo-oxidation. Artif Organs. 2003 Jun, 27(6): 537-43.

Ministério da Saúde / DATASUS - Departamento de Informática do SUS.

Mirzae M, Meyer T, Schwartz P, Dalichau H. Preimplant ultrastructure and calcification tendency of various biological aortic valves. J Heart Valve Dis. 2000, 9: 576-82.

Mol A, Smits AI, Bouten CV, Baaijens FP. Tissue engineering of heart valves: advances and current challenges. *Expert Rev Med Devices*. 2009 May, 6(3): 259-75.

Moore MA, Phillips RE Jr, McIlroy BK, Walley VM, Hendry PJ. Evaluation of porcine valves prepared by dye-mediated photooxidation. *Ann Thorac Surg*. 1998 Dec, 66(suppl. 6): S 245-8.

Murray G. Aortic valves transplants. *Angiology*. 1960, 11: 99-102.

Murray G, Roschlau W, Loughheed W. Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology*. 1956, 7: 466-71.

Nakano K. Technologies for cardiac valve prostheses. *Kyobu Geka*. 2009 Jul, 62(suppl. 8): 692-8.

Nina VJ, Pomerantzeff PM, Casagrande IS, Cheung DT, Brandão CM, Oliveira SA. Comparative study of the L-Hydro process and glutaraldehyde preservation. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2005 Sep; 13(3): 203-7.

O'Brien MF, Clarebrough JK. Heterograft aortic valve transplantation for human valve disease. *Med J Aust*. 1966, 2: 228-30.

O'Brien M.F. Heterograft aortic valves for human use: Valve bank, techniques of measurement and implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1967, V53, p: 392; apud Buch W.S, Kosec J.C, Angell W.W. Deterioration of formalin-treated aortic valve heterograft. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1970, V60, 673-7.

Oosthuysen A, Zilla PP, Human PA, Schmidt CA, Bezuidenhout D. Bioprosthetic tissue preservation by filling with a poly(acrylamide) hydrogel. *Biomaterials.* 2006 Mar; 27(9): 2123-30.

Ozaka S, Hriggers P, Verbekan E, Lommel AV, Nishida T, Perek B, Zietkiewicz M, Lennens 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 Valves Dis.* 2000, v. 9, 552-60.

Palma J.H.F. Substituição da válvula mitral por válvula aórtica homóloga montada em suporte e conservada em glutaraldeído. São Paulo. 1988. Tese de mestrado. Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo.

Presta L.N, Alves A.C, Morgado R. *Tecnologia Farmacêutica.* 4a ed. Porto, Fundação Calaouste Gulbenkian. 1995, 1699-700. Polietilenoglicóis.

Puig LB, Verginelli G. Válvulas cardíacas de dura-máter homóloga. Nota prévia. *Rev Paul Med.* 1971, 78: 33-35.

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. 1972, V64, 154-60.

Rey NA, Moreira LFP, Cheung DT, Casagrande ISJ, Benvenuti LA, Stolf NAG. Estudo experimental comparativo do enxerto homólogo pulmonar tratado pelo processo L-Hydro^R com homoenxerto pulmonar a fresco. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2011; 26(2): 282-90.

Reul JR, Cooley DA, Duncan JM, Frazier OH, Hallmann GL, Livesay JJ, et al. Valve failure with the Ionescu-Shiley bovine pericardial bioprosthesis: Analysis of 2680 patients. J Vasc Surg. 1984, 2: 589-97.

Ross DN. Homograft replacement of the aortic valve. Lancet. 1962, 2:487.

Sacks MS, Schoen FJ, Mayer JE. Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering. Annu Rev Biomed Eng. 2009, 11: 289-313.

Santos PC, Gerola LR, Casagrande I, Buffolo E, Cheung DT. Stentless valves treated by the L-hydro process in the aortic position in sheep. Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2007 Oct; 15(5): 413-7.

Schoen FJ, Tsao JW, Levy RJ. Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprosthesis: implication for the mechanism of bioprosthetic tissue mineralization. Am J Pathol. 1986, 123: 134-45.

Schoen FJ, Levy RJ. Heart valve bioprotheses: antimineralization. *Eu J Cardio-Thorac Surg.* 1992 (suppl), v. 6, 91-4.

Schoen FJ. Future direction in tissue heart valves: impact of recent insights from biology and pathology. *J Heart Valves Dis.* 1999, 8: 350-8.

Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg.* Mar 2005, 79(3): 1072-80.

Senning A. Aortic valve replacement with fascia-lata. *Acta Chir Scand.* 1966, 356 B: 17-20.

Shen M, Marie P, Farge D, Carpentier S, De Pollak C, Hott M, Chen L, Martinet B, Carpentier A. Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans. *C R Acad Sci III.* 1997 Jan; 320(1): 49-57.

Shen M., Kara-Mostefa A., Chen L., Daudon M., Thevenin M., Lacour B. *et al.* Effect of ethanol and ether in the prevention of calcification of bioprotheses. *Ann Thorac Surg.* 2001, 71(suppl. 5), S413–16.

Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, et al., Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg.* 1995, 60(suppl): 513-6.

Simionescu DT. Prevention of calcification in bioprosthetic heart valves: challenges and perspectives. *Expert Opin Biol Ther.* 2004 Dec, 4(12): 1971-85.

Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM, Kim BS, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation.* 2000;102: III22-9.

Starr A, Edwards NL. Mitral replacement: clinical experience with a ball-valve prosthesis. *Ann. Surg.* 1961, 154:726-40.

Templeton JY, Gibbon Jr. JH. Experimental reconstruction of cardiac valves by venous and pericardial grafts. *Ann. Surg.* 1949, 129:161-76.

UNICAMP. PEG-150 diesterato, polietilenoglicol. Campinas 2003.
Disponível em URL: <http://pcserver.iqm.unicamp.br/~wioh/cursos/qg661/trabalho20.html>.

Vesely I, Barber JE, Ratliff NB. Tissue damage and calcification may be independent mechanisms of bioprosthetic heart valve failure. *J Heart Valve Dis.* 2001 Jul;10(4):471-7.

Vicentelli A, Latrémouille C, Zegdi R, Shen M, Lajos PS, Chachques JC, Fabiani J. Does glutaraldehyde induce calcification of bioprosthetic tissues? *Ann Thorac Surg.* 1998, 66(suppl): 255-8.

Walther T, Falk A, Diegeler A, Rauch T, Weigl C, Gummert J, Autschbach R, Mohr FW. Effectiveness of different anticalcification treatments for stentless aortic bioprstheses. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1999, 47: 23-5.

Weldon CS, Mel Ameli N, Morovati SS, Shaker IJ. A prosthetic stented homograft for mitral valve replacement. *J Surg Res.* 1966, 6: 548-52.

Weldon CS, Mel Ameli N, Morovati SS. Mitral and tricuspid valve replacement with stented aortic valve homografts. *Arch Surg.* 1967, 95: 862-70.

Wicomb WN, Perey R, Portnoy V, Collins GM. The role of reduced glutathione in heart preservation using a polyethylene glycol solution, *Cardiosol.* *Transplantation.* 1992, 54: 181-2.

Wikimedia Foundation, Inc. 22 de julho de 2004. Web. 16 de novembro de 2010. Disponível em URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Polyethylene_glycol.

Zilla P., Bezuidenhout D., Human P. Carbodiimide treatment dramatically potentiates the anti-calcific effect of alpha-amino oleic acid on glutaraldehyde-fixed aortic wall tissue. *Ann Thorac Surg.* 2005 - 79, 905-10.

NORMAS ADOTADAS

Normas Adotadas

1. ICMJE - *International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal*. Disponível no site: <http://www.icmje.org>.
2. COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) - Princípios éticos da experimentação animal. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. <http://www.cobea.org.br>.
3. Ferreira, LM., Goldenberg, S., Nahas, FX., Barbosa, MVJ., Ely, PB. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses . São Paulo; 2008 - Livraria Médica Paulista Editora.
4. *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care - Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Disponível no site: <http://www.aaalac.org/about/index.cfm>.
5. Consulta ao DeCS - Descritores em Ciências da Saúde. <http://decs.bvs.br/> - terminologia em saúde.
6. *International Standard Organization - ISO 5840, 3a edição, 1996, revisada em 2005.*

ABSTRACT

Introduction: The cardiac bioprostheses are related to thromboembolic events, infectious and degenerative diseases. Wear is mainly attributed to the denaturation of collagen. Glutaraldehyde, the predominant method of preservation of bioprostheses, favors the calcification process and limits their durability. Several techniques try to contain the degenerative process of bioprostheses. **Objectives:** To evaluate the process of calcification in vivo pulmonary valve heterografts preserved in non-aldehydic (*L-Hydro*^R). **Methods:** 17 sheep underwent replacement of the pulmonary artery valved tubular grafts of bovine pericardium. The animals were divided into two groups: Group *L-Hydro*^R (test / n = 14) and Group Glutaraldehyde (control / n = 3). About 150 days after implantation, angiography was performed, hemodynamic measurements and sacrifice. The mice were sacrificed and the prostheses subjected to a pathological study, radiological evaluation and measurement of calcium by atomic absorption spectrophotometry. Statistical analysis was obtained through the Fisher's exact test, Student's t or Mann-Whitney test (significance: 5%). **Results:** The angiographic and hemodynamic performance of prostheses tested was similar in both groups. Radiological evaluation, the macroscopic and microscopic measurement of serum calcium by atomic absorption spectrophotometry showed increased calcification of the prosthesis Glutaraldehyde Group, when compared to *L-Hydro*^R Group prosthesis (p = 0.001). 07 animals in Group *L-Hydro*^R (50%) had adherence of the leaflets to the wall of the tube (p = 0.228). **Conclusions:** Prostheses preserved in *L-Hydro*^R were more resistant to calcification when compared with Glutaraldehyde preserved.

ANEXOS

Anexo 1: Carta do Comitê de Ética em Pesquisa - UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 12 de dezembro de 2008.
CEP 1761/08

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) HELMGTON JOSE BRITO DE SOUZA

Co-Investigadores: Ivan Sergio Joviano Casagrande, Patricia Malheiros Dodd, Sergio Campos Christo, Wagner Campos, Ricardo Boaventura, José Honório de Almeida Palma da Fonseca (Orientador)

Disciplina/Departamento: Cirurgia Cardiovascular/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Labcor Laboratórios Ltda.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Substituição de tronco pulmonar em carneiro utilizando tubo pulmonar valvado orgânico com preservação L-Hydro**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: EXPERIMENTAL - CATEGORIA C - ESTUDO CRÔNICO.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar a performance "in vivo" de condutos pulmonares valvados a partir de uma série de implantes de carneiros..

RESUMO: Trata-se de estudo utilizando-se carneiros que serão mantidos no centro de pesquisas do patrocinador - Laboratórios Labcor. Os animais serão mantidos e manipulados de acordo com as normas do COBEA - Colégio Brasileiro de Experimental Animal e da Associação Americana para a Ciência de Animais de laboratório. Os animais serão anestesiados com Thionembutal, halotano e Quelicin e sofrerão uma cirurgia para implante de condutos pulmonares valvados, que serão fornecidos pelo patrocinador. A performance das próteses será testada através de avaliação dos gradientes de pressão e performance hemodinâmica, bem como pela angiografia do ventrículo direito, avaliação angiográfica, testes periódicos de sangue, incluindo parâmetros hemolíticos e infecciosos e análises patológicas do sistema de teste. A eutanásia será por injeção de 30 ml de cloreto de potássio EV..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Fundamentação adequada..

MATERIAL E MÉTODO: Materiais e Métodos adequadamente descritos.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Foram esclarecidas as pendências emitidas pelos relatores.

CRONOGRAMA: 12 MESES.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **7/12/2009** e **7/12/2010**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Anexo 2: Planilha geral de animais

	GÊNERO	PESO (Kg)	IDADE (meses)	CEC (min)	Sobrevida (dias)	PRÓTESE	TAMANHO PRÓTESE	STATUS
GRUPO I								
1	F	34	8,13	76	86	L1420080218PB345	17	Encontrado morto
2	M	30	7,93	93	197	L1420080317665	17	Sacrificado
3	F	35	6,77	79	194	L1420080317APB681	17	Sacrificado
4	M	30	6,13	76	151	L1420080317APB666	17	Sacrificado
5	M	27	6,20	62	168	L1420071203APB327	15	Sacrificado
6	M	30	7,37	100	174	L1420080331APB323	17	Sacrificado
7	M	35	6,73	49	162	L1420080331APB324	17	Sacrificado
8	M	35	6,73	71	162	L1420080317APB692	17	Sacrificado
9	M	33	6,60	48	165	L1420080331APB330	17	Encontrado morto
10	M	33	6,67	28	161	L1420080623APB995	17	Sacrificado
11	M	32	6,77	34	161	L1420080623APB957	17	Sacrificado
12	M	32	6,77	30	162	L1420080623APB502	17	Sacrificado
16	F	30	7,67	39	154	L1420080331APB120	19	Sacrificado
17	M	28	8,33	35	154	L1420080331APB117	19	Sacrificado
GRUPO II	GÊNERO	PESO (Kg)	IDADE (meses)	CEC (min)	Sobrevida (dias)	PRÓTESE	TAMANHO PRÓTESE	STATUS
13	M	35	6,30	38	161	NA000258	17	Sacrificado
14	M	33	6,30	30	161	NA A000495	17	Sacrificado
15	M	33	6,50	25	161	NA A000125	17	Sacrificado

Anexo 3: Avaliação laboratorial (cirurgia, 7º PO, 90º PO, sacrifício)

HEMOGLOBINA (g/dl)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrifício
1	11,1		13,3	
2	14,7		12,8	13,8
3	11,4		11,4	11
4	11		15,1	12,1
5	9,9		11,9	11,6
6	10,4			12,4
7	12,8	8,2	11,9	10,5
8	12,2	8,6	12,5	11,6
9	14,2	8,9	11,5	
10	13,1	9,7	13,3	13,6
11	11,7	7,6	12,9	11,9
12	11,3	8,5	11,5	11,9
13	9,8	9,1	10,7	12,7
14	7,6	10,1	12,4	9,1
15	12	8,8	11,8	11,9
16	13,7	10,2	10,6	12
17	14,6	9,9	15,8	14,2

LEUCÓCITOS (/mm3)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrifício
1	11.300		16.500	
2	12.200		8.300	6.800
3	9.800		7.600	6.600
4	6.500		13.800	10.400
5	9.800		10.900	8.300
6	10.300			8.600
7	10.100	7400	7.800	6.100
8	7.000	6500	6.700	6.400
9	10.600	8900	20.100	
10	9.300	6100	6.700	5.000
11	9.700	9000	13.500	5.700
12	11.100	9300	11.800	6.600
13	13.900	8200	6.900	8.500
14	9.500	6700	8.600	6.600
15	8.800	7400	9.800	7.500
16	6.400	5400	12.300	6.500
17	6.900	7000	5.200	4.700

Anexos

BILIRRUBINA DIRETA	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	0,10		0,10	
2			0,10	0,10
3	0,10		0,10	0,20
4			0,10	0,10
5			0,10	
6	0,10			0,10
7	0,10	0,10	0,10	
8	0,10	0,10	0,10	
9	0,10	0,10		
10	0,10	0,10	0,10	
11	0,10	0,10	0,10	0,10
12	0,10	0,10	0,10	0,10
13	0,10	0,10	0,10	0,10
14	0,10	0,10	0,10	
15	0,10	0,10	0,10	0,10
16				0,10
17	0,10	0,10		0,10

BILIRRUBINA TOTAL	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	0,20		0,20	
2			0,20	0,20
3	0,20		0,30	0,30
4			0,20	0,20
5			0,30	
6	0,20			0,30
7	0,20	0,30	0,20	
8	0,20	0,20	0,20	
9	0,20	0,20		
10	0,30	0,20	0,30	
11	0,30	0,20	0,20	0,20
12	0,20	0,20	0,20	0,30
13	0,20	0,20	0,20	0,20
14	0,20	0,20	0,20	
15	0,20	0,20	0,20	0,20
16				0,20
17	0,20	0,30		0,20

CALCIO	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	9,7		9,9	
2	10,1		9,7	9,5
3	10,2		9,5	9,4
4			10,2	9,4
5			9,6	9,5
6	9,3			10,6
7	9,7	9,1	9,1	9,0
8	10,5	9,2	10,0	9,4
9	10,4	8,7		
10	9,9	9,0	9,2	9,2
11	9,1	8,6	8,5	8,3
12	9,8	8,8	9,6	8,9
13	10,2	9,3	8,8	8,7
14	9,9	9,5	9,1	8,7
15	9,6	9,2	8,1	8,7
16	9,7	10,2	9,6	9,7
17	10,2	9,4	10,6	9,7

CPK (U/L)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	121		115	
2	231		107	144
3	219		111	275
4	175		106	80
5	368		133	418
6	155			207
7	221	86	200	225
8	87	114	302	234
9	107	108		
10	96	137	155	
11	182	77	126	227
12	127	77	182	174
13	102	54	246	134
14	155	195	165	326
15	149	132	149	217
16	205	270		59
17	229		272	217

FERRO (mcg/dl)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrifício
1	294			143
2			207	237
3	181		189	298
4			171	120
5			183	306
6	183			177
7	112	75	157	169
8	93	82	184	196
9	114	93		
10	106	160	147	189
11	150	84	94	145
12	126	55	148	111
13	163	118	200	163
14	79	58	201	333
15	91	79	139	145
16	169	129	216	152
17	279	122	260	370

POTÁSSIO (mEq/L)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrifício
1	5,5		4,6	
2	7,2		4,8	10,3
3	7,8		4,5	4,9
4			5,2	4,6
5			4,6	
6	4,7			4,5
7	5,1	5,1	7,6	
8	5,0	5,0	6,4	
9	5,7	4,7		
10	4,9	4,9	6,0	
11	5,7	4,7	5,7	
12	5,4	5,3	7,7	5,7
13	5,1		5,8	5,3
14	4,9	4,7	6,4	
15	5,1	4,5	6,1	4,7
16		5,2	6,0	4,5
17	5,4	7,3		4,9

SÓDIO (mEq/L)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	143		150	
2			150	139
3	149		149	146
4			151	145
5			146	144
6	145			148
7	147	147	146	148
8	146	146	147	145
9	149	143		
10	150	146	154	148
11	149	144	145	147
12	149	146	150	151
13	147		149	147
14	149	149	151	147
15	149	146	152	145
16	150		146	146
17	150	151	146	149

FOSFATASE ALCALINA (U/L)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	430		657	
2	676		905	694
3	459		449	260
4			1.376	491
5			536	435
6	406			474
7	363	161	314	184
8	465	178	683	414
9	403	196		
10	420	201	502	371
11	199	159	471	169
12	299	160	376	189
13	742	172	795	571
14	805	230	1.053	277
15	564	191	494	394
16	273		202	300
17	533	143	319	589

PROTEÍNAS TOTAIS (g/dl)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1			7,6	
2			6,7	7,1
3			7,1	7,6
4	6,9		7,0	6,8
5	7,4		7,2	7,5
6	7,1			7,5
7	6,4	6,1	6,4	6,9
8	6,2	4,7	6,4	6,2
9	6,0	5,4		
10	6,7	5,4	6,2	6,6
11	5,8	5,2	6,7	7,4
12	6,1	5,2	6,1	6,2
13	6,3		6,2	6,6
14	6,1	6,3	6,0	6,7
15	5,9	5,4	5,9	6,3
16	7,0	5,8	7,1	7,4
17	6,2	6,0	7,8	7,8

TGP (U/L)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	29		18	
2	20		18	20
3	31		23	20
4	15		27	15
5	16		20	11
6	21			17
7	22	18	21	27
8	22	16	18	21
9	10	6		
10	16	29	19	24
11	14	13	12	19
12	5	12	18	18
13	12	9	4	7
14	30	16	20	8
15	6	5	12	2
16	22	23	21	11
17	19	23	22	27

Anexos

URÉIA (mg/dl)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	61		80	
2	47		74	49
3	52		63	50
4	45		62	44
5	46		55	47
6	55			51
7	37	34	44	41
8	39	29	54	37
9	46	44		
10	42	27	53	41
11	40	28	47	35
12	34	24	55	38
13	50	38	46	23
14	38	42	43	32
15	50	27	54	31
16	42	44	30	37
17	80	48	42	50

HEMATÓCRITO (%)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	31,2		44,3	
2	36,3		35,8	41,3
3	32,2		32,3	31,7
4	29,6		43,6	34
5	24,6		33	36
6	23,9			30,3
7	35,8	24,3	34,4	25,4
8	26,5	18,5	28,2	30,9
9	24,5	14,2	22,9	
10	32,3	22,3	32,3	37,1
11	30,2	18,6	29,9	24,2
12	40,8	23,6	31,9	28,7
13	38	25,5	32,6	34,2
14	35,7	27,5	36,1	36,2
15	28,8	21,3	27,2	30,1
16	46,4	29,7	36	38,8
17	36,7	33,7	46,7	39,4

PLAQUETAS (/mm3)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	395.000		204.000	
2	447.000		162.000	303.000
3	482.000		254.000	506.000
4	308.000		494.000	473.000
5	516.000		560.000	420.000
6	321.000			358.000
7	647.000	639.000	466.000	255.000
8	749.000	784.000	461.000	219.000
9	889.000	836.000	396.000	
10	899.000	970.000	302.000	227.000
11	738.000	809.000	325.000	341.000
12	641.000	648.000	484.000	688.000
13	532.000	637.000	266.000	352.000
14	464.000	621.000	426.000	234.000
15	771.000	853.000	445.000	292.000
16	398.000	502.000	692.000	379.000
17	752.000	699.000	253.000	349.000

BILIRRUBINA INDIRETA	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	0,10		0,10	
2			0,10	0,10
3	0,10		0,20	0,10
4			0,10	0,10
5			0,20	
6	0,10			0,20
7	0,10	0,20	0,10	
8	0,10	0,10	0,10	
9	0,10	0,10		
10	0,20	0,10	0,20	
11	0,20	0,10	0,10	0,10
12	0,10	0,10	0,10	0,20
13	0,10	0,10	0,10	0,10
14	0,10	0,10	0,10	
15	0,10	0,10	0,10	0,10
16				0,10
17	0,10	0,20		0,10

Anexos

COLESTEROL TOTAL	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	88		80	
2			81	64
3	66		46	48
4	59		69	70
5			57	60
6				55
7	75	49	70	68
8	76	50	53	54
9	78	51		
10	96	59	55	66
11	52	48	29	60
12	69	59	47	57
13	62	54	46	60
14	73	54	59	69
15	59	51	44	46
16	65	53	71	93
17	102	75	100	

CREATININA (mg/dL)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	0,9		0,9	
2	0,8		0,9	1,0
3	1,0		0,9	1,0
4	0,9		1,1	1,1
5	0,6		0,8	0,3
6	0,7			0,8
7	0,9	1,0	0,9	0,9
8	0,5	0,7	0,5	0,7
9	0,9	1,0		
10	0,9	0,8	0,6	1,0
11	0,8	0,7	0,8	1,0
12	0,9	0,8	1,0	0,9
13	0,9	0,9	0,8	1,1
14	0,9	0,8	0,8	0,6
15	0,6	0,8	0,7	1,0
16	0,5	0,8	0,7	0,9
17	0,7	0,5	0,2	0,9

Anexos

GLICEMIA (mg/dl)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	59		54	
2	56		61	56
3	79		64	71
4	58		70	67
5	62		65	29
6	62			42
7	67	80	49	
8	76	105	51	
9	66	86		
10	64	79	39	
11	88	80	38	
12	62	69	25	22
13	58	46	31	32
14	71	82	51	
15	66	80	35	44
16		50		58
17	69	44		93

DEHIDROGENASE LÁTICA (U/L)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	590		608	
2	492		613	615
3	658		846	984
4	321		425	313
5	438		531	
6	428		497	
7	740	582	492	
8	735	565	538	
9	664	523		
10	657	607	458	
11	785	447	1.169	
12	786	462	468	413
13	498		461	480
14	682	619	450	
15	784	519	525	450
16		157	327	390
17	458	1.058	579	598

Anexos

FÓSFORO (mg/dl)	CIRURGIA	7º día	90º día	sacrificio
1	5,3		7,3	
2	9,0		9,4	8,0
3	7,0		8,1	12,0
4			5,1	7,3
5			5,4	7,8
6	4,5			5,8
7	8,9	9,2	9,7	11,3
8	7,5	7,1	7,8	7,1
9	8,9	8,4		
10	10,9	8,4	9,5	6,7
11	9,7	7,1	5,2	6,7
12	9,2	7,1	7,1	9,0
13	8,3		8,5	9,1
14	8,1	8,3	10,9	8,6
15	11,5	6,6	10,4	7,7
16			8,2	9,6
17	10,2	6,4		7,4

PROTEÍNA GLICOSILADA (micromol/L)	CIRURGIA	7º día	90º día	sacrificio
1	174		187	
2	167		180	183
3	188		193	212
4	245		218	225
5	226		190	207
6	209			165
7	222	211	201	218
8	219	189	190	198
9	220	210		
10	219	205	203	216
11	165	167	178	196
12	172	164	192	194
13	189		183	188
14	211	219	199	200
15	200	186	200	
16	273		202	300
17	221	184	194	235

TGO (U/L)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	123		134	
2	103		93	150
3	172		189	251
4	79		76	52
5	88		82	90
6	127			121
7	129	160	87	70
8	125	213	114	77
9	103	108		
10	109	346	139	
11	173	141	138	
12	132	116	93	79
13	118		97	116
14	148	135	110	108
15	138	146	115	94
16	69	190	80	51
17	92	329	104	132

TRIGLICÉRIDES (mg/dl)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	9		29	
2			38	15
3	17		14	20
4	11		8	8
5	21		12	25
6	9			14
7	23	13	28	19
8	13	10	32	10
9	22	8		
10	11	3	24	17
11	15	5	6	16
12	10	6	23	11
13	22	37	24	14
14	17	5	32	24
15	15	7	23	11
16	23	20	14	21
17	68	17	17	28

Anexos

GAMA GT (U/L)	CIRURGIA	7º dia	90º dia	sacrificio
1	37		46	
2	55		82	82
3	67		127	134
4	32		44	43
5	37		43	26
6	39			44
7	49	47	16	18
8	66	53	59	51
9	52	45		
10	64	47	60	46
11	50	44	57	48
12	35	32	32	33
13	52	38	42	47
14	53	50	51	
15	72	54	76	69
16	23	39		49
17	71	53	35	78