

NEI ANTÔNIO REY

**Estudo experimental comparativo do enxerto homólogo
pulmonar tratado pelo processo L-Hydro com o homoenxerto
pulmonar a fresco**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Noedir Antônio Groppo Stolf

**SÃO PAULO
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rey, Nei Antônio

Estudo experimental comparativo do enxerto homólogo pulmonar tratado pelo processo I-hydro com o homoenxerto pulmonar a fresco / Nei Antônio Rey. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cardiologia.

Área de concentração: Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Noedir Antonio Groppo Stolf.

Descritores: 1.Transplante homólogo 2.Polietilenoglicóis 3.Valvas cardíacas
4.Ovinos

USP/FM/SBD-209/08

DEDICATÓRIA

A Deus, pela possibilidade de nossa existência terrena.

*À minha esposa Maria Elisabeth e aos meus filhos Rafael, Maria
Carolina, Gabriel e Gustavo.*

Aos meus pais, Manoel e Nilda Maria.

Aos meus sogros, José e Lorena, in memoriam.

Ao meu irmão Newton Manoel.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao Professor Doutor Noedir Antonio Groppo Stoff, pelo empenho,
amizade e segura orientação.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luiz Felipe de Pinho Moreira pelo apoio e sugestões na elaboração desta tese.

Ao Doutor Luiz Alberto Benvenuti pela valiosa contribuição na realização dos estudos histológicos.

Ao Doutor Ivan Casagrande e a toda a Equipe do Centro de Pesquisa da Labcor Laboratórios Ltda., pela colaboração na realização dos experimentos no modelo animal.

Ao Doutor David T. Cheung pelos esclarecimentos fornecidos.

Ao Doutor Domingos Dias Lourenço Filho pela colaboração e orientação.

Ao Professor Jarbas J. Dinkuyzen pelas sugestões e amizade.

Ao GEP do Hospital Conceição (Grupo Hospitalar Conceição do Ministério da Saúde).

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), por ter patrocinado aporte financeiro a esta tese.

À Maria Carolina pela ajuda e assistência na elaboração do texto.

ÍNDICE

	Pag
Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de símbolos	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Resumo	
Summary	
1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	8
3. Material e Métodos.....	10
3.1. Seleção da amostra.....	11
3.1.1. Preparo dos homoenxertos.....	12
3.1.1.1. Preparação pelo L-Hydro.....	12
3.1.1.2. Enxertos frescos.....	13
3.1.2. Preparação dos animais de experimentação.....	13
3.1.3. Implantes em animais.....	15
3.1.3.1. Técnica operatória.....	15
3.1.3.2. Cuidados pós-operatórios.....	17
3.1.3.3. Avaliação Clínica e laboratorial.....	17
3.1.3.4. Avaliação EcoDopplercardiográfica.....	18
3.1.3.5. Avaliação angiográfica.....	19
3.2. Sacrifício dos animais e explante das próteses.....	20
3.2.1. Avaliação macroscópica.....	20
3.2.2. Avaliação radiológica.....	21
3.2.3. Avaliação histológica e imuno-histoquímica.....	22
3.3. Análise estatística de dados.....	24
4. Resultados.....	25
4.1. Análise clínica e laboratorial.....	26
4.2. Análise EcoDopplercardiográfica.....	29
4.3. Análise angiográfica e hemodinâmica.....	30
4.4. Análise dos achados radiológicos.....	32

4.5. Avaliação macroscópica.....	32
4.6. Análise histológica.....	36
4.6.1. Aspectos da microscopia óptica.....	36
4.6.1.1. Análise imuno-histoquímica.....	39
4.6.2. Aspectos da microscopia eletrônica de varredura.....	39
4.6.3. Aspectos da microscopia de transmissão.....	40
4.6.4. Descrição individual dos casos e tabelas.....	43
5. Discussão.....	44
6. Conclusões.....	56
7. Anexos.....	58
8. Referências Bibliográficas.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	artéria pulmonar
AHA	American Heart Association
CEC	Circulação extra-corpórea
CO ₂	Gás carbônico
DHL	Deidrogenase láctica
DN	Data do nascimento
Eco 1	Ecocardiograma aos 7 meses
Eco 2	Ecocardiograma aos 10 meses
EV	Endovenoso
Hb	Hemoglobina
Ht	Hematócrito
IM	Intramuscular
ISO	International Standard Organization
MO	Microscopia Óptica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
N/A	Não avaliado
PEG	Polietileno-glicol
PO	Pós-operatório
PAP	Pressão de artéria pulmonar
PCP	Pressão capilar pulmonar
PVC	Pressão venosa central
Tcec	Tempo de circulação extra-corpórea
TP	Tronco pulmonar
U.S.	United States of America
VD	Ventrículo direito

LISTA DE SÍMBOLOS

UI	Unidades internacionais
MmHg	milímetros de mercúrio
G	Gramma
Kg	Quilograma
Kg ⁻¹	por quilograma de peso corpóreo
Fr	french
MI	mililitro
Mg	miligramma
Mm	milímetro
%	porcentual
°	grau
°C	grau Celsius
KV	quilovolts
µm	micrômetro

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Comparação de variáveis clínicas e laboratoriais.....	28
Tabela 2. Comparação de variáveis ecocardiográficas e hemodinâmicas.....	31
Tabela 3. Comparação de variáveis obtidas da macroscopia.....	35
Tabela 4. Porcentual de revestimento celular.....	37
Tabela 5. Comparação de variáveis da microscopia óptica e eletrônica.....	43

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Esquema cirúrgico de implante do homoenxerto.....	16
Figura 2. Esquema de classificação do grau de calcificação.....	22
Figura 3. Avaliação Macroscópica.....	34
Figura 4. Microscopia Óptica de Luz.....	38
Figura 5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	40
Figura 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	42

Rey NR. Estudo experimental comparativo do enxerto homólogo pulmonar tratado pelo processo L-Hydro com o homoenxerto pulmonar a fresco. São Paulo, 2008, 84p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Os substitutos valvares possuem grande importância pela frequência da sua utilização e porque de seu bom desempenho depende o sucesso do procedimento cirúrgico realizado. Vários substitutos valvares têm sido empregados, todos com complicações inerentes ao material utilizado, como trombose, calcificação, degeneração, dificuldade de esterilização, custo, complexidade de produção, etc. Buscando disponibilizar homoenxertos preservados de maneira mais simples e econômica, avaliamos uma nova forma de preservação utilizando o polietileno-glicol, método L-Hydro. Este método consiste na extração controlada de substâncias antigênicas e de incorporação de um agente anti-inflamatório e anti-trombótico. Em dez carneiros jovens substituímos o Tronco Pulmonar, em sete por homoenxertos pulmonares tratados pelo processo L-Hydro e em três por homoenxertos pulmonares a fresco, implantados ortotopicamente e seguidos por 320 dias. Os carneiros foram avaliados por exames laboratoriais e ecocardiográficos. Ao cabo dos 320 dias foram sacrificados, quando se procedeu à avaliação hemodinâmica, radiológica, macroscópica e por microscopia óptica e eletrônica, de varredura e transmissão. Os resultados foram analisados pelo teste t de Student de amostras independentes para os dados contínuos, pela análise de variância para as medidas repetidas e pelo teste exato de Fischer para os dados categóricos. Na evolução clínica e nos exames laboratoriais não conseguimos estabelecer diferenças significativas entre os dois grupos. O ecocardiograma revelou diferença quanto ao gradiente médio pulmonar, significativa aos 10 meses de seguimento, maior no grupo controle do que no grupo L-Hydro. A avaliação radiológica e

macroscópica não estabeleceu diferenças. Na avaliação microscópica, óptica e eletrônica, células de revestimento e intersticiais foram encontradas nos dois grupos igualmente. O percentual de revestimento celular calculado nos dois grupos foi semelhante. Nódulos de celularidade foram observados somente no grupo de homoenxertos a fresco. Em conclusão, estes dados indicam que os dois grupos apresentaram desempenho clínico e hemodinâmico semelhante. Ao ecocardiograma o grupo L-Hydro apresentou melhor desempenho; apresentou também evidências histológicas de repopulação celular intersticial e endotelial. Na análise macro e microscópica, óptica e eletrônica, o grupo L-Hydro apresentou macroscopia, estrutura histológica e ultraestrutural semelhante ao homoenxerto afresco, à exceção de nódulos de maior celularidade intersticial, presentes apenas no homoenxerto a fresco.

SUMMARY

Rey NR. L-Hydro treated homologous pulmonary graft vs. pulmonary homograft *fresco*: An experimental, comparative study. São Paulo, 2008, 84p. Thesis (Doctorate) – São Paulo University Medical School, São Paulo, Brazil.

Valve substitutes are highly important in account of their frequent use and since the success of a surgical procedure depends on their good performance. A variety of valve substitutes have been used, all presenting complications pertaining to their materials, such as thrombosis, calcification, degeneration, sterilization difficulties, cost, production complexity, etc. In an effort to make available homografts preserved in a simpler and less costly way, we evaluated a new preservation form using polyethyleneglycol, the L-Hydro method. This method consists in the controlled extraction of antigenic substances and the incorporation of an anti-inflammatory and anti-thrombotic agent. We substituted the pulmonary trunk in ten ovines, seven received L-Hydro treated pulmonary homografts and three received pulmonary homografts *fresco*, orthotopically implanted and followed-up for 320 days. Ovines were evaluated by means of laboratory tests and echocardiographic exams. At the end of the 320 days, they were euthanized, and hemodynamic, radiology, macroscopic, optic and electronic microscopic, scanning and transmission evaluations were performed. Results were analyzed by Student t test of independent samples for continuous data, by variance analysis of repeated measures, and by Fischer exact test for categorical data. We couldn't establish relevant differences in clinical evolution and laboratory tests between both groups. Echocardiogram revealed a difference in the pulmonary medium gradient, which was significant at the 10 months follow-up, higher in the control group than in the L-Hydro group. Radiologic and macroscopic evaluations didn't established differences. In the optic and electronic microscopic evaluation, liner and interstitial cells were equally

found in both groups. The cell liner percent calculated in both groups was similar. Cellularity nodules were observed only in the homograft *fresco* group. In conclusion, these data indicate that both groups presented similar clinical and hemodynamic performances. The L-Hydro group's echocardiogram presented a better performance. It also presented histological evidences of interstitial and endothelial cell repopulation. In the macro and optic and electronic microscopic analysis, group L-Hydro presented macroscopy, histological structure and ultra-structural similar to the homograft *fresco* group, with the exception of nodules with higher interstitial cellularity, present only in the homograft *fresco* group.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Diversas enfermidades cardiovasculares, congênitas ou adquiridas, determinam a necessidade de substituição de valvas cardíacas ou a interposição de condutos valvulados, sendo que por este motivo há mais de quarenta anos busca-se um substituto valvar ideal.

Estima-se que são realizadas, anualmente, pelo menos 60.000 substituições valvares nos EEUU e 170.000 no mundo^(1;2).

A troca valvar muda a evolução da enfermidade, trazendo nova perspectiva ao doente. Em 1952 HUFNAGEL e Harvey⁽³⁾ implantaram com sucesso prótese de bola na aorta descendente de paciente com insuficiência aórtica importante. A seguir, diversos cirurgiões tentaram a abordagem direta da valva aórtica. O Dr. Albert Star e seu engenheiro associado Lowell Edwards apresentaram em 1960 um modelo mais avançado de valva artificial mecânica, com gaiola e bola ⁽⁴⁾. Por outro lado, os substitutos biológicos tiveram o seu início com Lam et al ⁽⁵⁾, implantando homoenxertos na aorta descendente de cães; Murray⁽⁶⁾, em 1955, iniciou o uso clínico de homoenxertos na aorta torácica. As primeiras substituições valvares ortotópicas por valva biológica empregaram a valva aórtica do cadáver, retirada assepticamente, usando como meio de conservação a liofilização ou

solução de Hanks^(7;8). Eram os homoenxertos, que demonstraram bom resultado a curto prazo, apesar da dificuldade de obtenção.

O desenvolvimento das próteses mecânicas fez com que os homoenxertos fossem esquecidos, pelo menos até surgirem complicações, como as decorrentes da anticoagulação e o tromboembolismo.

Surgiu então o conceito de “bioprótese”⁽⁹⁾, conjugando material biológico montado sobre uma base metálica ou plástica.

Entre outros materiais biológicos utilizaram-se a fascia lata⁽¹⁰⁾, a dura-máter⁽¹¹⁾, o pericárdio bovino⁽¹²⁾ e a valva aórtica do porco⁽¹³⁾. Estes materiais tratados por vários métodos de preservação degeneram progressivamente, necessitando ser substituídos.

Retomado o interesse pelos homoenxertos, estes passaram a ser retirados de maneira não asséptica, porém limpa, sendo desinfetados/esterilizados quimicamente ou irradiados, o que determinou alta incidência de calcificação e ruptura⁽¹³⁾. Captação mais liberal, limpa mas não asséptica foi possível com a utilização de solução com antibióticos⁽¹⁴⁾, o que possibilitou a retirada em salas de autópsia; mesmo assim, sua utilização era limitada a poucas semanas. As soluções antibióticas, inicialmente usadas em concentrações elevadas, levaram a resultados inferiores aos obtidos com os homoenxertos a fresco. A concentração foi reduzida e alguns antibióticos eliminados, observando-se então nesses homoenxertos, conservados a 4 graus centígrados (4°C), resultados comparáveis aos bons resultados dos obtidos a fresco^(15;16).

Porém, a escassez de homoenxertos disponíveis e a necessidade de seu uso dentro de prazo relativamente exíguo, de quatro a seis semanas, ensejou a conservação dos mesmos pela criopreservação através dos Bancos de Homoenxertos⁽¹⁷⁾. A criopreservação consiste em preservar o homoenxerto, congelando-o. Para proteção contra a cristalização é empregado o dimetilsulfóxido, seguido de estocagem a -196 graus centígrados (-196°C), utilizando nitrogênio líquido. Os homoenxertos assim preparados podem ser estocados por longo período, facilitando a sua indicação, podendo apresentar em 10-15 anos sobrevida de 50-90% sem falha estrutural, contra 40-60% das biopróteses^(18;19). Atribui-se à criopreservação a capacidade de preservar a matrix extracelular dos homoenxertos, o que determinaria o seu bom resultado^(20;21). Alguns autores atribuem a esta técnica a conservação de células como os fibroblastos e mio-fibroblastos. Estas células regenerariam e recomporiam a matrix, retardando ou impedindo a sua degeneração. Mesmo a criopreservação não viabilizaria as células endoteliais, o que por muitos é encarado como vantagem⁽²²⁾, já que estas células são as maiores responsáveis por possível reação antígeno-anticorpo desencadeada pelo homoenxerto, que não é previamente testado contra um painel de leucócitos para determinação de compatibilidade do sistema HLA. Vários trabalhos tentam provar a importância da reação antígeno-anticorpo e o conseqüente processo inflamatório na gênese da degeneração de homoenxertos criopreservados⁽²³⁻²⁶⁾.

Outros autores, analisando 33 homoenxertos criopreservados explantados, não encontraram evidências de rejeição imunológica, atribuindo a degeneração dos mesmos a outros fatores biológicos, à sua não viabilidade a médio e longo prazo, e portanto à sua incapacidade de crescer, remodelar ou exercer função metabólica ativa⁽²⁷⁾.

A criopreservação⁽²⁸⁾, método de preservação de escolha nos dias atuais, permitiu maior disponibilidade de homoenxertos, de forma padronizada e com qualidade comprovada.

Alguns inconvenientes ainda permanecem, como a necessária sofisticação da metodologia, seu alto custo – que restringe sua utilização, a dificuldade de eliminação de agentes infecciosos e a degeneração no longo prazo^(1;21;29-31).

Tenta-se suprimir as reações imunológicas descelularizando os homoenxertos, preservando íntegra a matrix⁽³²⁻³⁴⁾. O homoenxerto descelularizado pode ser recelularizado “in vitro”, com as células retiradas do futuro hospedeiro⁽³⁵⁾, ou recelularizado “in vivo”, na medida em que após o implante as células do hospedeiro invadam o implante⁽³⁵⁻³⁷⁾.

Estes processos tornariam o homoenxerto um autoenxerto, com células vivas do próprio paciente: um enxerto “vivo” com capacidade de se recompor, como a própria valva nativa humana. É evidente que o resultado esperado deste processo de recelularização seria o de se conseguir um enxerto ideal; vários processos podem ser utilizados para a descelularização das valvas biológicas⁽³⁸⁻⁴⁰⁾.

Buscando disponibilizar homoenxertos preservados de maneira mais simples e econômica, mantendo a qualidade, avaliamos uma nova forma de preservação, com o uso do polietileno-glicol (PEG), denominada de preservação pelo método L-Hydro⁽⁴¹⁾. O PEG, que vem sendo empregado em vários processos de preservação de tecidos desde longa data⁽⁴²⁻⁴⁵⁾, suprime a reação imunológica e o conseqüente processo inflamatório e degenerativo. Trata-se de um polímero bastante estável quimicamente, produzido pela polimerização catalítica heterogênea a partir de monômeros de óxido de etileno, cujas propriedades são a solubilidade em água, cetonas, glicerol e etanol. Sua toxicidade é bastante reduzida, por ser quimicamente inerte e sua eliminação, quando em contato com a corrente sanguínea, se faz completamente pelo rim, sem que seja metabolizado, o que assegura o seu emprego clínico como veículo para dissolver fármacos pouco solúveis em água⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾. O PEG teria a propriedade de preservação estrutural e diminuiria a reação imunológica^(49;50) pela extração de antígenos e desativação de outros análogos remanescentes sob oxidação química.

Os enxertos tratados pelo PEG seriam reduzidos à sua estrutura colágena básica, permitindo a repopulação com células do hospedeiro a médio e longo prazo, o que se poderia chamar de “biointegração” do tecido implantado.

As propriedades de outros tecidos biológicos tratados pelo PEG, como a válvula porcina, foram avaliadas e comparadas, mostrando-se superior a outros métodos de preservação⁽⁵¹⁾, em respeito às características

biológica, química e mecânica, comparativamente ao enxerto fresco, bem como a sua biocompatibilidade, confirmando o bom desempenho.

Xenoenxertos valvados porcinos tratados pelo método L-Hydro, implantados em via de saída de ventrículo direito em carneiros jovens⁽⁵²⁾, assim como a Artéria Mamária Interna bovina, tratada pelo método L-Hydro e usada em carneiros, mostraram bons resultados iniciais⁽⁵³⁾.

Homoenxertos aórticos tratados pelo polietileno-glicol, implantados heterotopicamente na porção descendente da aorta torácica em carneiros, apresentaram bom desempenho⁽⁴¹⁾.

Baseados nestes achados, nos propusemos a comparar, em carneiros jovens, homoenxertos pulmonares “a fresco” com homoenxertos pulmonares tratados pelo método L-Hydro, implantados ortotopicamente.

Objetivos

2. Objetivos

Comparar morfológica e funcionalmente o homoenxerto pulmonar tratado pelo Polietilenoglicol (PEG), método L-Hydro, com o homoenxerto pulmonar a fresco implantado ortotopicamente em carneiros.

Casuística e Métodos

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este é um estudo experimental controlado, e os respectivos experimentos foram realizados no Centro de Pesquisas da Labcor Laboratórios (Belo Horizonte, Brasil), mediante a aprovação da Comissão Científica do Instituto do Coração e de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e seguiram as normas da American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care⁽⁵⁴⁾, tendo sido adotada a Nomina Anatômica Veterinária⁽⁵⁵⁾.

3.1. Seleção da amostra

Foram selecionados 14 ovinos receptores da raça Santa Inês (*Ovis aries*), treze machos, com idade entre 4 e 6 meses, confirmada pelo tempo de erupção e pelas mudanças na tábua dental, e com peso entre 18 e 32 kg. Os animais foram submetidos a exame clínico geral por médico veterinário, e considerados clinicamente sadios para o procedimento. Todos os animais receberam número de identificação individual e uma ficha clínica contendo

todos os cuidados a serem recebidos durante a permanência dos mesmos neste estudo.

Em dez animais (grupo L-Hydro) foram utilizados homoenxertos tratados pelo método L-Hydro e em quatro foram utilizados homoenxertos frescos (grupo controle).

Os animais com óbito nas primeiras 24/48 horas, considerados óbitos cirúrgicos, foram excluídos deste estudo.

3.1.1. Preparo dos homoenxertos

3.1.1.1. Preparação pelo L-Hydro

Os corações dos ovinos foram obtidos em abatedouro credenciado pelo Ministério da Agricultura e pelo Serviço de Inspeção Federal. Após, foram transportados em solução salina fria para o laboratório, onde o preparo se fez em local limpo, mas não em condições estéreis. Todo o processamento aconteceu num período de até 36 horas do abate do doador. O tronco pulmonar (artéria e valva) foi dissecado desde a sua bifurcação até a origem, preservando-se uma pequena aba muscular do ventrículo direito, suficiente para a realização da anastomose. Foi utilizado o processo L-Hydro™ (Philogenesis Inc., Monrovia, EUA)⁽⁵⁶⁾, em três etapas distintas:

1a: extração dos antígenos ovinos e mascaramento dos remanescentes sob oxidação química controlada pelo uso do ácido polietilenoglicol; (fórmula: HO.CH₂ (CH₂-CH₂) N-CH₂OH).

2a : incorporação ao enxerto de agente antiinflamatório não-esteróide (equivalente à aspirina) e de agente antitrombótico (equivalente à heparina);

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

Concluído o processo de preservação, os enxertos foram estocados em solução de etanol a 50% até a sua utilização.

3.1.1.2. Enxertos frescos

Os corações de ovelhas foram obtidos em sala cirúrgica contígua, em condições estéreis, anatomicamente idênticos ao da preparação L-Hydro. Após a dissecação e preparo do homoenxerto, cada um foi examinado e considerado em boas condições para uso, sendo então colocado em solução salina gelada a 4°C e imediatamente utilizado.

3.1.2. Preparo dos animais de experimentação

Os animais permaneceram em jejum de sólidos por 24 horas e de líquidos nas seis horas que antecederam a operação, quando foi

administrado 1,0 g de cefalotina intramuscular (IM). Quinze minutos antes da indução anestésica foi administrado 1mg de sulfato de atropina IM. A indução anestésica realizou-se através da administração endovenosa (EV) de 12,5mg.Kg⁻¹ de tiopental sódico. A veia jugular externa esquerda foi cateterizada e conectada a uma torneira de três vias para a administração de drogas e soluções eletrolíticas. Neste momento, foram administrados 250 mg de metilprednisolona e 1g de cefalotina EV. A seguir, realizada a intubação orotraqueal e inserida sonda orogástrica, através da qual eram administrados 150ml da solução de hidróxido de alumínio; a ventilação mecânica, estabelecida com volume de 12ml de O₂.Kg⁻¹, na freqüência de 12 ciclos por minuto. Em seguida, foi obtido o registro contínuo do traçado eletrocardiográfico e da temperatura retal, utilizando-se um monitor multiparamétrico (Bese, Belo Horizonte, Brasil). A anestesia, mantida pela administração de halotano a 1,5% por via inalatória e de 100mg de cloreto de suxametônio EV.

No anexo A, encontram-se os dados de identificação dos animais, incluindo-se data de nascimento, idade, peso e categoria (L-Hydro e homoenxerto fresco).

3.1.3. Implantes em animais

3.1.3.1. Técnica operatória

Com o animal posicionado em decúbito lateral direito, após a antisepsia e colocação de campos estéreis, realizamos toracotomia lateral esquerda no quarto espaço intercostal. A seguir, o pulmão esquerdo afastado com afastador maleável sobre compressa úmida expondo o saco pericárdico, o qual foi incisado longitudinalmente em direção ao ápice do coração. Neste momento, o animal recebeu heparina sódica na dose de 350 UI.kg⁻¹ EV, e dose adicional de 125mg de metilprednisolona EV. Dissecou-se o Tronco Pulmonar (TP) até a sua bifurcação com a identificação do Ligamento Arterioso. Após três minutos da administração de heparina, introduziu-se na aorta descendente cânula DLP 16Fr (DLP, Grand Rapids, EUA) com a ponta orientada cranialmente e, no átrio direito, uma cânula única de dois estágios DLP 30Fr. Após, a circulação extracorpórea (CEC) foi estabelecida utilizando-se oxigenador de membranas adulto (Vitae, DMG Equipamentos Médicos Ltda., Rio de Janeiro, Brasil), com volume do perfusato de 1500ml de Ringer Lactato (Fresenius, Campinas, Brasil). O fluxo arterial foi mantido entre 50 e 70 ml/kg/min e o fluxo de gás em 0,5l/min da mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂, os quais foram ajustados no transcorrer do procedimento de acordo com os valores da gasometria. Após a estabilização da CEC em normotermia e com o coração batendo, procedeu-se à oclusão da Artéria Pulmonar (AP) na sua porção distal (pinça

“DeBakey”) e observação da efetividade da drenagem venosa, com a AP mantendo-se vazia. Então, foi realizada a secção completa do TP, desde 1 a 2 milímetros acima do plano valvar, ressecando-se as três válvulas, até distalmente junto à pinça vascular. Procedeu-se assim ao implante do homoenxerto com a anastomose distal, reposicionando a pinça, em seguida realizando-se a anastomose proximal, ambas suturas realizadas de maneira contínua e fio de polipropileno (5-0), retirando-se a pinça vascular distal.

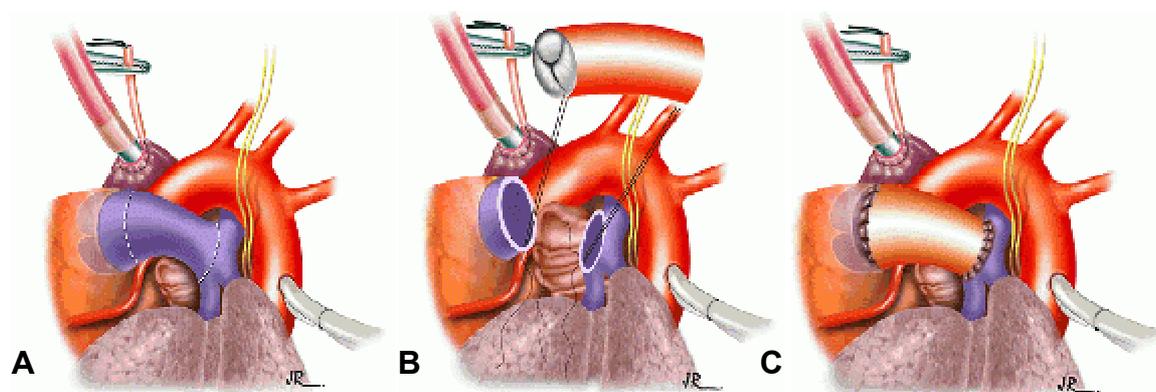


Figura 1. A) Valva e tronco pulmonar: linhas de ressecção no tronco pulmonar pontilhadas. Valva pulmonar ressecada. B) Interposição do enxerto homólogo. C) Suturas completadas. Aspecto final.

A hemostasia foi revisada, descontinuada a perfusão extracorpórea, o volume do oxigenador repostado, as cânulas retiradas e a ação da heparina revertida com uso de protamina, conforme o peso do animal. Mais uma vez a hemostasia revisada, o pericárdio suturado parcialmente, o tórax esquerdo drenado com tubo de ¼ de polegada multiperfurado e realizada a síntese por planos até a pele.

A cânula traqueal e o dreno torácico foram retirados ainda na sala cirúrgica, e em seguida os animais transferidos para a sala de recuperação pós-operatória⁽⁵⁷⁾.

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

3.1.3.2. Cuidados pós-operatórios

Após cinco horas da retirada da cânula traqueal, a oferta de líquidos e a dieta com feno foram reinstituídas, sendo administrados antibióticos: cefalotina/ 1g e gentamicina 3/4mg/Kg, por sete dias. Heparina subcutânea, 5000 UI a cada 12 horas, foi usada nos três primeiros dias. A temperatura retal dos animais foi monitorada diariamente na primeira semana e, ao término desta, quando considerados em condições clínicas satisfatórias, os animais foram transferidos para o biotério, onde permaneceram em observação diária até completar o tempo de observação de 320 dias.

3.1.3.3. Avaliação clínica e laboratorial

No transcurso dos 320 dias, além da observação diária e preenchimento da ficha clínica de cada animal pelo veterinário, realizou-se o controle laboratorial (hemograma, plaquetas, cálcio, fósforo, DHL) aos sete e

onze meses (precedendo o sacrifício dos animais). O peso final foi comparado ao inicial.

3.1.3.4. Avaliação EcoDopplercardiográfica

Avaliação EcoDopplercardiográfica foi realizada no sétimo e no décimo mês de pós-operatório, utilizando um equipamento da marca ATL Ultramark 6 (Philips, Drachten, Holanda) com transdutores de 2,0 e 3,0 megaHertz. As imagens foram obtidas nos cortes transversal, apical e paraesternal longitudinal em vários planos, gravados no mínimo três ciclos cardíacos consecutivos, sendo considerados os valores médios, excluindo-se as imagens não bem definidas.

Foram determinadas a mobilidade, a suficiência da valva, o grau de regurgitação valvar, os gradientes transvalvares médio e máximo.

O EcoDoppler colorido contínuo, obtido em posição apical, em corte de quatro câmaras, orientado para a válvula pulmonar, foi utilizado para determinar o grau de regurgitação do enxerto e, se existente, conforme orientação da AHA, relacionando o jato de regurgitação com a área da via de saída do ventrículo direito. O gradiente transvalvar máximo foi obtido pela medida da velocidade de fluxo sanguíneo trans-enxerto, utilizando a equação simplificada de BERNOULLI: $\text{gradiente} = 4 \times \text{velocidade de fluxo}$. O gradiente médio foi determinado pela planimetria da curva de fluxo pulmonar. A área valvar pulmonar foi determinada pela “equação de

continuidade”, avaliando-se a velocidade do fluxo na via de saída do ventrículo direito, sua área e o fluxo trans-enxerto.

3.1.3.5. Avaliação angiográfica

Avaliação angiográfica foi realizada após 320 dias de pós-operatório, e realizando-se o sacrifício dos animais para o explante das próteses. Foram coletados de todos os animais, aos seis meses e antes do sacrifício, amostras de sangue da veia jugular externa para hematimetria e bioquímica. Os animais foram anestesiados através da administração endovenosa de tiopental sódico na dose de 12,5mg.kg⁻¹, e em seguida intubados e ventilados mecanicamente; a anestesia, mantida pela inalação de uma mistura de oxigênio associada a 1,5% de halotano. O animal foi posicionado em decúbito lateral direito e, após antissepsia do lado cervical esquerdo, foi realizada uma incisão longitudinal para a exposição da veia jugular externa, através da qual se realiza cateterismo direito, utilizando-se um cateter de Swan-Ganz 7Fr. Foram obtidos os registros da pressão venosa central, cavidade direita, arterial pulmonar e do débito cardíaco por termodiluição. Foi realizada, também, a angiografia pulmonar por injeção de contraste à base de diatrizoato de meglumina (75%) e as imagens gravadas pela exposição simultânea a fluoroscopia, utilizando-se um fluoroscópio Philips XG 4002/00.

3.2. Sacrifício dos animais e explante das próteses

Os animais foram anestesiados de acordo com a técnica já descrita, sacrificados com injeção endovenosa de Cloreto de Potássio (KCl) a 19,1% e exsanguinados.

A seguir, realizou-se toracotomia esquerda e retirada em bloco do coração e vasos da base. Os homoenxertos eram expostos por transecção do ventrículo direito abaixo do sulco atrioventricular e pela transecção da bifurcação pulmonar. Após, foram lavados em solução salina e fotografados, procedendo-se à avaliação macroscópica. A seguir foram fixados em Solução de Karnowski e encaminhados para a mamografia. Após esse exame foram enviados para retirada de fragmentos para microscopia óptica de luz e eletrônica, de varredura e de transmissão. Os restos dos animais foram incinerados.

3.2.1. Avaliação macroscópica

Pelo exame macroscópico analisou-se:

- 1-funcionalidade e aspectos técnicos do procedimento realizado;
- 2-integridade dos tecidos do homoenxerto e miocárdio;
- 3-orientação, direção e mobilidade das válvulas;
- 4-presença de trombose, vegetação, calcificação e fibrose;
- 5-presença de solução de continuidade peri-enxerto (vazamento).

Desta análise resultou o levantamento dos seguintes itens⁽⁵⁸⁾, para cada homoenxerto:

- a- estenose
- b- insuficiência
- c- deiscência
- d- presença de vegetações
- e- rotura/rasgos/abrasão
- f- trombos nas válvulas
- g- trombos em seio de Valsalva
- h- calcificação nas válvulas
- i- calcificação em seio de Valsalva
- j- flexibilidade das válvulas
- k- espessamento das válvulas
- l- coaptação das válvulas

3.2.2. Avaliação radiológica

Os enxertos foram submetidos a estudo radiológico para determinar a distribuição e intensidade dos depósitos de cálcio existentes. Para tanto foi utilizado o mamógrafo Senographe DMR (GE, Buc, França), com voltagem de aceleração de 22 kV. O grau de calcificação obedeceu à classificação de Grabenwöger et al.⁽⁵⁹⁾, que se baseia na quantidade de depósitos de cálcio detectada, considerando quatro áreas diferentes da cúspide valvar: basal,

central, borda livre e comissural. Por este método a calcificação em cada uma destas quatro áreas é contada como um grau de calcificação, independente de quantas cúspides estejam afetadas (Figura 2).

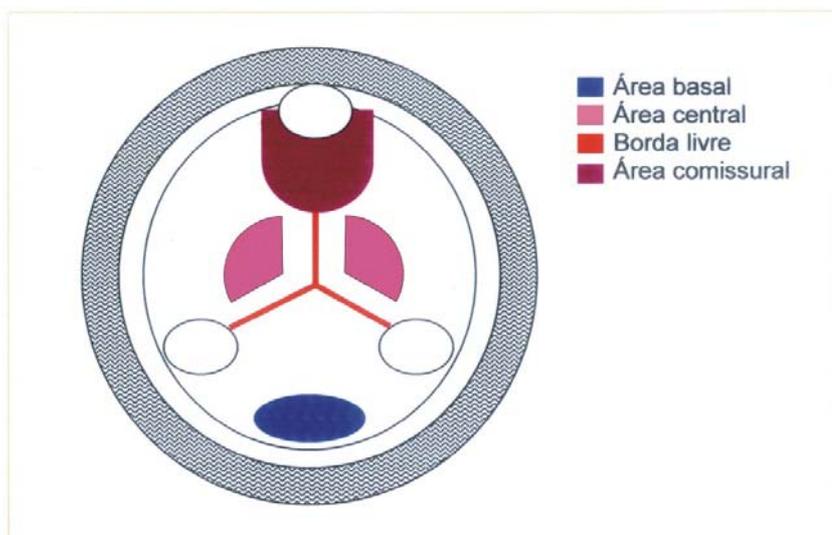


Figura 2. Esquema para classificação do grau de calcificação pela mamografia.

3.2.3. Avaliação histológica e imuno-histoquímica

Os homoenxertos conservados no fixador de Karnovsky foram inicialmente manipulados retirando-se de uma das válvulas – que se apresentasse macroscopicamente normal – pequeno fragmento de cerca de 2 x 2mm para análise pela microscopia eletrônica de varredura. Este fragmento foi fixado em glutaraldeído a 3%, lavado em cacodilato tamponado e desidratado com acetona até o ponto crítico do dióxido de

carbono, e em seguida recoberto com ouro e examinado no microscópio eletrônico de varredura JSM-6100.

A seguir procedeu-se à retirada de um fragmento de outra válvula, medindo cerca de 4 x 4 mm, o qual foi cortado em fragmentos de 1 x 1 x 1 mm, refixados em glutaraldeído a 3% e processados rotineiramente para exame ao microscópio eletrônico de transmissão.

A seguir todas as peças foram fotografadas e foi retirado segmento arterial circunferencial contendo toda a valva remanescente, o qual foi periodicamente seccionado, no sentido longitudinal, para avaliação das válvulas e dos seios de Valsalva, sendo integralmente processado, de forma rotineira, para inclusão em parafina. Cortes seqüenciais, a 4 μ m, foram corados pela hematoxilina-eosina e von-Kossa (para detecção de depósitos de cálcio).

Com o auxílio do processador de imagens (Axiovision, Zeiss) acoplado ao microscópio óptico comum (Axioskop II, Zeiss), foi delineado manualmente o perímetro total das secções das válvulas presentes na lâmina histológica (coloração hematoxilina-eosina) e o perímetro total das mesmas estruturas que apresentavam revestimento celular nas superfícies (presumivelmente células endoteliais ou em transformação para tal). O porcentual de revestimento celular foi calculado pela razão entre o perímetro total de superfície com revestimento celular e o perímetro total das válvulas, multiplicado por 100.

Os cortes também foram submetidos à técnica imuno-histoquímica para detecção de fator VIII, CD31, CD34 (marcadores de células endoteliais) e CD68 (marcador para macrófagos).

3.3. Análise estatística de dados

Os dados contínuos foram apresentados por média e desvio padrão e os categóricos por contagens. Evitou-se o uso de percentuais devido ao reduzido tamanho dos grupos em estudo.

A significância estatística das diferenças observadas foi obtida através de teste t de Student de amostras independentes para os dados contínuos, da análise de variância (ANOVA) para as medidas repetidas e pelo teste exato de Fisher nos dados categóricos. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. Os cálculos estatísticos foram executados com o auxílio do programa SPSS versão 15.0.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Análise clínica e laboratorial

Foram operados quatorze animais. Três faleceram até 24/48 horas de pós-operatório, 02 do grupo L-Hydro e 01 do grupo homoenxertos a fresco e foram excluídos do estudo, assim sendo a amostra ficou assim distribuída:

Grupo L-Hydro: composto por oito animais implantados com o homoenxerto pulmonar tratado pelo L-Hydro.

Grupo Controle: composto por três animais, com o homoenxerto a “fresco”.

Dos onze animais que constituem esta amostra, o de número 03 (teste) foi sacrificado aos 10 dias, pois sofreu traumatismo grave. No anexo B encontram-se discriminados os dados intraoperatórios (data da operação, tipo e tamanho das próteses e tempo de CEC).

Dez animais permaneceram em observação diária por 320 dias. O carneiro de número 01, do grupo L-Hydro, aos 82 dias de PO apresentou processo infeccioso com aparecimento de nódulos no pescoço que, tratados com antibióticos, regrediram aos 117 dias. Não houve diferença entre os dois grupos nos exames laboratoriais e no ganho de peso.

As médias, erros-padrão, nível descritivo do teste-t de Student das variáveis: idade, peso inicial e final e ganho ponderal e as variáveis dos exames laboratoriais, analisadas pela Análise de Variância para medidas repetidas, constam da tabela 1. Dados completos dos exames laboratoriais e peso dos animais encontram-se no anexo C.

Tabela 1. Comparação de variáveis selecionadas entres os grupos L-Hydro e Controle

Variável	L-Hydro n = 7	Controle n = 3	P	P _G	P _I
Idade, meses	5,4 ± 0,8	5,8 ± 0,6	0,47*		
Peso inicial, Kg	23,0 ± 4,7	22,3 ± 2,3	0,83*		
Peso final, Kg	40,4 ± 9,3	39,0 ± 2,6	0,81*		
Ganho ponderal, Kg	17,4 ± 6,0	16,7 ± 4,5	0,85*		
Dados Laboratoriais					
Hematócrito, %			<0,001 ^A	0,509	0,304
7 meses PO	51,3 ± 5,2	51,7 ± 3,2			
11 meses PO	71,3 ± 5,3	75,0 ± 3,5			
Hemoglobina, g/dL			0,022 ^A	0,232	0,737
7 meses PO	13,8 ± 2,1	12,4 ± 1,8			
11 meses PO	16,0 ± 1,7	15,2 ± 1,0			
Leucócitos, n ^o /μL			0,151 ^A	0,407	0,778
7 meses PO	7.150 ± 2.997	5.817 ± 2.157			
11 meses PO	6.357 ± 2.854	4.666 ± 577			
Cálcio, mg/dL			0,603 ^A	0,084	0,283
7 meses PO	9,1 ± 0,7	9,9 ± 0,7			
11 meses PO	9,3 ± 0,6	9,2 ± 0,4			
Fósforo, mg/dL			0,001 ^A	0,216	0,030
7 meses PO	6,8 ± 0,5	6,8 ± 1,8			
11 meses PO	7,6 ± 0,8	9,2 ± 1,6			
DHL, U/L			0,340 ^A	0,019	0,084
7 meses PO	293 ± 48	389 ± 15			
11 meses PO	309 ± 42	339 ± 14			
Plaquetas, n ^o /μL			0,153 ^A	0,443	0,545
7 meses PO	607.143 ± 109.653	533.333 ± 175.594			
11 meses PO	614.285 ± 106.904	550.000 ± 150.000			
Hemácias, n ^o /μL			0,796 ^A	0,145	0,665
7 meses PO	11.721 ± 4.177	15.200 ± 2.227			
11 meses PO	11.857 ± 2.115	14.666 ± 1.528			

Os dados são apresentados como média±DP;

* significância estatística obtida pelo teste *t* de *Student*.

^A obtida através da Análise de Variâncias para medidas repetidas: fator tempo

P_G : obtida através da Análise de Variâncias para medidas repetidas: fator grupo

P_I: obtida através da Análise de Variâncias para medidas repetidas: interação

4.2. Análise EcoDopplercardiográfica

Os carneiros foram submetidos à ecocardiografia aos 7° e no 10° meses de acompanhamento pós-operatório (Eco 1 e Eco 2).

A função ventricular estava preservada em todos os casos nos dois grupos, no Eco 1 e Eco 2.

As valvas pulmonares foram bem visibilizadas e abriam-se sem restrições, exceto no caso número 01, em que não houve boa visibilização. Não foi evidenciada insuficiência da valva pulmonar em nenhum caso.

No exame realizado aos dez meses, em dois casos do grupo L-Hydro foram descritos valvas com pouca e difusa calcificação.

Aos 7° e 10° meses foi avaliado o gradiente pulmonar máximo e médio, a pressão do ventrículo direito (VD) e o diâmetro do enxerto.

Não houve diferença significativa entre os dois grupos, com exceção do gradiente médio pulmonar ($p= 0,01$), aos 10 meses. As variáveis Ecocardiográficas obtidas aos 7 e 10 meses foram analisadas pela Análise de Variância para medidas repetidas e constam da Tabela 2.

Os dados completos estão discriminados no anexo D.

4.3. Análise angiográfica e hemodinâmica

Não houve diferença estatística quando comparados os dois grupos quanto à pressão venosa central (PVC), pressão arterial pulmonar (PAP), pressão capilar pulmonar (PCP) e débito cardíaco.

Na angiografia pulmonar os dois grupos apresentaram homoenxertos suficientes, com válvulas de mobilidade normal e sem estenose, com exceção do caso número 1, do grupo L-Hydro, em que constatamos insuficiência importante.

As médias, os erros-padrão e o nível descritivo do teste-t de Student das variáveis hemodinâmicas constam da Tabela 2.

Os dados completos das variáveis angiográficas e hemodinâmicas encontram-se no anexo E.

Tabela 2. Comparação de variáveis selecionadas entres os grupos L-Hydro e Controle

	L-Hydro n = 7	Controle n = 3	P	P _G	P _I
Ecocardiograma					
Gradiente máximo pulmonar, mmHg			0,656 ^A	0,049	0,758
7 meses PO	2,8 ± 2,2	5,4 ± 1,9			
10 meses PO	2,8 ± 0,6	5,0 ± 2,3			
Gradiente médio pulmonar, mmHg			0,301 ^A	0,030	0,957
7 meses PO	1,8 ± 1,4	3,4 ± 0,7			
10 meses PO	1,4 ± 0,4	3,0 ± 1,2			
Pressão em VD, mmHg			<0,001 ^A	0,418	0,506
7 meses PO	18,8 ± 5,7	22,7 ± 3,4			
10 meses PO	34,5 ± 5,9	39,6 ± 2,7			
Diâmetro do enxerto pulmonar			0,335 ^A	0,268	0,826
7 meses PO	21,0 ± 2,2	19,3 ± 0,6			
10 meses PO	22,6 ± 2,3	20,3 ± 6,4			
Dados Hemodinâmicos					
PVC, cm de H ₂ O	-0,57 ± 1,31	0,50 ± 0,87	0,24*		
PAP, mmHg	8,00 ± 3,51	8,33 ± 2,08	0,88*		
PCP, mmHg	3,90 ± 0,89	4,50 ± 4,77	0,78*		
Débito cardíaco, ml/minuto	4035 ± 843	4393 ± 907	0,56*		

Os dados são apresentados como média±DP;

* significância estatística obtida pelo teste *t* de Student.

^A obtida através da Análise de Variâncias para medidas repetidas: fator tempo

P_G : obtida através da Análise de Variâncias para medidas repetidas: fator grupo

P_I: obtida através da Análise de Variâncias para medidas repetidas: interação

mmHg= milímetros de mercúrio; Pressão em VD= pressão no ventrículo direito; PVC= pressão venosa central; PAP= pressão em artéria pulmonar; PCP= pressão em capilar pulmonar; ml/minuto= mililitros por minuto.

4.4. Análise dos achados radiológicos

A Mamografia demonstrou ausência de imagens radiopacas sugestivas de calcificação (Alta Densidade) nas válvulas pulmonares, tanto no grupo L-Hydro quanto nos homoenxertos a fresco.

Evidência houve de áreas com imagens radiopacas sugestivas de calcificação (Alta densidade) nas regiões correspondentes às linhas de sutura, tanto nos enxertos teste quanto nos enxertos controle.

A classificação de GRABENWOGER proposta no material e métodos não foi utilizada pela ausência de calcificações.

4.5. Avaliação macroscópica

O caso 01, do grupo L-Hydro, apresentou insuficiência valvar às custas de vegetações fibrinosas, parcialmente calcificadas, localizadas nos seios de Valsalva, com destruição das válvulas.

Com exceção deste caso, os homoenxertos do grupo L-Hydro e homoenxerto a “fresco” não apresentaram estenose, insuficiência, deiscência ou rupturas/abrasão.

Também, com a exceção do caso número 01, todos os outros casos dos dois grupos apresentaram válvulas flexíveis, coaptadas e não espessadas.

Quanto a trombo, em um outro caso do grupo L-Hydro, constatamos sua existência no tamanho de 2x4mm numa das válvulas. Não constatamos trombo em válvula, nos casos do grupo a “fresco”.

Verificamos trombo em seio de valsalva em quatro casos do grupo L-Hydro e em todos os três do grupo a “fresco”.

Calcificação em válvulas verificou-se apenas no caso inicialmente citado, e no anel valvar em nenhum caso dos dois grupos. Na figura 3 encontram-se alguns dos casos estudados.

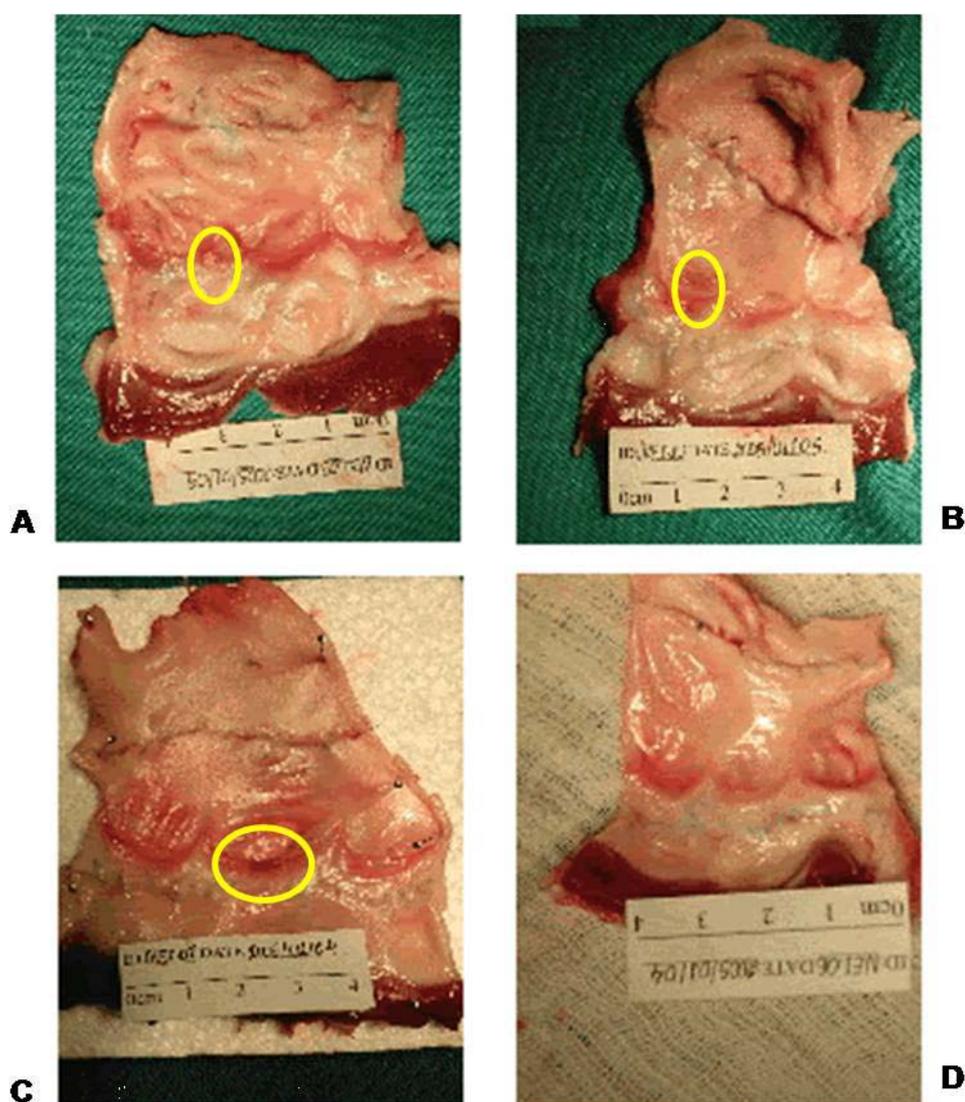


Figura 3. Avaliação Macroscópica. A) Grupo L-Hydro: calcificação de 1x1mm subcomissural. Válvulas flexíveis. B) Grupo controle: trombo organizado no Seio de Valsalva de 5x7mm. Válvulas flexíveis. C) Grupo L-Hydro: trombo organizado na borda livre, de 2x4mm. Válvulas flexíveis. D) Grupo L-Hydro: válvulas flexíveis. Círculo amarelo demonstra o local da calcificação ou trombo.

As variáveis da avaliação macroscópica, analisadas pelo teste exato de Fischer, constam da tabela 3. No anexo F encontram-se discriminados os achados macroscópicos de todos os casos da série, após 320 dias de seguimento.

Tabela 3. Comparação de variáveis macroscópicas selecionadas entres os grupos L-Hydro e Controle

	L-Hydro N = 7	Controle n = 3	P
Macroscopia (Calcificações e Trombos)			
Calcificação do anel	0	0	0,99
Calcificação das cúspides	1	0	0,99
Trombo no seio de Valsalva	3	3	0,20
Trombo nas cúspides	1	0	0,99
Macroscopia Geral do Homoenxerto			
Estenose	0	0	0,99
Insuficiência	1	0	0,99
Deiscência	0	0	0,99
Vegetações	1	0	0,99
Ruptura/Abrasão	0	0	0,99
Cúspides			
Cúspides flexíveis	6	3	0,99
Cúspides coaptadas	6	3	0,99
Cúspides espessadas	1	0	0,99

Os dados são apresentados como contagens simples nas variáveis categóricas.

P: significância estatística obtida pelo teste exato de Fisher.

4.6. Análise histológica

4.6.1. Aspectos da microscopia óptica

Observaram-se válvulas pouco retraídas, com adelgaçamento progressivo em direção à borda livre, que apresentavam celularidade geralmente escassa ou ausente e aspecto intensamente eosinófilo. De forma geral, a celularidade intersticial predomina nas regiões próximas ao anel e parece mais exuberante na metade voltada para a luz ventricular (camada ventricular e esponjosa); entretanto, nódulos de maior celularidade intersticial foram observados em áreas intermediárias das válvulas, nos casos 8, 10 e 11. Células atapetando parte da superfície das válvulas foram observadas em todos os casos, à exceção do número 1, em ambas as faces (predominando na ventricular), tanto na região próxima ao anel como na próxima à borda livre. No caso número 1 foi detectado no miocárdio cisto parasitário, *Sarcocystis* spp, achado freqüente em ovinos e não relacionável ao quadro infeccioso apresentado por este animal. A figura 4 mostra exemplos de casos de acordo com a descrição acima.

O porcentual de revestimento celular, calculado da maneira já descrita, está expresso nas medidas da tabela 4. O caso 1 não foi avaliado, pois havia extensa destruição dos folhetos; entretanto, não foram vistas células de revestimento superficial nesse caso. Os dois grupos apresentaram porcentual de revestimento semelhante, analisados pelo teste t de Student, com $p= 0,775$.

Tabela 4. Mostrando o percentual de revestimento celular.

Caso	Nº. de secções de folheto medidas	Perímetro total dos folhetos (μm)	Perímetro total da superfície com revestimento celular (μm)	Porcentual de revestimento celular
2	5	44173,72	10564,27	23,9
4	1	14315,41	3020,93	21,1
5	2	27332,38	2528,69	9,3
6	1	7862,29	5016,68	63,8
7	3	34719,29	9503,28	27,4
8	1	8838,98	16356	18,5
9	2	1109,17	3407,41	30,7
10	3	30986,3	17193,27	55,5
11	3	34209,26	9499,34	27,8

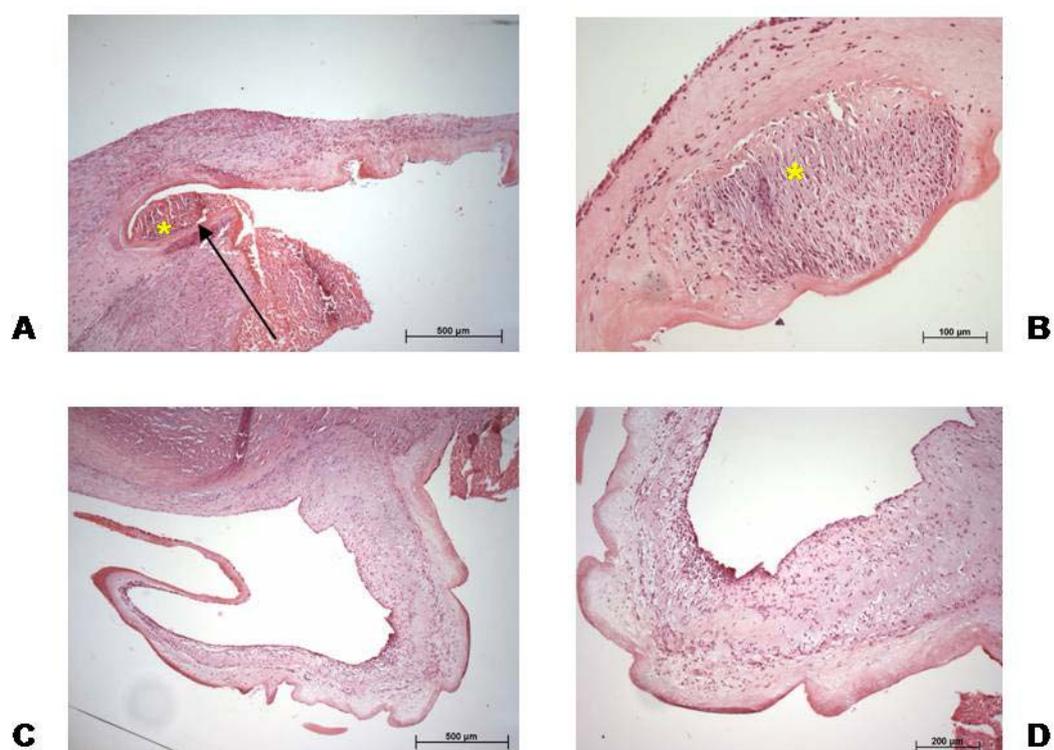


Figura 4. Microscopia Óptica. A) Grupo L-Hydro: trombo em organização no seio de Valsalva. B) Grupo Controle: nódulos de maior celularidade. C) Grupo L-Hydro: Válvula com adelgaçamento progressivo em direção à borda livre, com celularidade escassa. D) Grupo L-Hydro: celularidade intersticial predomina nas regiões próximas ao anel e parece maior na metade voltada para a luz ventricular. Asteriscos demonstram local do trombo organizado(A) e local do nódulo de maior celularidade(B).

4.6.1.1. Análise imuno-histoquímica

As reações para fator VIII, CD31, CD34 e CD68 foram completamente negativas, mesmo em células que deveriam apresentar imunoreatividade, o que nos levou a concluir que o material não apresentava boa preservação antigênica, provavelmente devido ao fixador utilizado (Karnovsky).

4.6.2. Aspectos da microscopia eletrônica de varredura

Em todos os casos do Grupo L-Hydro e do Grupo homoenxerto a fresco, à exceção do número 1, notaram-se áreas de superfície pavimentadas por células arredondadas ou alongadas, por vezes com disposição paralela, compatível com células endoteliais, como visto na figura 5.

No caso de número 1, observou-se ausência de endotélio, verificando-se colágeno desnudo.

Todos os nossos casos apresentaram o aspecto de endotélio normal de ovinos, conforme publicado na literatura⁽⁶⁰⁾, ou seja, com células poliédricas, de revestimento, com aspecto semelhante a paralelepípedo.

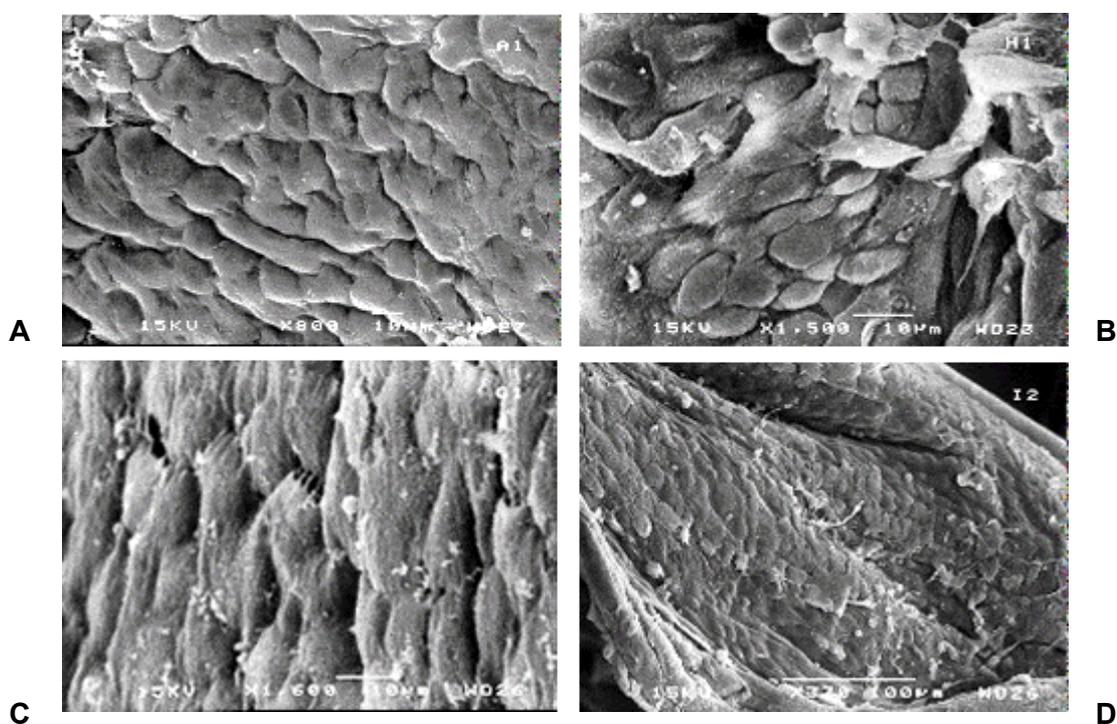


Figura 5. Microscopia Eletrônica de Varredura. A) e B) Grupo L-Hydro: células poliédricas, de revestimento, endoteliais, semelhantes a paralelepípedo. C) e D) Grupo Homo enxerto a fresco: mesmo aspecto.

4.6.3. Aspectos da microscopia de transmissão

Em meio a numerosas fibras de colágeno, verificou-se a presença de células ultraestruturalmente íntegras, de formato arredondado ou alongado (mais comumente), com numerosas projeções citoplasmáticas; núcleo com cromatina condensada na periferia e citoplasma contendo organelas habituais, notando-se, em algumas, corpúsculos eletro-densos. O aspecto ultraestrutural compatível com células mesenquimais viáveis,

provavelmente fibroblastos. Nos casos 5,6,7,9 foram observadas células revestindo parcialmente as válvulas. Tais células eram semelhantes às descritas anteriormente, apresentando projeções citoplasmáticas interdigitantes. No caso 5 notou-se a presença focal de membrana basal abaixo das citadas células e estruturas de junção celular estavam presentes nos casos 6 e 9. No caso 9 notou-se a presença de abundante pinocitose e grânulos citoplasmáticos elétron-densos em algumas dessas células superficiais. Tais aspectos são compatíveis com células endoteliais, provavelmente em processo de diferenciação.

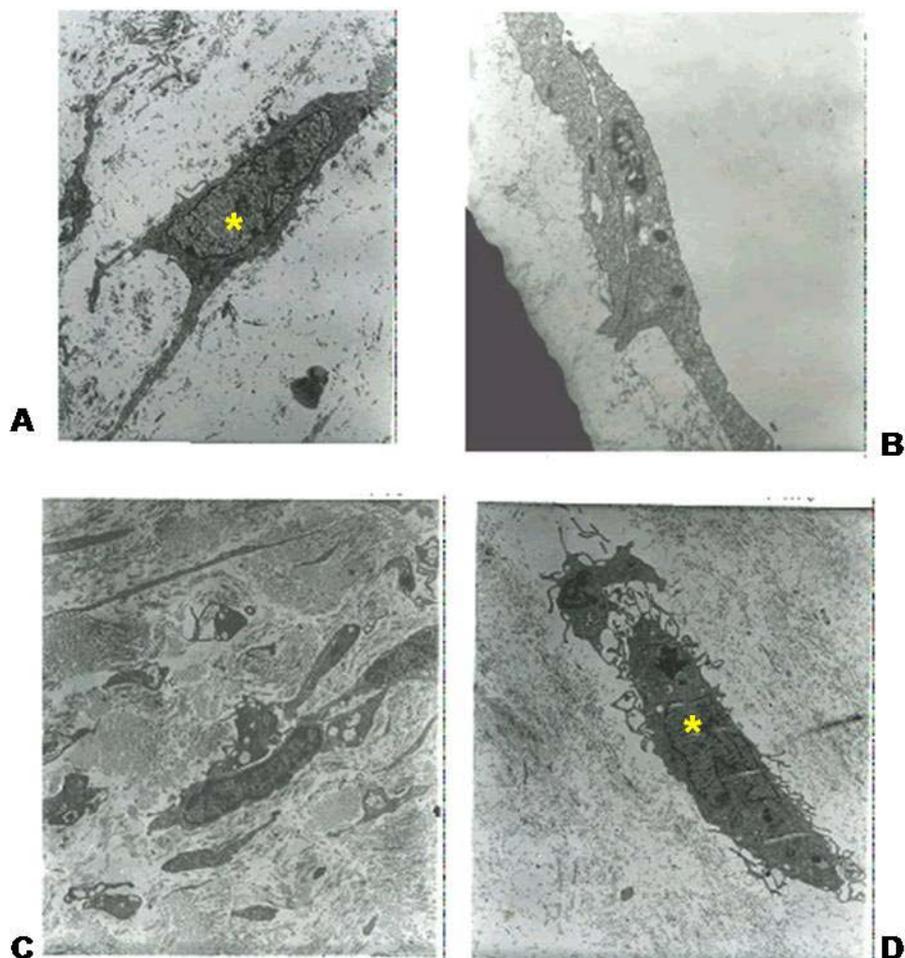


Figura 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão. A) Grupo L-Hydro: células intersticiais preservadas. B) Grupo L-Hydro: abundante pinocitose e grânulos citoplasmáticos eletrodensos nas células superficiais compatível com células endoteliais em processo de diferenciação. C) Grupo homoenxerto a fresco: numerosas células intersticiais alongadas, bem preservadas. D) Grupo homoenxerto a fresco: célula intersticial alongada bem preservada. Asteriscos ressaltam as células intersticiais.

4.6.4. Descrição individual dos casos e tabelas

Descrição histológica individualizada de cada caso encontra-se no anexo G.

O resumo dos achados histológicos encontra-se no anexo H.

As médias, os erros-padrão e o nível descritivo do teste-t de Student das variáveis da avaliação histológica constam da tabela 5.

Tabela 5. Comparação de variáveis selecionadas entres os grupos L-Hydro e Controle.

	L-Hydro n = 7	Controle n = 3	P
Microscopia Óptica			
Células Superficiais	6	3	0,99
Células Inflamatórias	4	1	0,99
			<0,0
Nódulos de maior celularidade	0	3	1
Microscopia Eletrônica			
Células Superficiais MET	4	0	0,20
Células Superficiais MEV	6	3	0,99
Células Intersticiais MET	7	3	0,99

Os dados são apresentados como contagens simples nas variáveis categóricas.
P: significância estatística obtida pelo teste exato de Fisher.

Células Superficiais MET= presença de células superficiais na microscopia eletrônica de transmissão; Células Superficiais MEV= presença de células superficiais na microscopia eletrônica de varredura; Células Intersticiais MET= presença de células intersticiais na microscopia eletrônica de transmissão.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Pesquisam-se há mais de cinquenta anos substitutos valvares e enxertos valvados, pois a necessidade de sua utilização é freqüente em todas as regiões, desenvolvidas ou não. Impõe-se sempre o uso de um substituto de qualidade, pois dele depende o sucesso do procedimento cirúrgico. Outros fatores de relevância são a disponibilidade e o preço.

A criopreservação, método de escolha para preservação dos homoenxertos, demonstra qualidade; porém, a disponibilidade deixa a desejar e seu custo pode ser elevado. Alguns eventos, como a degeneração no longo prazo⁽⁶¹⁾, a calcificação precoce em jovens⁽⁶²⁾, a dificuldade de uma esterilização garantida sem agredir as células e a estrutura extra-celular^(63;64) persistem. Sua sofisticação e alto custo dificulta seu emprego em regiões menos desenvolvidas, pois complexo mesmo quando disponível o transporte do enxerto criopreservado.

Ao se optar por substituto valvar biológico, o ideal seria a utilização de heteroenxertos – com alguma forma de tratamento – pela facilidade de obtenção, embora a resposta imunológica possa ser maior. A tentativa foi feita através do método Sinergraft (Criolife, Inc.). Após bons resultados experimentais, o uso clínico dos heteroenxertos decelularizados revelou-se

desastroso⁽⁶⁵⁾, sendo descontinuado, permanecendo o método empregado em homoenxertos, com bons desfechos publicados recentemente⁽⁶⁶⁾. A decelularização de heteroenxertos pelo ácido deoxicólico (DOA) mostra bons resultados experimentais⁽⁶⁷⁾ e clínicos, aos 24 meses de observação⁽⁶⁸⁾. Outros métodos de decelularização, como o que emprega o dodecilsulfato de sódio (SDS) em homoenxertos, revela-se promissor.⁽⁶⁹⁾

O polietilenoglicol (PEG), já testado em outros tipos de tecido⁽⁵¹⁻⁵³⁾, se apresenta como método mais simples quando comparado à criopreservação. É também método de baixo custo e pouco sofisticado. Os homoenxertos preparados pelo método L-Hydro apresentaram facilidade de manuseio e de colocação das suturas, e a hemostasia nos orifícios de sutura fez-se rápida e completa.

O agente de preservação tecidual do método L-HydroTM é o polietilenoglicol (PEG). Este é um polímero bastante estável quimicamente, devido ao grande número de oxigênio na cadeia polimérica, tendo grande propensão à formação de complexos e associando-se a eletrólitos em soluções diluídas. O PEG é produzido a partir do óxido de etileno, sendo solúvel em água, cetonas, glicerol e etanol; entretanto, é menos higroscópico e resiste melhor à decomposição do que estes dois últimos compostos^(63;70), sendo quimicamente inerte e pouco tóxico. Quando absorvido pela circulação sanguínea, sua excreção se faz completamente pelo rim, sem ser metabolizado. Tem aplicação clínica como veículo para dissolver fármacos pouco solúveis em água, como a reserpina e a nitrofurantoína ou aqueles facilmente hidrolisáveis, como os barbituratos alcalinos⁽⁷¹⁻⁷⁴⁾.

WICOMB et al.⁽⁷⁵⁾ demonstraram a toxicidade reduzida do PEG, relatando experimentalmente que a administração de dose elevada, 16 g/kg durante 12 a 16 horas, não produzia efeitos adversos, e que a administração prolongada é igualmente inócua.

O PEG mostrou-se eficaz em vários estudos experimentais in vitro quando adicionado à solução de preservação miocárdica, garantindo a viabilidade funcional do órgão por tempo mais prolongado (até 24 horas) do que aquele preconizado com o uso das soluções cardioplégicas convencionais como a de “Saint Thomas” e da “University of Wisconsin”, que é de quatro a seis horas ^(43;45;76). Esta capacidade de preservação mais prolongada deve-se à ação osmótica do PEG, que estabiliza a membrana tornando-a menos permeável ao soluto extracelular e, conseqüentemente, prevenindo o edema celular ⁽⁷⁵⁾. O PEG mostrou-se igualmente eficaz quando utilizado na criopreservação de coração de ratos conforme o estudo de BANKER et al.⁽⁴²⁾, os quais relataram que a inclusão de PEG permitiu a redução do conteúdo de água e da formação de gelo tecidual, minimizando eventuais lesões miocárdicas pelo congelamento.

A preservação L- HydroTM utilizada neste estudo está baseada também na capacidade imunossupressora do PEG. Antígenos que se combinam com o PEG manifestam redução de antigenicidade, como relatado por COLLINS et al.⁽⁴⁹⁾, que observaram redução de 30% na incidência de rejeição no grupo de receptores de transplante cardíaco nos quais os órgãos dos doadores foram preservados com uma solução contendo PEG a 5%. O estudo de TOKUNAGA et al.⁽⁴⁴⁾ demonstrou aumento

estatisticamente significativa na sobrevivência (11,9 versus 9,6 dias) com transplante hepático de ratos cujos órgãos foram previamente irrigados com solução de PEG de alto peso molecular (20.000 daltons). Estes autores atribuem a ação imunossupressora à ligação do PEG com os antígenos da membrana celular, formando complexos reversíveis, os quais alteram ou mascaram sua superfície celular de maneira análoga àquela descrita para a combinação química específica com os alérgenos, ou seja, interferem na ativação dos macrófagos e, conseqüentemente, na ativação das células T4, induzindo ao estado de tolerância aos antígenos do doador, cuja imunogenicidade torna-se reduzida. De modo semelhante, na preservação L-HydroTM os antígenos são extraídos e os remanescentes são mascarados mediante a oxidação química controlada com o uso do PEG.

Cheung afirma que “este é um processo que torna as células não viáveis, não agredindo a estrutura extracelular, não preocupando-se em extrair as células, no que difere da decelularização” (comunicação pessoal).

A literatura mostra que homoenxertos aórticos de carneiros tratados pelo PEG⁽⁴¹⁾ e utilizados na aorta descendente permanecem funcionais após nove meses, com a matrix de colágeno original, sem calcificação e apresentando reabitação celular.

Nas biopróteses suínas tratadas pelo PEG e implantadas em carneiros jovens⁽⁵¹⁾, este tratamento permitiu a endotelização espontânea com boa adesividade celular à matriz colagênica. Vários outros trabalhos estão em curso utilizando o PEG, como o uso de xenoenxertos

pulmonares⁽⁵²⁾, prótese vascular heteróloga⁽⁵³⁾ e biopróteses sem suporte, todos com resultados iniciais alentadores.

Para conduzir este trabalho “in vivo”, optamos pelo uso do carneiro, pela semelhança de suas válvulas e estruturas cardíacas com as do coração humano, em termos de propriedades mecânicas e parâmetros de fluxo hemodinâmico⁽⁷⁷⁾. O tamanho do anel valvular, a frequência e o débito cardíaco são também equivalentes⁽⁷⁸⁾.

A análise de 1200 animais, mamíferos domésticos, revelou semelhança de suas válvulas aórtica e pulmonar com as humanas, diferindo somente na proporção dos componentes do tecido conjuntivo⁽⁷⁹⁾.

Escolhemos animais imaturos (juvenis) para uso, pois nestes os tecidos biológicos calcificam e degeneram progressiva e rapidamente, como nos pacientes jovens^(80;81).

Há dificuldade de trabalhar com tais modelos, haja vista a dificuldade expressa na literatura devido ao número reduzido de animais utilizados nos vários trabalhos publicados⁽⁸²⁻⁸⁵⁾.

A International Standards Organization, através da ISO-5840, propõe, para trabalhos experimentais, o uso de 10 (dez) animais por 20 (vinte) semanas para o grupo “teste”, e de 02 (dois) animais pelo mesmo período para o grupo controle. Este trabalho tem 07 (sete) animais no grupo L-Hydro, porém com um seguimento de 45 (quarenta e cinco) semanas, o que representa um seguimento superior ao recomendado. No grupo homoenxerto a fresco, o número de animais é maior que o sugerido^(86;87).

O preparo, a técnica cirúrgica e os cuidados com os carneiros seguiram as rotinas publicadas⁽⁸⁸⁾.

Comparamos o grupo L-Hydro com o grupo controle, de homoenxertos a "fresco" de uso imediato, constituindo-se pois de enxertos "*homovital*". Assim procedemos para termos como referencial de comparação, no grupo controle, o "padrão ouro" dos enxertos. Trabalhos clínicos publicados com o uso de enxertos "*homovital*" mostram um excepcional resultado, atingindo até 97% de enxertos livres de degeneração em 10 anos⁽⁸⁹⁾.

Sabemos que qualquer processamento dos homoenxertos, incluindo a esterilização, tem o potencial de alterar a viabilidade, bem como as propriedades físicas e antigênicas da valva. Na série de Yacoub⁽⁸⁹⁾, a aplicação do "*homovital*" foi fator independente de redução de mortalidade, portanto nosso grupo controle representa o que de melhor se pode obter com esta técnica.

O número de carneiros no grupo homoenxertos frescos, como já discutido, ultrapassa o mínimo recomendado pela ISO-5840. Outro fator a ser levado em conta é o conhecido comportamento dos homoenxertos de carneiro a "fresco" descrito na literatura^(30;41;91-93), os quais, após alguns meses, apresentam marcada redução da celularidade, podendo apresentar formação de feixes fibrosos recobrimo parcialmente as válvulas, mostrando infiltração de macrófagos e camada endotelial com perda da continuidade e ruptura progressiva da estrutura trilaminar. Nossos casos a "fresco" apresentaram as alterações descritas na literatura.

Nos dois grupos, grupo L-Hydro e grupo homoenxertos a “fresco”, não detectamos diferença estatisticamente significativa quanto à idade, peso inicial e final e ganho ponderal.

Os exames laboratoriais colhidos aos 6 e 11 meses⁽⁷⁸⁾ não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos quanto às variáveis estudadas. O hematócrito e a hemoglobina se mostraram elevados aos 11 meses, mas sem diferenças entre os grupos. Atribuímos esta elevação a uma possível desidratação dos animais ao final do experimento.

O ecocardiograma, nas janelas cranial e caudal esquerda, tem se mostrado confiável na avaliação pós-operatória em carneiros jovens. Seus resultados têm sido concordantes com os achados pós-explante, quanto à presença de calcificação, mensuração de estruturas e informações hemodinâmicas⁽⁹⁴⁾. Usamos pois esta ferramenta, realizando o ecocardiograma aos sete e dez meses do pós-operatório que, ao mostrar função ventricular preservada em todos os casos, indicou boa funcionalidade dos enxertos; revelou válvulas bem visualizadas e com abertura sem restrições. Houve a exceção do caso 01, no qual as mesmas não foram bem visualizadas, o que correspondeu ao achado macroscópico, pois neste caso os folhetos estavam destruídos. Em dois casos, no grupo L-Hydro, a Ecocardiografia detectou válvulas com calcificação leve e difusa (casos 2 e 9). Estes achados não tiveram correspondência no estudo radiológico, tampouco no exame macroscópico, sendo que o caso 9 apresentou calcificação focal na microscopia óptica.

Aos sete e dez meses de PO, os gradientes pulmonares médio e máximo mostraram-se com diferença significativa a favor do grupo L-Hydro, revelando gradientes médios mais elevados no grupo de homoenxertos a fresco, demonstrando neste aspecto melhor comportamento do grupo L-Hydro. O anel pulmonar no grupo L-Hydro mostrou aumento estatisticamente significativo entre o implante e os Eco 1 e Eco2. Entre os dois Ecos, realizados aos 7 e 10 meses, não houve aumento significativo do anel pulmonar.

As medidas hemodinâmicas foram registradas conforme as recomendações do U. S. Department of Health, observando a necessidade de um débito cardíaco mínimo por ocasião de sua mensuração. Estas revelaram bom desempenho nos dois grupos, não se estabelecendo diferenças significativas entre os mesmos.

O exame macroscópico do homoenxerto pulmonar – e particularmente das valvas pulmonares – obedeceu à sistemática descrita por Saik e cols., que nos pareceu a mais completa publicada⁽⁹⁵⁾. O exame revelou em todos os casos uma boa integração do enxerto, bem como válvulas com aspecto normal – à exceção do caso 01 (grupo L-Hydro), que apresentava válvulas destruídas, exibindo processo infeccioso, com gânglios cervicais respondendo ao tratamento antibiótico, ao que atribuímos os achados. O cisto parasitário encontrado no miocárdio deste caso, *Sarcocystis* spp, é achado freqüente neste tipo de animal, não se relacionando ao quadro infeccioso. Calcificações nas válvulas ou no anel não foram verificadas pelo exame radiológico ou à macroscopia, constituindo

resultado satisfatório, pois trabalhou-se com carneiros jovens, por um prazo longo. Presença de trombos nas válvulas ou nos seios de Valsalva revelou-se achado comum, justificado pelo não uso de anticoagulantes. Ressalte-se ser este um achado freqüente na literatura⁽⁹⁶⁾; nestes aspectos, não conseguimos detectar diferenças entre os grupos.

Os achados microscópicos, excetuando-se o caso de número 01, mostraram a presença de camada endotelial nos enxertos, já que tanto a microscopia ótica quanto a microscopia eletrônica de transmissão (e especialmente a de varredura) confirmaram a presença de camada de células de revestimento. Este achado é importante, já que células endoteliais previnem trombose, produzem substâncias vasoativas, nutrem fibroblastos, estimulam a produção de colágeno, ajudam a prevenir a insudação lipídica e a calcificação distrófica⁽²²⁾. O porcentual de revestimento celular foi semelhante nos dois grupos. As reações imuno-histoquímicas foram negativas, mesmo em células que obrigatoriamente deveriam apresentar imunorreatividade. Atribuímos este achado ao uso da Solução de Karnowski.

Foi demonstrada na MET a presença de células intersticiais, fibroblastos, em todos os casos. Assim, também com os achados microscópicos não conseguimos estabelecer diferenças entre os dois grupos. A exceção foi o achado de nódulos de maior celularidade, que foram significativamente mais frequentes no grupo controle. Presença de nódulos de maior celularidade nas válvulas foram descritos em homoenxertos⁽⁹⁷⁾ e interpretados como forma de ingresso celular do hospedeiro. A presença de nódulos de celularidade em todos os casos do grupo controle foi por nós

atribuída a uma repopulação intersticial mais rápida neste tipo de homoenxerto. Entendemos que o método L-Hydro propiciou uma boa incorporação do enxerto, pela presença de endotelização e de células intersticiais na matriz⁽⁹⁸⁾ em todos os casos, ainda que as células sejam numericamente diminuídas em relação ao tecido normal.

Fator a ser levado em conta na análise destes resultados é o fato dos carneiros apresentarem baixa reação antigênica, tanto que usa-se sangue entre os animais sem preocupação com o sistema ABO/Rh, e sem conseqüências clínicas.

Neste estudo, que conta com uma amostra de 3 animais no grupo controle e de 7 no grupo teste, torna-se importante focar o significado dos achados não significativos e de sua interpretação. Ao usarmos ao longo do texto a expressão “não foram detectadas diferenças” ao invés da expressão “os grupos são semelhantes entre si”, estamos procurando utilizar a evidência fornecida pelos achados. Em outras palavras, não estamos afirmando categoricamente que existe semelhança entre os grupos, mas sim que os indícios do estudo não trazem evidências suficientes da existência de uma diferença entre os grupos⁽⁹⁹⁾. Segundo diversos autores estatísticos, “ausência de evidência não é evidência de ausência”⁽¹⁰⁰⁾.

Homoenxertos criopreservados implantados em ovinos jovens têm comportamento conhecido na literatura^(30;91;93;101). Os achados histológicos mostram perda da celularidade, desorganização da estrutura trilaminar dos folhetos e presença de revestimento endotelial irregular. Estes achados são semelhantes aos encontrados em nossos casos, o que nos leva a supor que

o método L-Hydro, pela sua simplicidade, pudesse competir com vantagem com a criopreservação. Deixamos finalmente a sugestão de que se deverá comparar diretamente os dois métodos de preservação, a criopreservação e o método L-Hydro, para estabelecer possíveis vantagens de um método sobre outro.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A comparação do homoenxerto pulmonar conservado pelo método L-Hydro com o homoenxerto fresco, implantado ortotopicamente em carneiros jovens, seguidos por 320 dias, mostrou:

1. O homoenxerto tratado pelo PEG apresentou desempenho clínico e hemodinâmico semelhante ao homoenxerto a fresco. Ao ecocardiograma revelou-se superior ao homoenxerto a fresco;
2. O homoenxerto tratado pelo PEG apresentou evidências histológicas de repopulação celular intersticial e endotelial;
3. O homoenxerto tratado pelo PEG apresentou macroscopia, estrutura histológica e ultraestrutural semelhante ao homoenxerto a fresco, à exceção de nódulos de maior celularidade intersticial, presentes apenas no homoenxerto a fresco.

Anexos

7. ANEXOS

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

Caso	Registro	DN	Idade/ Meses	Peso Inicial/kg	Peso final/kg	Categoria
1	85AM	1/8/03	6 meses	26	44	Teste
2	84AM	1/9/03	5 meses	22	40	Teste
3	100AM	1/10/03	4 meses	21		Teste
4	88AM	1/9/03	5 meses	22	42	Teste
5	71VD	1/10/03	4 meses	19	32	Teste
6	25VD	1/10/03	4 meses	18	25	Teste
7	99AM	1/9/03	5 meses	22	48	Teste
8	89AM	1/8/03	6 meses	25	37	Controle
9	98AM	1/8/03	6 meses	32	52	Teste
10	100VD	1/9/03	5 meses	21	42	Controle
11	02VM	10/9/03	5 meses	21	38	Controle

DN= data nascimento do carneiro

Peso inicial/kg= peso inicial no momento do implante do homoenxerto

Peso final/kg= peso final por ocasião do sacrifício do carneiro

Anexo B. Variáveis intra-operatórias

Caso	Categoria	Tipo de Homoenxerto	Tamanho	Posição	TCEC	Data
1	Teste	L-Hydro	15	Pulmonar	39	9/2/2004
2	Teste	L-Hydro	13	Pulmonar	41	9/2/2004
3	Teste	L-Hydro	13	Pulmonar	49	10/2/2004
4	Teste	L-Hydro	15	Pulmonar	43	10/2/2004
5	Teste	L-Hydro	11	Pulmonar	38	11/2/2004
6	Teste	L-Hydro	11	Pulmonar	32	11/2/2004
7	Teste	L-Hydro	15	Pulmonar	30	11/2/2004
8	Controle	<i>Homovital</i>		Pulmonar	35	12/2/2004
9	Teste	L-Hydro	15	Pulmonar	38	12/2/2004
10	Controle	<i>Homovital</i>		Pulmonar	34	12/2/2004
11	Controle	<i>Homovital</i>		Pulmonar	31	13/2/2004

Tipo de homoenxerto= tipo do homoenxerto usado em cada animal

Tamanho= diâmetro do homoenxerto usado em cada carneiro

TCEC= tempo de circulação extracorpórea em minutos

Anexo C. Dados dos exames laboratoriais (1ª amostra)

Caso	hemácias	Hb	Ht	Leucócitos	plaquetas	cálcio	fósforo	DHL
1	8000	14,6	50	9400	650000	9	6,8	231
2	11000	15,6	53	6400	500000	9,1	7,1	251
3								
4	8000	15,5	52	6400	550000	8,1	7,1	271
5	12000	12,3	44	12900	650000	9,8	6,9	282
6	9550	14,2	51	5450	450000	8,7	7,3	367
7	13500	9,8	48	4400	700000	10,0	6,2	312
8	12800	12,6	48	5250	350000	9,1	8,9	393
9	20000	14,4	61	5100	75000	8,7	,1	334
10	17200	10,5	53	4000	550000	10,0	5,4	402
11	15600	14,0	54	8200	700000	10,5	6,2	373

Hb= hemoglobina

Ht= hematócrito

DHL= desidrogenase láctica

Dados dos exames laboratoriais (2ª amostra)

Caso	Hemácias	Hb	Ht	leucócitos	plaquetas	cálcio	fósforo	DHL
1	10000	18,6	73	9000	650000	9,7	7,2	272
2	11000	17,6	80	3800	500000	9,6	7,7	278
3								
4	9000	14,4	69	4000	600000	9,6	7,1	283
5	12000	14,5	67	10900	650000	9,3	8,8	366
6	12000	15,9	66	7800	450000	9,3	7,8	272
7	14000	16,3	68	4800	700000	8,0	6,4	362
8	13000	15,4	73	5000	400000	9,2	10,90	341
9	15000	14,4	76	4200	750000	9,5	8,1	329
10	16000	16,0	79	4000	550000	9,6	9,0	351
11	15000	14,1	73	5000	700000	8,9	7,8	324

Hb= hemoglobina

Ht= hematócrito

DHL= desidrogenase láctica

Dados da evolução ponderal, peso inicial e peso final

casos	Categoria	Peso inicial	tempo PO	peso final
1	Teste, L-Hydro	26	320 d	44
2	Teste, L-Hydro	22	320 d	40
3	Teste, L-Hydro	21		
4	Teste, L-Hydro	22	320 d	42
5	Teste, L-Hydro	19	320 d	32
6	Teste, L-Hydro	18	320 d	25
7	Teste, L-Hydro	22	320 d	48
8	Controle, fresco	25	320 d	37
9	Teste, L-Hydro	32	320 d	52
10	Controle, fresco	21	320 d	42
11	Controle, fresco	21	320 d	38

Peso inicial= peso inicial de cada carneiro

Tempo PO= tempo de acompanhamento pós-operatório

Anexo D. Variáveis EcoDopplercardiográficas

Resultados obtidos em 09/2004 (Eco 1)

Caso	Categoria	Tempo de Pós-Operatório	Gradiente Máximo	Gradiente Médio	Área Homoenxerto	Pressão VD
1	Teste, L-Hydro	240 dias	1,4	0,8	19	
2	Teste, L-Hydro	240 dias	0,8	0,5	19	22
3	Teste, L-Hydro					
4	Teste, L-Hydro	240 dias	2,7	1,7	22	15
5	Teste, L-Hydro	240 dias	4,3	3,1	21	15
6	Teste, L-Hydro	240 dias	1,3	0,6	19	11,5
7	Teste, L-Hydro	240 dias	7,0	4,3	22	26
8	Controle, fresco	240 dias	4,4	2,7	19	26
9	Teste, L-Hydro	240 dias	2,4	1,7	25	23
10	Controle, fresco	240 dias	4,3	3,3	20	23
11	Controle, fresco	240 dias	7,6	4,1	19	19,15

Resultados obtidos em 12/2004 (Eco 2)

Caso	Categoria	Tempo de PO	Gradiente Máximo	Gradiente Médio	Área Homoenxerto	Pressão VD
1	Teste, L-Hydro	330 d	2,0	0,9	22	34
2	Teste, L-Hydro	330 d	2,5	1,3	22	34
3	Teste, L-Hydro	330 d				
4	Teste, L-Hydro	330 d	2,2	0,9	26	38
5	Teste, L-Hydro	330 d	2,9	2,1	20	26
6	Teste, L-Hydro	330 d	3,5	1,3	20	30,4
7	Teste, L-Hydro	330 d	3,4	1,7	25	45
8	Controle, fresco	330 d	4,1	2,8	13	N/A
9	Teste, L-Hydro	330 d	2,8	1,4	23	34
10	Controle, fresco	330 d	3,2	1,9	24	41,5
11	Controle, fresco	330 d	7,6	4,2	24	37,7

Tempo de PO= tempo de acompanhamento pós-operatório

Gradiente máximo= gradiente máximo trans-pulmonar

Gradiente Médio= gradiente médio trans-pulmonar

Área homoenxerto= área calculada do homoenxerto pulmonar

Pressão VD= pressão do Ventrículo Direito

Anexo E. Variáveis angiográficas e hemodinâmicas

Caso	Categoria	Tempo implante	PAP	PCP	DC	Arteria Pulmonar Insuficiente
1	Teste, L-Hydro	327 dias	8 mmhg	3 mmhg	3615	Sim
2	Teste, L-Hydro	326 dias	2 mmhg	N/A	5360	Não
3	Teste, L-Hydro					
4	Teste, L-Hydro	329 dias	14 mmhg	N/A	3060	Não
5	Teste, L-Hydro	325 dias	8 mmhg	3 mmhg	4360	Não
6	Teste, L-Hydro	328 dias	9 mmhg	4 mmhg	2980	Não
7	Teste, L-Hydro	326 dias	7 mmhg	4 mmhg	4610	Não
8	Controle, fresco	327 dias	10 mmhg	9 mmhg	3520	Não
9	Teste, L-Hydro	327 dias	8 mmhg	5 mmhg	4160	Não
10	Controle, fresco	326 dias	9 mmhg	4 mmhg	4330	Não
11	Controle, fresco	324 dias	6 mmhg	0 mmhg	5330	Não

PAP= pressão artéria pulmonar
 PCP= pressão capilar pulmonar
 DC= débito cardíaco

Anexo F. Dados dos achados macroscópicos

Caso	ESTENOSE	INSUFICIENCIA.	DEISCENCIA	VEGETAÇÃO	RUPTURA/ABRASÃO	FLEXÍVEIS	COAPTADOS	ESPESSADO	TROMBO SEIO VALSALVA	TROMBO FOLHETOS	CALCIFICAÇÃO FOLHETOS	CALCIFICAÇÃO ANEL
1	Não	Sim	Não	SSN	Não	NNS	Não	SSN	Não	Não	Sim	Não
2	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	1x1	Não	Não	Não
3												
4	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	1x2	Não	Não	Não
5	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	1,5x 4	Não	Não	Não
6	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
7	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	2x4	Não	Não
8	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	1,5x 2	Não	Não	Não
9	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	1x2	Não	Não	1x1com
10	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	5x7	Não	Não	Não
11	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	4x8	Não	Não	Não

Anexo G. Descrição histológica individualizada dos casos

- Caso 1.** Parasitose de cardiomiócitos ventriculares (provável protozoose). Discreta constrição fibrosa ao nível da sutura inferior. Grandes vegetações fibrinosas, parcialmente calcificadas, localizadas nos seios de Valsalva e remanescentes dos folhetos junto ao anel, que exibem infiltrado inflamatório e células intersticiais mesenquimais, identificadas também pela MET. As válvulas acham-se muito escassamente representadas (provavelmente destruídas em meio às vegetações), não sendo identificadas células de revestimento superficial em seus remanescentes, quer pela MO, MET ou MEV.
- Caso 2.** Trombos de fibrina focalmente nos seios de Valsalva, com área focal de meteplasia cartilaginosa e calcificação do anel valvar. Áreas focais de inflamação no anel valvar (relacionada à calcificação?), com permeação focal do folheto, próximo ao anel. Válvulas com células intersticiais mesenquimais, identificadas também pela MET e áreas de revestimento celular superficial identificado pela MO e MEV.
- Caso 4.** Trombo de fibrina em seio de Valsalva, prolongando-se pela face arterial da base da válvula, que acha-se portanto parcialmente aderida. Área focal de discreta inflamação no anel valvar, porém não no folheto. Folhetos com células intersticiais mesenquimais, identificadas também pela MET e áreas de revestimento celular superficial (MO e MEV).
- Caso 5.** Trombo de fibrina em um seio de Valsalva. Células de revestimento representadas na MO, MET e MEV.
- Caso 6.** Escassa representação das válvulas, que apresentam células intersticiais em pequeno número. Células de revestimento representadas na MO, MET e MEV.

- Caso 7.** Trombo visualizado na borda livre de uma válvula, na foto macroscópica (não representado na histologia). Áreas focais de células inflamatórias nas bases das válvulas. Células de revestimento representadas na MO, MET e MEV.
- Caso 8.** Constrição fibrosa sub-aórtica (anel fibroso). Trombo de fibrina em um seio de Valsalva. Nódulo de maior celularidade intersticial focalmente, na região intermédia do folheto. Células de revestimento representadas na MO e MEV.
- Caso 9.** Trombo de fibrina e calcificação focal em seios de Valsalva e folhetos. Intenso processo inflamatório, com deposição de pigmento hemosiderótico na parede aórtica e folhetos. Células de revestimento identificadas na MO, MET e MEV. Algumas apresentam estruturas de junção celular, intensa pinocitose e grânulos citoplasmáticos elétrondensos pela MET (mais típicas para células endoteliais).
- Caso 10.** Trombo de fibrina em seio de Valsalva e folheto. Processo inflamatório moderado na parede do homoenxerto, anel e válvula. Nódulo de maior celularidade intersticial focalmente, na região intermédia do folheto. MET mostrando numerosas células intersticiais alongadas, bem preservadas. Células de revestimento superficial identificadas na MO e MEV.
- Caso 11.** Trombo de fibrina em seio de Valsalva. Nódulos de maior celularidade intersticial focalmente, na região intermédia do folheto. MET mostrando numerosas células intersticiais alongadas, bem preservadas. Células de revestimento superficial identificadas na MO e MEV.

Anexo H. Tabela com os achados histológicos.

Caso	Células Superficiais MO	Celulas Superficiais MEV	Células Intersticiais Mesenquimais	Células Inflamatórias Folheto	Células Superficiais MET
1	Não	Não	Sim(MET)	Sim	
2	Sim	Sim	Sim(MET)	Sim(focal)	
3					
4	Sim	Sim	Sim(MET)	Não	
5	Sim	Sim	Sim(MET)	Não	Sim
6	Sim	Sim	Sim(MET)	Não	Sim
7	Sim	Sim	Sim(MET)	Sim(focal)	Sim
8	Sim	Sim	Sim(MET)	Não	
9	Sim	Sim	Sim(MET)	Sim	Sim
10	Sim	Sim	Sim(MET)	Sim	
11	Sim	Sim	Sim(MET)	Não	

Células Superficiais MO= presença ou ausência de células superficiais na microscopia ótica; Células Superficiais MEV= presença ou ausência de células superficiais na microscopia eletrônica de varredura; Células Intersticiais Mesenquimais= presença de células intersticiais mesenquimatosas na microscopia eletrônica de transmissão; Células Inflamatórias Folheto= presença de células inflamatórias nos folhetos, à microscopia ótica de luz; Celulas Superficiais MET= presença de células superficiais, constatadas na microscopia eletrônica de transmissão.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Schoen FJ, Levy RJ. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res* 1999; 47:439-465.
- (2) Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21:2215-2231.
- (3) Hufnagel CA, Harvey WP. The surgical correction of aortic insufficiency. *Bull Georgetown U Med* 1953; 6:60.
- (4) Starr A. Total mitral valve replacement: fixation and thrombosis. *Surg Forum* 1960; 11:258.
- (5) Lam CR, Aram HH, Munnell ER. An experimental study of aortic valve homografts. *Surg Gynaecol Obstets* 1952; 94:129.
- (6) Murray G. Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment of aortic and mitral insufficiency. *Angiology* 1956; 7:446.
- (7) Barrat-Boyes BG. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax* 1964; 19:131.
- (8) Ross DN. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 1962; 2:487.

- (9) Carpentier A. From valvular xenograft to valvular bioprosthesis:1965-1970. *Ann Thorac Surg* 1989; 48:S73-S74.
- (10) Senning A. Fascia lata replacement of aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1967; 54:465.
- (11) Puig LB, Verginelli G, Belotti G, Kawabe L, Frack CC, Pileggi F, Décourt LV,Zerbini EJ. Homologus dura mater cardiac valve: preliminary study of 30 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1972; 64:154.
- (12) Ionescu MI, Pakrashi BC, Holden MP, Mary DA, Wooler GH. Results of aortic valve replacement with frame-supported fascia lata and pericardial grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1972; 64:340.
- (13) Carpentier A, Lemaigre G, Robert L, Carpentier S. Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 58:467-482.
- (14) Barrat-Boyes BG, Roche AHG, Whitlock RML. Six year review of the results of freehand aortic valve replacement using an antibiotic sterilized homograft valve. *Circulation* 1977; 55:353-361.
- (15) Barratt-Boyes BG, Roche AH, Subramanyan JR, Pemberton JR, Whitlock RM. Long-term follow-up of patients with the antibiotic-sterilized aortic homograft valve inserted freehand in the aortic position. *Circulation* 1987; 75:768-777.
- (16) Strickett MG, Barrat-Boyes BG, Macculloch D. Desinfection of human heart valve allografts with antibiotics in low concentration. *Pathology* 1983; 15:457-462.

- (17) O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH, et al. The viable cryopreserved allograft valve. *J Cardiac Surg* 1987; 2(suppl):153-167.
- (18) Grunkemeier GL, Bodnar E. Comparison of structural valve failure among different "models" of homograft valves. *J Heart Valve Dis* 1994; 3:556-560.
- (19) Grunkemeier GL, Bodnar E. Comparative assessment of bioprosthesis durability in the aortic position. *J Heart Valve Dis* 1995; 4:49-55.
- (20) Bodnar E, Matsuki O, Parker R, Ross DN. Viable and nonviable aortic homografts in the subcoronary position: a comparative study. *Ann Thorac Surg* 1989; 47:799-805.
- (21) Koolbergen DR, Hazekamp MG, de Heer E, Bruggemans EF, Huysmans HA, Dion RA, Bruijn JA. The pathology of fresh and cryopreserved homograft heart valves: An analysis of forty explanted homograft valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124:689-697.
- (22) Lupinetti FM, Tsai TT, Kneebone JM. Endothelial cell replication in an in vivo model of aortic allograft. *Ann Thorac Surg* 1993; 56:237-241.
- (23) Hoekstra F, Witvliet M, Knoop C, Akkersdijk G, Jutte N, Bogers A, Claas F, Weimar W. Donor-specific anti-human leukocyte antigen class I antibodies after implantation of cardiac valve allografts. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16:570-572.

- (24) Shaddy RE, Hunter DD, Osborn KA et al. Prospective analysis of HLA immunogenicity of cryopreserved valved allografts used in pediatric heart surgery. *Circulation* 1996; 94:1063-1067.
- (25) Shaddy RE, Hawkins JA. Immunology and failure of valved allografts in children. *Ann Thorac Surg* 2002; 74:1271-1275.
- (26) Wilhelmi MH, Mertsching H, Wilhelmi M, Leyh R, Haverich A. Role of inflammation in allogenic and xenogenic heart valve degeneration: Immunohistochemical evaluation of inflammatory endothelial cell activation. *J Heart Valve Dis* 2003; 12:520-526.
- (27) Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Structure-function correlations in cryopreserved allograft cardiac valves: viability, durability and immunogenicity. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S108.
- (28) O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH, et al. A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1987; 94:812-823.
- (29) Goffin YA, Narine KR, Alexander JP, Goethem J, Daenem WJ. Histopathologic comparison of a pulmonary autograft and pulmonary homograft in a patient 17 months after a Ross procedure: an autopsy study. *J Heart Valve Dis* 1998; 7:327-330.
- (30) Hilbert SL, Luna RE, Zhang J, Wang Y, Hopkins RA, Yu ZX, Ferrans VJ. Allograft heart valves: The role of apoptosis-mediated cell loss. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117:454-462.
- (31) Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Pathology of explanted cryopreserved allograft heart valves: comparison with aortic valves

- from orthotopic heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115:118-127.
- (32) Elkins RC. Tissue-engineered valves. *Ann Thorac Surg* 2002; 74:1434.
- (33) Fuchs JR, Nassari BA, Vacanti JP. Tissue engineering: A 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg* 2001; 72:577-591.
- (34) Mayer JE, Shin'oka T, Shum-Tim D. Tissue engineering of cardiovascular structures. *Current Opin Cardiol* 1997; 12:528-532.
- (35) Mayer JE. In search of the ideal valve replacement device. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125:S14-S15.
- (36) Leyh RG, Wilhelmi M, Rebe P, Fischer S, Kofidis T, Haverich A, Mertsching H. In vivo repopulation of xenogenic and allogenic acellular valva matrix conduits in the pulmonary circulation. *Ann Thorac Surg* 2003; 75:1457-1463.
- (37) Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, Pethig K, Haverich A, Bader A. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits. *Circulation* 2000; 102:III 50-III 55.
- (38) Bertipaglia B, Ortolani F, Petrelli L, Gerosa G, Spina M, Pauletto P, Casarotto D, Marchini M, Sartore S; Vitalitate Exornatum Succedaneum Aorticum Labore Ingenioso Obtenibitur Project. Cell characterization of porcine aortic valve on decellularized leaflets repopulated with interstitial cells: The Vesalio project. *Ann Thorac Surg* 2003; 75:1274-1282.

- (39) Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Repin O, Batrinac A, Kleczka C, Ciubotaru A, Haverich A. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation* 2002; 106:I-63 - I68.
- (40) Elkins RC, Dawson PE, Goldstein S, Waish SP, Black KS. Decellularized human valve allografts. *Ann Thorac Surg* 2001; 71:S428-S432.
- (41) Cheung DT, Weber PA, Grobe AC, Shomura Y, Choo SJ, Luo HH, Marchion DC, Duran CM. A new method for the preservation of aortic valve homografts. *J Heart Valve Dis* 2001; 10:728-735.
- (42) Banker MC, Layne Jr JR, Hicks GL, Wang T. Freezing preservation of the mammalian heart explant III Tissue dehydration and cryopreservation by polyethyleneglycol. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11:619-623.
- (43) 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; 63:459-464.
- (44) Tokunaga Y, Wicomb WN, Garcia-Kennedy R, Esquivel CO, Collins GM. The immunosuppressive effect of polyethyleneglycol in a flush solution for rat liver transplantation. *Transplantation* 1992; 54:756-758.
- (45) Wicomb WN, Hill DJ, Collins GM. Twenty-four-hour ice storage of rabbit heart. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13:891-894.
- (46) Tecnologia Farmaceutica 5 ed.Porto. Fundação Calauoste Gulbenkian 1995;646-1700.

- (47) Polietilenoglicol E 400. Mauá 1999.
- (48) PEG-150 diesterato, polietilenoglicol. Unicamp 2003.
- (49) Collins GM, Wicomb WN, Levin BS. Heart preservation solution containing polyethylene glycol: an immunosuppressive effect? *Lancet* 1991; 338:890-891.
- (50) Tokunaga Y, Wicomb WN, Kennedy RG, Esquivel CD, Collins GM. The immunosuppressive effect of polyethylene glycol in a flush solution for rat liver transplantation. *Transplantation* 1992; 54:756-758.
- (51) Nina VJS, Pomerantzeff PMA, Casagrande ISJ, Chung D, Brandão CMA, Nascimento SAB, Benvenuti LA, Oliveira SA. Endotelização in vivo das biopróteses cardíacas: preservação convencional versus não-aldeídica. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2004; 19:144-151.
- (52) Furlanetto G, Furlanetto BHS, Cheung DT, Casagrande I. Experiência inicial da utilização do xenoenxerto valvado porcino na via de saída do ventrículo direito em cardiopatias congênitas. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2006; 21:476-477.
- (53) Campos Christo SF, Campos Christo MB, Silva AL, Casagrande ISJ. Ponte aortocoronária utilizando bioprótese vascular heteróloga com preservação não-aldeídica: Estudo em ovinos. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2005; 20:209.
- (54) Bayne K. Revised guide for the care and use of laboratory animals available. *The Physiologist* 1996; 3:205-211.
- (55) New York: ITHACA, editor. Nomina anatomica veterinaria.: 1983.

- (56) Philogenesis Inc. Corograft: nova geração de enxertos. Monrovia 2002.
- (57) Molina JE, Edwards J, Bianco R, Clack R, Rasmussen T, Moss G, Lang G. Growth of fresh-frozen pulmonary allograft conduit in growing lambs. *Circulation* 1989; 80 (suppl I):I-183-I-190.
- (58) Sayk F, Bos I, Shubert U, Wedel T, Sievers H. Histopathologic findings in a novel decellularized pulmonary homograft: an autopsy study. *Ann Thorac Surg* 2005; 79:1755-1758.
- (59) Grabenwöger M, Grimm M, Ebyl E, Kadletz M, Havel M, Kostler P. New aspects of degeneration of bioprosthetic heart valves after long-term implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 104:14-21.
- (60) Hoffman D, Gong G, Liao K, Macaluso MS, Nikolic SD, Frater RWM. Spontaneous host endothelial growth on bioprostheses. *Circulation* 1992; 86(Suppl II):II-75-II-79.
- (61) Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Pathology of explanted cryopreserved allograft heart valves: comparison with aortic valves from orthotopic heart transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115:118-127.
- (62) Rajani B, Mee RB, Ratliff NB. Evidence for rejection of homograft cardiac valves in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115:111-117.
- (63) Aidulis D, Pegg DE, Hunt CJ, Goffin YA, Vanderkelen A, Van Hoeck B, Santiago T, Ramos T, Gruys E, Voorhout W. Processing of ovine cardiac valve allografts: Effects of preservation method on structure and mechanical properties. *Cell and Tissue Banking* 2002; 3:79-89.

- (64) Peruzzo AM, Costa FDA, Abrahão WM. Controle microbiológico em valvas cardíacas humanas. *Arq Bras Cardiol* 2006; 87:778-782.
- (65) Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ulrich R, Salzer-Muhar U. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve Synergraft in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; 23:1002-6.
- (66) Tavakkol Z, Gelehter S, Goldberg CS, Bove EL, Devaney EJ, Ohye RG. Superior durability of Sinergraft pulmonary allografts compared with standard cryopreserved allografts. *Ann Thorac Surg* 2005; 80:1610-4.
- (67) Dohmen PM, da Costa F, Yoshi S, Lopes SV, de Souza FP, Vilani R. Histological evaluation of tissue-engineered heart valves implanted in the juvenile sheep model: is there a need for in -vitro seeding? *J Heart Valve Dis* 2006; 15:823-9.
- (68) Konertz W, Dohmen PM, Liu J, Beholz S, Dushe S, Posner S. Hemodynamics characteristics of the Matrix P decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation. *J Heart Valve Dis* 2005; 14:78-81.
- (69) Costa F, Vieira E, Lopes SV, Colatusso C, Pereira EWL, Matsuda CN, Cauduro S. Operação de Ross com homoenxerto valvares decelularizados: resultados de médio prazo. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2007;22:454-62.
- (70) Presta LN, Alves AC, Morgado R. Polietilenoglicóis. Tecnologia Farmacêutica- Fundação Calaouste Gulbenkian 1995;646-647.
- (71) PEG-150 diesterato, polietilenoglicol. Unicamp 2003.

- (72) Presta LN, Alves AC, Morgado R. Polietilenoglicóis. Tecnologia Farmacêutica- Fundação Calaouste Gulbenkian 1995;1699-1700.
- (73) Polietilenoglicol E 400. BANDEIRANTE QUÍMICA LTDA 1999.
- (74) Piskin E, Piskin K, Cakmalli C, Evren V, Mutlu M, Arca E. Preparation of polyethyleneglycol (PEG) coatings for microencapsulation of charcoal. *Appl Biochem Biotechnol* 1984; 10:183-192.
- (75) Wicomb WN, Perey R, Portnoy V, Collins GM. The role of reduced glutathione in heart preservation using a polyethylene glycol solution, cardisol. *Transplantation* 1992; 54:181-182.
- (76) Wicomb WN, Hill JD, Avery J, Collins GM. Optimal cardioplegia and 24-hour heart storage with simplified UW solution containing polyethylene glycol. *Transplantation* 1990; 49:261-264.
- (77) Rashid ST, Salacinski HJ, Hamilton G, Seifalian AM. The use of animal models in developing the discipline of cardiovascular tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2004;25:1627-1637.
- (78) Gallegos RP, Nockel PJ, Rivard AL, Bianco R.W. The current state of in-vivo pre-clinical animal models for heart valve evaluation. *J Heart Valve Dis* 2005; 14:423-432.
- (79) Burman SO. Heterologous heart valves: past, present, and future. *Ann Thorac Surg* 1989; 48(supplem):75-76.
- (80) Herijgers P, Ozaki S, Verbeken E, Van Lommel A, Ràcz R, Zietkiewicz M, Perek B, Flameng W. Calcification characteristics of porcine stentless valves in juvenile sheep. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; 15:134-142.

- (81) Draft Replacement Heart Valve Guidance. U S Food and Drug Administration, Division of Cardiovascular, Respiratory, and Neurological Devices 1994; October 14.
- (82) Gulbins H, Pritisanac A, Pieper K, Goldemund A, Meiser BM, Reichart B, Daebritz S. Successful endothelialization of porcine glutaraldehyde-fixed aortic valves in a heterotopic sheep model. *Ann Thorac Surg* 2006; 81:1472-1479.
- (83) Neethling WM, Hodge AJ, Glancy R. Kangaroo versus freestyle stentless bioprostheses in a juvenile sheep model: hemodynamic performance and calcification behavior. *J Card Surg* 2005; 20:29-34.
- (84) Grobe AC, Cheung DT, Luo HH, Shomura Y, Marchion DC, Pfau JC, Duran CM. A study of the junction between glutaraldehyde-treated allogeneic aorta and host aorta. *J Heart Valve Dis* 2000; 9:570-575.
- (85) Ozaki S, Herijgers P, Verbeken E, Van Lommel A, Nishida T, Perek B, Zietkiewicz M, Leunens V, Flameng W. The influence of stenting on the behavior of amino-oleic acid-treated, glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves in a sheep model. *J Heart Valve Dis* 2000; 9:552-559.
- (86) Huysmans H.A. Animal trials for heart valve substitutes. *J Heart Valve Dis* 2004; 13(supplement):-4.
- (87) Cardiovascular implants- Cardiac Valve Prostheses. International Standard ISO 5840 1996.
- (88) Ali MI, Kumar P, Bjornstad K, Duran MG. The sheep as an animal model for heart valve research. *Cardiovascular Surgery* 1996; 4:543-549.

- (89) Yacoub M, Rasmi NR, Sundt TM, Lund O, Boyland E, Radley-Smith R, Khaghani A, Mitchell A. Fourteen-year experience with homovital homografts for aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110:186-194.
- (90) Lund O, Chandrasekeran V, Grocott-Mason R, Yacoub M. Primary aortic valve replacement with allografts over 25 years: valve and procedure related determinants of outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117:77-90.
- (91) Jonas RA, Ziemer G, Britton L, Armiger LC. Cryopreserved and fresh antibiotic-sterilized valved aortic homograft conduits in a long-term sheep model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 96:746-755.
- (92) Tamura K, Jones M, Yamada Y, Ferrans VJ. A comparison of failure modes of glutaraldehyde-treated versus antibiotic-preserved mitral valve allografts implanted in sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110:224-238.
- (93) Neves J, Abecassis M, Santiago T, Ramos T, Melo J, Gruys E, Hulskamp-Koch C, Ultee A, Verkaar EL, Lenstra JA, Goffin YA, Vanderkelen A, Van Hoeck B, Hunt CJ, Pegg DE. Processing of ovine cardiac allografts: Implantation following antimicrobial treatment and preservation. *Cell and Tissue Banking* 2002; 3:105-119.
- (94) Hong T, Maish MS, Cohen J, Fitzpatrick P, Bert AA, Harper JS 3rd, Fang D, Hoffman-Kim D, Hopkins RA. Reproducible echocardiography in juvenile sheep and its application in the evaluation of a pulmonary valve homograft implant. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2000; 39:20-25.

- (95) Sayk F, Bos I, Schubert U, Wedel T, Sievers H. Histopathologic findings in a novel decellularized pulmonary homograft: An autopsy study. *Ann Thorac Surg* 2005; 79:1755-1758.
- (96) Kosek JC, Iben AB, Shumway N, Angel W. Morphology of fresh heart valve homografts. *Surgery* 1969; 66:269-274.
- (97) Hazekamp MG, Koolbergen DR, Braun J, Sugihara H, Cornelisse CJ, Goffin YA, Huysmans HA. In situ hybridization: a new technique to determine the origin of fibroblasts in cryopreserved aortic homograft valve explants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110:248-257.
- (98) Simon P, Kasimir M, Rieder E, Weigel G. Tissue engineering of heart valves- Immunologic and inflammatory challenges of the allograft scaffold. *Progress in Pediatric Cardiology* 2006; 21:161-165.
- (99) Sterne JAC, Smith GD. Sifting the evidence- what's wrong with significance tests? *BMJ* 2001; 322:226-231.
- (100) Altman DG, Bland JM. Absence of evidence is not evidence of absence. *BMJ* 1995; 311:485.
- (101) Costa FDA, Dohmen P, Lopes SV, Pohl F, Vilani R, Vieira E, Costa MBA, Konertz SYW. Estudo experimental com heteroenxertos valvares descelularizados- a prótese do futuro. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2004; 19:74-82.