

# Utilização do etanol na prevenção da calcificação em heteroenxerto valvar pulmonar porcino: estudo experimental em ovinos

*Use of ethanol in preventing calcification of porcine pulmonary heterograft: experimental study in sheep*

George Ronald SONCINI DA ROSA<sup>1</sup>, Francisco Diniz Affonso da COSTA<sup>2</sup>, Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro VILANI<sup>3</sup>, Felipe Phol de SOUZA<sup>3</sup>, Lorena REICHERT<sup>4</sup>, Iseu de Santo Elias Affonso da COSTA<sup>5</sup>

RBCCV 44205-833

## Resumo

**Objetivo:** Analisar comparativamente o uso do etanol (E) com o glutaraldeído (GDA), como método de inibição da calcificação dos heteroenxertos valvares pulmonares porcinos (HVPP) implantados na via de saída do ventrículo direito (VD) de ovinos jovens.

**Método:** Foram utilizados dez ovinos jovens, em dois grupos contendo cinco animais cada. A operação consistiu na implantação do HVPP na via de saída do VD com circulação extracorpórea, divididos em dois grupos; o grupo do GDA (controle) e o grupo E (grupo em que os HVPP foram pré-tratados com etanol a 80%). Realizou-se estudo ecocardiográfico para medida do gradiente transvalvar pulmonar, análise macroscópica da parede do HVPP e microscópica quanto à presença de calcificação; e mensuração do cálcio na cúspide valvar após 210 dias.

**Resultados:** Na mensuração do cálcio do HVPP encontrou-

se no grupo GDA ( $7,98 \pm 6,82 \mu\text{g}$  cálcio/mg tecido), no grupo E ( $0,31 \pm 0,33 \mu\text{g}$  cálcio/mg tecido). Em relação ao gradiente transvalvar máximo em 30 dias, não houve diferença significativa entre os grupos, já aos 90, 180 e 210 dias, o grupo GDA apresentou maior gradiente transvalvar do que o grupo do etanol. Na análise macroscópica da parede do HVPP, observou-se calcificação em ambos os grupos, sendo mais intensa no grupo do GDA. Na avaliação microscópica das cúspides do HVPP em relação à presença de calcificação, observou-se que no grupo GDA esteve presente em todos os animais, enquanto no grupo E, esteve ausente em todos.

**Conclusão:** Conclui-se que etanol a 80% inibe a calcificação das cúspides no período analisado, mas não inibe a calcificação da parede do HVPP.

**Descritores:** Etanol. Ovinos. Calcinose. Transplante heterólogo. Glutaral.

1 - Doutorado. Cirurgião Cardiovascular.

2 - Livre docência. Doutorado. Professor Titular do Departamento de Clínica Cirúrgica da PUCPR.

3 - Doutorado. Professor Titular de Medicina Veterinária PUCPR.

4 - Mestrado. Cardiologista e Ecocardiografista.

5 - Livre docência. Chefe do Serviço de Cirurgia Cardiovascular do Hospital Santa Casa de Curitiba – PUCPR.

Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Operatória (PUCPR). Hospital Veterinário da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Departamento de Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Curitiba, PR, Brasil.

Endereço para correspondência:

George Ronald Soncini da Rosa. Av. Silva Jardim 2939, Apto 111 - Curitiba, PR, Brasil - CEP: 80240-020 Fone/fax: (41) 3342-4505. E-mail: soncini@bsi.com.br

Artigo recebido em janeiro de 2006  
Artigo aprovado em agosto de 2006

#### Abstract

**Objective:** The objective of this work was to comparatively evaluate the use of ethanol (E) with glutaraldehyde (GDA) to inhibit the calcification of the porcine pulmonary valvar heterografts (PPVH) implanted in the right ventricle outflow tract of young sheep.

**Method:** Ten young sheep were used, divided into two similar groups: the GDA (control) Group and the Ethanol Group (in which the PPVH were pre-treated with ethanol-80). The surgery consisted of implanting the PPVH in the right ventricle outflow tract using a cardiopulmonary bypass. Echocardiography was performed to measure the transvalvar gradient and macroscopic analyses of the PPVH wall and microscopic analysis for calcification were performed. The amount of calcium was measured in the valve cusp at 210 days.

**Results:** The quantity of calcium in the PPVH of the GDA Group was  $7.98 \pm 6.82 \mu\text{g}$  calcium/mg tissue and of the E Group

it was  $0.31 \pm 0.33 \mu\text{g}$  calcium/mg tissue. In respect to the maximum transvalvar gradient at 30 days, there was no significant difference between the groups. At 90, 180 and 210 days however, the GDA Group showed a greater transvalvar gradient than the E Group. The macroscopic analyses of the heterograft wall evidenced calcification in both groups but it was more pronounced in the GDA Group. The microscopic analysis of the cusp valve revealed the presence of calcification in all animals of the GDA Group, while in the E Group no calcification was seen.

**Conclusion:** In conclusion ethanol-80 inhibits calcification on the cusps during the period of the analysis but does not inhibit the calcification of the PPVH.

**Descriptors:** Ethanol. Sheep. Calcinosis. Transplantation heterologous. Glutaral.

## INTRODUÇÃO

Calcificação é a mais freqüente causa de falência funcional das biopróteses valvares cardíacas porcinas e de pericárdio bovino fixadas com glutaraldeído [1,2]. Esta calcificação consiste no depósito de fosfato de cálcio associado a minerais no tecido das biopróteses [2].

A durabilidade destes tecidos é limitada pela deterioração estrutural, a qual, em parte é atribuída à calcificação distrófica da matriz do colágeno [3].

Pesquisadores vêm tentando desenvolver um substituto valvar cardíaco ideal há muitos anos. De modo geral, os substitutos valvares cardíacos são divididos em dois tipos: as próteses mecânicas e as biológicas. As próteses de tecidos biológicos são manufaturadas com pericárdio bovino ou com cúspides porcinas, podendo, ou não, incluir segmento de parede aórtica [4].

Não obstante aos avanços das técnicas de reconstrução valvar, muitos dos pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos recebem próteses. A vantagem da maior durabilidade das válvulas mecânicas é contrabalançada pela necessidade do uso de anticoagulantes, para evitar a ocorrência de tromboembolismo. Ao contrário, os portadores de próteses biológicas dispensam anticoagulação indefinida, mas estas são propensas à calcificação e à degeneração, sendo necessárias reoperações para substituí-las [5,6].

Tecidos biológicos têm sido usados como substituto valvar desde 1962, quando uma valva aórtica humana fresca foi transplantada [7]. Posteriormente, foram introduzidas próteses manufaturadas como as de pericárdio bovino [8,9], Fascia lata autógena [10] e dura-máter humana [11].

O uso do glutaraldeído (GDA) para a fixação de próteses porcinas foi recebido como um considerável progresso nos

processos de conservação dos tecidos biológicos [12]. Além da redução da antigenicidade do tecido heterólogo, a fixação obtida pela ligação co-valente foi considerada como vantajosa [12]. Nos anos seguintes, a fixação pelo glutaraldeído foi amplamente empregada na manufatura de próteses porcinas e de pericárdio bovino [13,14].

Hoje, as próteses valvares são utilizadas em aproximadamente 40% dos procedimentos cirúrgicos de substituição valvar em todo mundo [4]. Há diferenças entre os países desenvolvidos e os subdesenvolvidos, nos quais utilizam-se mais tecido biológico [4,7,15].

A incidência de falência valvar das biopróteses é ao redor de 10 a 20% em 10 anos, em pacientes adultos e 40 a 50%, em 4 anos, em crianças [16].

O estresse mecânico e o depósito lipídico nas células das cúspides aórticas porcinas decorrentes da fixação com GDA têm sido indicados como os principais fatores que influenciam a calcificação [17,18].

A suposição de que a calcificação possa estar relacionada ao uso do glutaraldeído despertou interesse no estudo de modificações no processo, como a adição de substâncias inibidoras da mineralização ou mesmo sua substituição por outros agentes fixadores.

Dentre os tratamentos investigados; está o emprego do etanol que se mostrou eficaz quando utilizado como anticalcificante nas biopróteses de valva aórtica porcina. Este resultado pôde ser observado em segmentos de tecido implantados em subcutâneo de ratos e em próteses mitrales em ovelhas [2,14,19].

Vários estudos têm demonstrado a eficácia do etanol como inibidor da calcificação de biopróteses porcinas, sendo seu principal efeito a extração lipídica [4,14,19,20].

Tendo em vista a necessidade de um tratamento

anticalcificante eficaz para as biopróteses valvares cardíacas, propusemos um estudo comparativo entre o etanol e o glutaraldeído na prevenção da calcificação do heteroenxerto valvar pulmonar porcino, implantando na via de saída do ventrículo direito de ovinos jovens com a utilização de circulação extracorpórea, com a perspectiva de minimizar ou inibir a calcificação e aumentar a durabilidade das biopróteses em pacientes jovens e crianças.

#### OBJETIVO

Este estudo tem por objetivo analisar comparativamente o uso do etanol com o glutaraldeído, como método de inibição da calcificação dos heteroenxertos valvares pulmonares porcinos implantados na via de saída do ventrículo direito de ovinos jovens, após um período de observação de 210 dias.

#### MÉTODO

Este trabalho foi realizado no Hospital Veterinário da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), no Laboratório da Cardioprótese Ltda, Laboratório de Histologia da Disciplina de Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e Lactec (Laboratório do Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento).

Foi adotada a Nomina Anatômica Veterinária [21]. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa da UFPR e PUCPR, em consoante à Declaração de Helsinki e as normas estabelecidas no "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1996) e os princípios éticos de experimentação animal, conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA 2000).

#### Modelo experimental

Foram utilizados 10 carneiros (*Ovis aries*), sem raça definida, com idade variando de 3 a 5 meses, clinicamente saudáveis, com o peso entre 23 a 32kg, provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Esses animais foram recebidos 30 dias antes do experimento para controle parasitológico e comprovação de perfeito estado sanitário. A operação consistiu na implantação da valva e tronco pulmonar porcino (heteroenxerto), na via de saída de ventrículo direito de corações de ovinos, com a utilização de circulação de extracorpórea (CEC), divididos em dois grupos:

• **Grupo GDA** (n= 5) - (grupo controle) Heteroenxertos valvares pulmonares porcinos tratados em glutaraldeído, mantidas estocadas em GDA 0,5%.

• **Grupo Etanol** (n= 5) - Heteroenxertos valvares pulmonares porcinos pré-tratados com glutaraldeído e após tratamento em solução de etanol a 80%, estocados em PBS.

#### Obtenção dos heteroenxertos valvares pulmonares porcinos

Os heteroenxertos valvares pulmonares porcinos foram obtidos no Laboratório de Valvas Cardíacas (Cardioprótese®) (Figura 1), onde foram preparados conforme solicitado pelo pesquisador. Após retirada do coração porcino, foi removida a valva pulmonar juntamente com o tronco pulmonar. Com o isolamento do conduto da valva pulmonar, seguiu-se o preparo químico abaixo descrito.

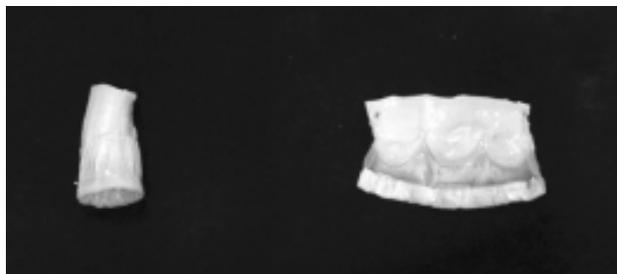


Fig. 1 - Heteroenxerto valvar pulmonar porcino após tratamento

#### Procedimento químico

Os dez heteroenxertos valvares pulmonar porcino foram fixados em solução de glutaraldeído 0,6% (Urcacid®) com 50mmol/l HEPES (solução tampão), pH 7,4, durante duas horas. Após as duas horas, foram fixados em solução de glutaraldeído 0,2% (GDA 0,2%) (Urcacid®) com solução HEPES durante três dias. Após, foram fixados com glutaraldeído a 0,5% com solução HEPES por mais sete dias.

Após sete dias, a solução de GDA 0,5% foi trocada e os heteroenxertos do grupo controle (GDA) foram estocados em solução de glutaraldeído a 0,5%.

Terminado o preparo com o glutaraldeído, os heteroenxertos do grupo de etanol foram submetidos a lavagem em solução salina isotônica 0,9% de 1000ml e colocados em solução de etanol 80% (Labsynth®) com tampão HEPES à temperatura de 25°C, sob agitação contínua por 24 horas. Depois de 24 horas, foram estocados em solução de PBS (Solução de Paraben).

Todos os heteroenxertos valvares pulmonares porcinos foram lavados em solução isotônica salina 0,9% de 1000 ml antes de serem implantados.

O processo químico esquemático pode ser observado na Figura 2.

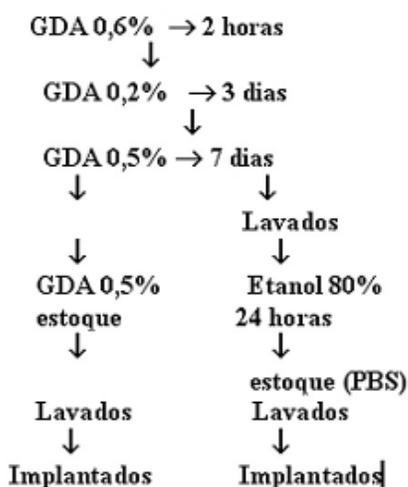


Fig. 2 - Processo químico esquemático

#### Preparo pré-operatório

Os carneiros foram mantidos no Biotério da PUCPR, onde receberam ração balanceada para espécie agrária - ovinos, durante todo o período de confinamento.

Quando do implante cirúrgico, os animais foram submetidos a jejum alimentar de 30 horas e jejum hídrico de 12 horas, antes da realização da anestesia.

Na véspera da operação, os animais foram medicados com os antibióticos Ceftiofur sódico e gentamicina, tricotomizados na região torácica esquerda com depiladores elétricos e monitorizados com eletrocardiógrafo, oximetria de pulso e pressão arterial invasiva.

#### Anestesia

Os animais foram colocados em decúbito lateral direito na mesa operatória. A medicação pré-anestésica foi composta da associação de 0,5 mg/kg de diazepam e 0,4 mg/kg de tartarato de butorfanol administrados por via endovenosa, 15 minutos antes da indução anestésica. Na seqüência, foi realizada a infusão dos antibióticos, ceftiofur sódico e gentamicina. Nesse período, foi realizado bloqueio anestésico intercostal no terceiro, quarto e quinto espaços intercostais esquerdos com cloridrato de bupivacaína 0,5%, além da canulação das duas veias cefálicas, sendo uma exclusivamente para a infusão de propofol (Diprivan®). Em paralelo, foram realizadas a punção e a canulação da artéria radial direita para obter-se a medida da pressão arterial.

Iniciou-se a administração de 4mg/kg propofol (Diprivan®) durante 60 segundos, permitindo desta maneira a intubação traqueal e imediata infusão contínua do fármaco numa velocidade de 0,6 mg/kg/min, até 20 minutos após a saída de CEC.

Foi iniciada ventilação mecânica com volume corrente fixo de 15ml/kg, e freqüência de 16 ciclos por minuto.

#### Monitorização anestésica

As pressões arteriais sistólica (PAS), média (PAM) e diastólica (PAD) foram aferidas pela canulação da artéria radial direita com cateter 22G, conectado ao transdutor de pressão DTX Plus 4812 (Bencton, Dickinson Medical) e, por meio dele, ao monitor Datascope 3000. As amostras de sangue para gasometria arterial foram colhidas 5 e 40 minutos após a administração do propofol (Diprivan®), 5 e 20 minutos após a entrada em CEC e 40 minutos após a saída de CEC. O sangue foi processado imediatamente após a coleta pelo aparelho DRAKE AGS.

#### Protocolo cirúrgico

Com os animais em decúbito lateral direito, realizou-se a antisepsia com álcool iodado em todo hemitórax esquerdo, seguindo-se a colocação dos campos cirúrgicos da maneira convencional. O acesso torácico foi feito no quarto espaço intercostal esquerdo, com colocação de afastador de Finochietto. Foi realizada a abertura do pericárdio e exposição do átrio direito, aorta torácica e ventrículo direito.

Para a colocação dos animais em CEC, realizaram-se duas suturas em bolsa com polipropileno 4.0 (Prolene 4.0®, Ethicon) na aorta ascendente e uma sutura em bolsa com no átrio directo, usando-se o mesmo fio cirúrgico.

A anticoagulação foi feita na dose 200 U/kg de heparina.

Ao término das canulações, iniciou-se a CEC em normotermia, que teve a duração de 20 a 25 minutos. A CEC foi realizada com um sistema de rolete e oxigenador de membrana pediátrico (Braile Biomédica®). O sistema de tubos e o reservatório de cardiectomia foram preenchidos com 900ml de solução salina isotônica 0,9% e perfundidos com oxigênio a 100%.

Foram removidos a valva e o tronco pulmonar. Implantou-se o heteroenxerto valvar pulmonar porcino (valva pulmonar porcina com suporte de pericárdio bovino), utilizando o fio de polipropileno 4.0, tanto para anastomose proximal quanto para a distal. Não foi infundida protamina para reversão dos efeitos da heparina após o término da CEC.

Na seqüência, foi realizada revisão de hemostasia e colocado dreno torácico de aspiração contínua, que após o término do efeito anestésico foi removido. As costelas foram aproximadas com pontos de fio de polipropileno 2 (Prolene 2®, Ethicon), o subcutâneo com poliglactina 910 (Vicryl 1®, Ethicon) e pele com mononylon 3.0 (Mononylon 3.0®, Ethicon).

#### Observação pós-operatória

Todos os animais, após o término do procedimento cirúrgico, ficaram sob observação, monitorizados com

pressão arterial invasiva e oximetria de pulso, na unidade de terapia intensiva (unidade era anexa ao centro cirúrgico), por um período médio de duas horas. Os animais foram extubados e medicados para analgesia com flunixin por três dias. Os animais ficaram nesta unidade até recuperar a deambulação, sendo então encaminhados a um piquete com água e ração. Os antibióticos foram mantidos por sete dias.

Completadas 12 horas de observação, os animais retornavam à Unidade de Animais de Fazenda, colocados em boxes devidamente preparados, onde recebiam uma associação de 4 mg/kg de gentamicina e 1 mg/kg de ceftiofur por sete dias, além de 2 mg/kg de flunixin meglumine por mais três dias. No período de observação pós-operatória, os animais foram submetidos novamente a exames de coproparasitológico, aferição de hematócrito e pesagens semanais. Ficaram sob observação durante 210 dias.

No período de observação, foram realizados ecocardiogramas com 30, 90, 180 e 210 dias de pós-operatório, no Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Operatória da PUCPR.

O sacrifício dos carneiros foi realizado com 2mg/kg de cloridrato de xilazina e 5 mg/kg de cloridrato de cetamina. Após ficarem inconscientes, infundiram-se 20 ml de cloreto de potássio a 19,1%.

Quando da retirada da peça, foi realizada incisão transversal no hemitórax e removida a 4ª costela. O coração foi removido para análise macroscópica, microscópica e mensuração do cálcio da cúspide da valva pulmonar porcina.

#### **Avaliação ecocardiográfica**

Todos os animais foram submetidos a ecocardiograma nos períodos de 30, 90, 180 e 210 dias de pós-operatório para mensuração do gradiente transvalvar pulmonar, avaliação de ruptura e calcificação das cúspides. Os carneiros eram transportados da Fazenda Experimental para o Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Operatória da PUCPR, onde os exames foram realizados no aparelho Ecocardi Doppler HP Sonus 5500 com transdutor de 7,5 Hertz.

#### **Análise morfológica**

##### **Análise macroscópica**

A análise macroscópica teve com objetivo avaliar a calcificação da parede do heteroenxerto e das cúspides valvar quando da retirada da peça.

##### **Análise microscópica**

As peças cirúrgicas, as cúspides, foram fixadas em solução de formol a 10% e encaminhadas para análise microscópica.

Os exames histológicos foram realizados por um mesmo observador, sem conhecimento do grupo ao qual pertencia o espécime.

A preparação do material histológico seguiu os métodos de histotécnica adotados pelo Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da PUCPR. Após fixação em solução de formalina tamponada a 10%, o material da amostra foi desidratado pelo álcool etílico, em concentrações progressivas de 70% a 100%, diafanizado por impregnação com xilol e imerso em parafina a 60%, para constituição dos blocos.

Realizaram-se cortes de 2 a 4µm de espessura, corados com hematoxilina-eosina (H&E) e corante de von Kossa (método específico para visualização de calcificação). Utilizou-se microscópio tetraocular (*American Optical*) para a análise.

Para a análise dos achados histopatológicos, adotou-se a seguinte classificação:

Cúspide pulmonar

1) Presença de Calcificação

##### **I\* Localização**

- I 1a – focal;
- I 1b – multifocal;
- I 1c – difusa;
- I 1d – ausente.

##### **II\* Intensidade**

- II 1a – discreta;
- II 1b – moderada;
- II 1c - acentuada.

2) Presença de Infiltrado Inflamatório

##### **I\* Localização**

- I 2a – focal;
- I 2b – difuso;
- I 2c - ausente.

##### **II\* Tipo**

- II 2a – agudo;
- II 2b -crônico discreto;
- II 2c - crônico moderado.

#### **Mensuração do cálcio**

As amostras de cúspide pulmonar foram submetidas a solubilização com ácido clorídrico e enviadas ao Laboratório do Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento (Lactec®), da Universidade Federal do Paraná, onde a determinação quantitativa do cálcio foi realizada por espectroscopia de absorção atômica, com espectrômetro Perkin Elmer, 4100.

A quantidade total de cálcio foi expressa em mg por amostra e extrapolada para µg/mg de tecido seco pré-implante. Deste modo, foi possível estimar a quantidade de cálcio incorporado por miligrama de tecido seco implantado e não do tecido seco explantado, cujo peso reflete não só a quantidade de cálcio incorporada, mas também a infiltração das células do hospedeiro.

### Metodologia estatística

Recorreu-se à análise descritiva dos dados por meio de tabelas, quadros e gráficos. Para a comprovação dos objetivos levantados neste trabalho, foram utilizados a Análise de Variância para dados repetidos (*Repeated Measures ANOVA*) e os testes paramétrico “t de Student pareado” e os não-paramétricos “Mann-Whitney”, Wilcoxon (dados pareados) e “Friedman - dados pareados” (por meio do *software “Primer of Biostatistics”*). O nível de significância (probabilidade de significância) adotado foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

### RESULTADOS

Houve dois óbitos após o procedimento cirúrgico, o primeiro decorrente de complicações de um pneumotórax, nas primeiras seis horas e o segundo, com 15 dias de pós-operatório, por complicações intestinais. Como ocorreram estes dois óbitos, foram operados outros dois animais para manter os grupos com cinco ovinos cada.

### Análise macroscópica

Em relação à análise macroscópica do heteroenxerto, pode-se observar que houve uma maior calcificação da parede do grupo GDA, quando comparada com o grupo do Etanol, mas em ambos a calcificação ocorreu, sendo mais focal no grupo Etanol e mais intensa e difusa no grupo GDA. Quando da análise macroscópica da cúspide do heteroenxerto, observou-se que no grupo do Etanol não houve calcificação, já o grupo GDA apresentou calcificação importante (Figuras 3 e 4).

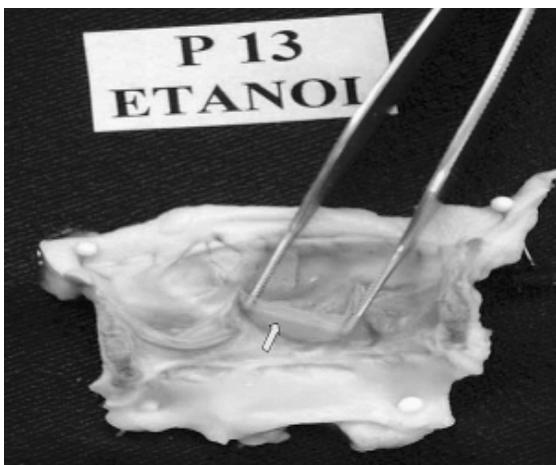


Fig. 3 - Heteroenxerto valvar pulmonar porcino, tratado com etanol, após retirada, onde se observam suas cúspides sem calcificação e delgadas

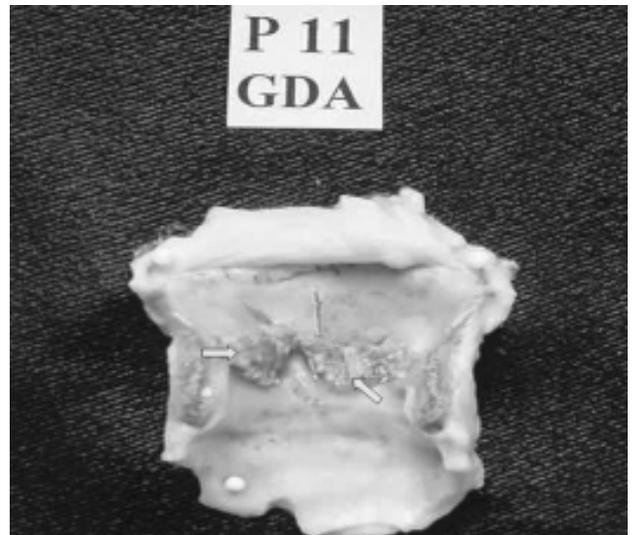


Fig. 4 - Heteroenxerto valvar pulmonar porcino em GDA, após retirada, onde se observa calcificação importante em suas cúspides

### Análise microscópica

#### Calcificação

#### Cúspide valvar pulmonar

Em relação à presença de calcificação, verifica-se que no grupo GDA ela esteve presente em todos os animais, com localização focal, enquanto no grupo do Etanol, ela esteve ausente em todos os animais (Tabela 1, Figuras 5 e 6).

Tabela 1. Presença de calcificação em relação à localização e à intensidade, nos grupos de estudo.

| CALCIFICAÇÃO       | GDA<br>(n = 05) |       | ETANOL<br>(n = 05) |       |
|--------------------|-----------------|-------|--------------------|-------|
|                    | Nº              | %     | Nº                 | %     |
| <b>LOCALIZAÇÃO</b> |                 |       |                    |       |
| • Ausente          | -               | -     | 05                 | 100,0 |
| • Presente         | 05              | 100,0 | -                  | -     |
| • Focal            | 04              | 80,0  | -                  | -     |
| • Difusa           | 01              | 20,0  | -                  | -     |
| <b>INTENSIDADE</b> |                 |       |                    |       |
| • Ausente          | -               | -     | 05                 | 100,0 |
| • Presente         | 05              | 100,0 | -                  | -     |
| • Discreta         | 03              | 60,0  | -                  | -     |
| • Acentuada        | 02              | 40,0  | -                  | -     |

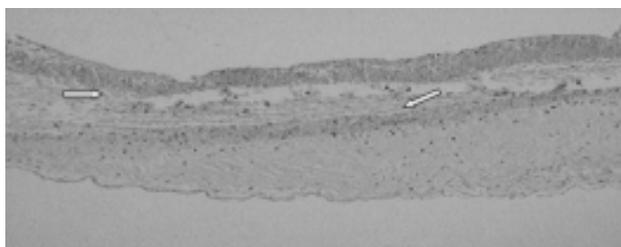


Fig. 5 - Fotomicrografia mostrando corte transversal da cúspide do heteroenxerto valvar pulmonar porcino, tratado com etanol, sem sinais de calcificação após 210 dias de implante (von Kossa 40X)

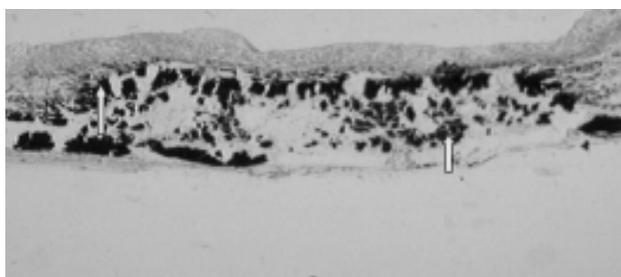


Fig. 6 - Fotomicrografia mostrando corte transversal da cúspide do heteroenxerto valvar pulmonar porcino tratado com glutaraldeído, com sinais de importante calcificação após 210 dias de implante (von Kossa 40X)

### Presença de Infiltrado Inflamatório

Em relação à presença de infiltrado inflamatório, verifica-se que ele esteve presente em todos os animais dos dois grupos avaliados, principalmente com localização difusa e do tipo crônico discreto.

### Mensuração do cálcio

Na comparação entre os grupos, foi observado que:

#### Mensuração do Cálcio (210 dias)

• O grupo GDA apresentou maior mensuração do cálcio do que o grupo do Etanol ( $p=0,036$ ) - Figura 7;

### Avaliação ecocardiográfica

Gradiente transvalvar

- **30 dias:** não houve diferença significativa ( $p=0,082$ );
- **90 dias:** O grupo GDA apresentou maior gradiente transvalvar máximo do que o grupo do Etanol ( $p=0,030$ );
- **180 dias:** O grupo GDA apresentou maior gradiente transvalvar máximo do que o grupo do Etanol ( $p=0,036$ );
- **210 dias:** O grupo GDA apresentou maior gradiente transvalvar máximo do que o grupo do Etanol ( $p=0,033$ ).

A representação gráfica pode ser observada em um único gráfico, como demonstrado na Figura 8.

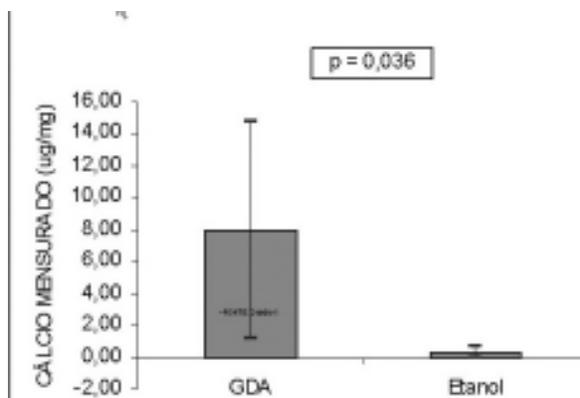


Fig. 7 - Mensuração do cálcio na cúspide do heteroenxerto valvar pulmonar porcino, nos grupos de estudo - 210 dias (Média com desvio padrão)

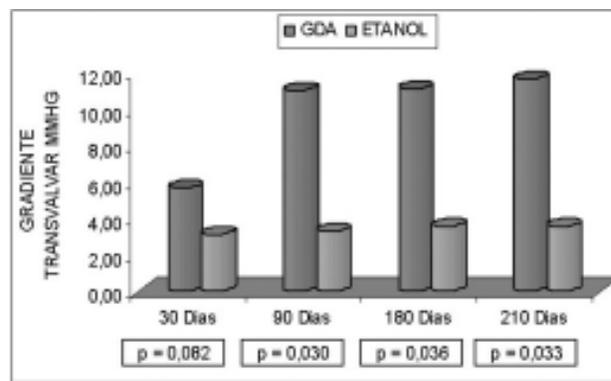


Fig. 8 - Gradiente transvalvar nos grupos de estudo

### DISCUSSÃO

Desde os primeiros implantes de valvas porcinas tratadas por glutaraldeído, várias técnicas têm sido usadas para minimizar a calcificação [22].

O risco de falência estrutural das biopróteses porcinas é diretamente dependente da idade do receptor. Em pacientes com idade inferior a 35 anos, há falência quase uniforme cinco anos após implantação. Já, em pacientes acima de 65 anos, apenas cerca de 10% sofrem disfunção nos 10 anos seguintes ao implante [23,24].

Com a intenção de tornar mínima a calcificação, Schoen et al. [25] utilizaram cátions mono, di, ou trivalentes durante a fixação em glutaraldeído, mas suas ações não se mostraram satisfatórias. Hidroxi e amino-difosfonatos e cátions metálicos foram também testados, mas os altos teores necessários interferiram no crescimento ósseo [22,25].

O pré-tratamento com detergente (SDS Tween 80) pode

inibir a calcificação pela remoção dos fosfolípidos do substrato. Entretanto, os detergentes afetam a superfície da membrana e as fibras colágenas, resultando, por vezes, em marcada diminuição da durabilidade das biopróteses [14].

Recentemente, o ácido amino oléico usado como detergente demonstrou prevenir a calcificação das biopróteses porcinas [26]. Os resultados mostraram que o ácido amino oléico reduz significativamente a calcificação dos folhetos das biopróteses implantadas na posição aórtica em ovelhas. Entretanto, os resultados quanto à estabilidade em vivo e a possibilidade de degradação do ácido amino oléico remanescente no tecido necessitam ser resolvidos [14,26].

Outra alternativa estudada são bisfosfonatos, que agem bloqueando o crescimento dos cristais de hidroxiapatita no tecido bioprotético. Seu uso sistêmico mostra efeitos adversos no metabolismo do cálcio nos ossos que levam a seu enfraquecimento [27].

Demonstrou-se que, quando os bisfosfonatos são colocados junto a folhetos de valvas porcinas implantadas no subcutâneo de ratos, sua liberação lenta e local inibe a calcificação, sem efeitos adversos observados com o uso sistêmico [27].

Os etanohidroxibisfosfonatos e o  $\text{FeCl}_3$  mostraram efeito sinérgico na inibição da calcificação de segmentos de parede aórtica de ratos implantados em animais da mesma espécie.

Entretanto, o emprego de liberação sistêmica controlada destes mesmos agentes foi menos efetivo na prevenção do depósito de cálcio em próteses aórticas porcinas [14].

O alumínio é associado à osteomalácia em pacientes mantidos em diálise renal. Por isso, realizaram-se estudos com sais metálicos contendo  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , visando prevenir a calcificação.

As cúspides aórticas porcinas foram incubadas nestes íons metálicos trivalentes, observando-se marcada ação anticalcificante em implantes, mesmo com baixas concentrações [28]. Estudos morfológicos com os tecidos das biopróteses pré-tratadas com alumínio e cloridrato de ferro revelaram que o  $\text{Al}^{3+}$  e o  $\text{Fe}^{3+}$  são os responsáveis pela desvitalização celular [28].

Mesmo havendo diferenças entre o perfil das lipoproteínas humanas e as dos ratos e ovelhas, o que demonstra diversidade no metabolismo de cálcio, existem doenças valvares e cardiovasculares nestas espécies. Entretanto, os estudos de microscopia e patologia ultra-estrutural indicam que o material clínico e modelo animal são comparáveis [29].

Vyavahare et al. [14] estudaram os efeitos de várias concentrações do etanol e mostraram que a 80% ele inibe a calcificação de cúspides aórticas implantadas no subcutâneo de ratos ou no sistema circulatório de ovelhas, como substituto mitral. Acreditam que a extração de colesterol e fosfolípidos seja o principal mecanismo de sua ação anticalcificante, embora haja outros fatores que podem

influenciar a mineralização do tecido bioprotético.

Em nosso meio, Yoshioka et al. [30] demonstraram que a reação de reticulação de matrizes colagênicas por meio de diacetais do glutaraldeído leva a uma estabilidade biológica dos tecidos maior e toxicidade pós-implante menor.

No presente estudo, visou-se verificar se o etanol - que havia sido tão eficiente como anticalcificante em cúspide porcina e implantes em subcutâneo de ratos - apresentava a mesma ação no sistema circulatório de ovinos jovens. Com este fim, foram comparados os achados deste estudo utilizando etanol a 80% com os obtidos com outras concentrações deste por Vyavahare et al. [14], em cúspides aórticas porcinas.

Os dados deste trabalho, com a mensuração do teor de cálcio nas cúspides pulmonares porcinas tratadas com etanol a 80% e implantadas na via de saída do ventrículo direito de carneiros jovens e observados durante 210 dias de implante, demonstraram significativa inibição da calcificação. Os valores encontrados aproximam-se dos referidos por Vyavahare et al. [14,19].

Ao observarmos macroscopicamente a calcificação da parede do heteroenxerto pulmonar, pudemos notar que houve uma menor calcificação nos heteroenxertos valvares pulmonar porcino tratados com etanol.

Quanto à análise ecocardiográfica, não pudemos comparar com outros trabalhos por não termos encontrado estudo semelhante.

Com estes achados, vislumbramos a possibilidade futura, após maior período de observação e análise, de utilizar estes heteroenxertos em humanos, principalmente em pacientes jovens, com a finalidade de diminuirmos o número de reoperações pela falência valvar causada pela calcificação destes heteroenxertos.

O etanol, sendo de custo baixo e acesso fácil, abriria possibilidade de ser amplamente utilizado na manufatura de próteses biológicas, principalmente nos países subdesenvolvidos, onde ocorrem o maior índice de pacientes jovens com doenças valvares com necessidade de substituição.

Outra grande vantagem, agora em nível hemodinâmico, seria a utilização destes heteroenxertos pulmonares porcinos *stentless*, pois, além de apresentarem gradientes transvalvares próximos ao fisiológico, teriam uma durabilidade maior por sofrerem menos estresse pelos anéis e suportes das biopróteses "*stented*".

Mas, mesmo com todas as vantagens que este tratamento pode trazer, necessitamos de estudos com longos períodos de observação com amostras maiores para estabelecermos este tratamento definitivamente em nosso meio.

## CONCLUSÃO

Da análise do método de prevenção da calcificação (etanol a 80%) em cúspide do heteroenxerto valvar pulmonar

porcino implantado na via de saída de ventrículo direito de carneiros jovens após 210 dias de implante, concluiu-se que:

- Etanol a 80% inibe a calcificação das cúspides no período analisado, mas não inibe a calcificação da parede do heteroenxerto valvar pulmonar porcino, quando comparado com o glutaraldeído.

#### REFERÊNCIAS

1. Schoen FJ, Levy RJ, Piehler HR. Pathological considerations in replacement cardiac valves. *Cardiovasc Pathol.* 1992;1:29-52.
2. Lee CH, Vyavahare N, Zand R, Kruth H, Schoen FJ, Bianco R et al. Inhibition of aortic wall calcification in bioprosthetic heart valves by ethanol pretreatment: biochemical and biophysical mechanisms. *J Biomed Mater Res.* 1998;42(1):30-7.
3. Pathak CP, Adams AK, Simpson T, Phillips RE Jr, Moore MA. Treatment of bioprosthetic heart valve tissue with long chain alcohol solution to lower calcification potential. *J Biomed Mater Res.* 2004;69(1):140-4.
4. Schoen FJ, Levy RJ. Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res.* 1999;47(4):439-65.
5. Cosgrove DM. Valve reconstruction versus valve replacement: current heart valve prostheses. In: Crawford FA, editor. *Cardiac surgery.* 1987.
6. Gott JP, Pan-Chic, Dorsey LM, Jay JL, Jett GK, Schoen FJ et al. Calcification of porcine valves: a successful new method of antiminerallization. *Ann Thorac Surg.* 1992;53(2):207-16.
7. Ross DN. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet.* 1962;2:487.
8. Ionescu MI, Wooler GH, Smith DR, Grinshaw VA. Mitral valve replacement with aortic heterografts in humans. *Thorax.* 1967;22(4):305-13.
9. Braile DM et al. Experiência inicial com emprego das próteses de LILLEHEI-KASTER. *Arq Bras Cardiol.* 1974;27(supl.1):14.
10. Moraes CR, Arruda MB, Cavalcanti IL, Victor EG, Lira V. Substituição das válvulas do coração por fascia lata autógena. Técnica e resultados preliminares. *Arq Bras Cardiol.* 1970;23(6):401-6.
11. Puig LB, Verginelli G. Válvulas cardíacas de dura-máter homóloga. Nota prévia. *Rev Paul Med.* 1971;78(1):33-5.
12. Carpentier A, Blondeau P, Laurens P, Mancel P, Laurent D, Dubost C. Remplacement des valvules mitrales et des cúspides par le tétrogreffes. *Ann Chir Thorac Cardiovasc.* 1968;7(1):33-8.
13. Potkin BN, McIntosh CL, Cannon RO 3rd, Roberts WC. Bioprostheses in tricuspid and mitral valve positions for 100 months with heavier calcific deposits on the left-sided valve followed by new bioprostheses in both positions for 95 months with heavier calcific deposits on the right-sided valve. *Am J Cardiol.* 1988;61(11):947-9.
14. Vyavahare N, Hirsch D, Lerner E, Baskin JZ, Schoen FJ, Bianco R et al. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation: efficacy and mechanisms. *Circulation.* 1997;95(2):479-88.
15. Barratt-Boyes BG. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax.* 1964;19:131-50.
16. Carpentier A, Nashef A, Carpentier S, Ahmed A, Goussef N. Techniques for prevention of calcification of valvular bioprostheses. *Circulation.* 1984;70(3 pt 2):1165-8.
17. Aupart MR, Sirinelli AL, Diemont FF, Meurisse YA, Dreyfus XB, Marchand MA. The last generation of pericardial valves in the aortic position: ten years follow up in 589 patients. *Ann Thorac Surg.* 1996;61(2):615-20.
18. Grunkemeier GL, Bodnar E. Comparative assessment of bioprosthesis durability in the aortic position. *J Heart Valve Dis.* 1995;4(1):49-55.
19. Vyavahare NR, Jones PL, Hirsch D, Schoen FJ, Levy RJ. Prevention of glutaraldehyde - fixed bioprosthetic heart valve calcification by alcohol pretreatment: further mechanistic studies. *J Heart Valve Dis.* 2000;9(4):561-6.
20. Soncini da Rosa GR, Costa FDA, Mesquita L, Costa ISEA. Estudo comparativo da eficácia do etanol e ácido L-glutâmico na prevenção da calcificação das cúspides e parede aórtica porcina: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2002;17(2):40-51.
21. International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. *Nomina anatomica veterinaria.* 3rd ed. New York: ITHACA; 1983.
22. Shen M, Kara-Mostefa A, Chen L, Daudon M, Thevenin M, Lacour B et al. Effect of ethanol and ether in the prevention of calcification of bioprostheses. *Ann Thorac Surg.* 2001;71(5 suppl):S413-6.
23. Grunkemeier GL, Jamieson WR, Miller DC, Starr A. Actuarial versus actual risk of porcine structural valve deterioration. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994;108(4):709-18.

- 
24. Milano A, Guglielmi C, De Carlo M, Di Gregorio O, Borzoni G, Verunelli F et al. Valve-related complications in elderly patients with biological and mechanical aortic valves. *Ann Thorac Surg.* 1998;66(6 suppl):S82-7.
  25. Schoen FJ, Harasaki H, Kim KM, Anderson HC, Levy RJ. Biomaterial-associated calcification: pathology, mechanisms, and strategies for prevention. *J Biomed Mater Res.* 1988;22(A1 suppl):11-36.
  26. Chen W, Schoen FJ, Levy RJ. Mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves. *Circulation.* 1994;90(1):323-9.
  27. Levy RJ, Schoen FJ, Lund SA, Smith MS. Prevention of leaflet calcification of bioprosthetic heart valves with diphosphonate injection therapy: experimental studies of optimal dosages and therapeutic durations. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987;94(4):551-7.
  28. Golomb G, Ezra V. Prevention of bioprosthetic heart valve tissue calcification by charge modification: effects of protamine binding by formaldehyde. *J Biomed Mater Res.* 1991;25(1):85-98.
  29. Schoen FJ, Hirsch D, Bianco RW, Levy RJ. Onset and progression of calcification in porcine aortic bioprosthetic valves implanted as orthotopic mitral valve replacements in juvenile sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994;108(5):880-7.
  30. Yoshioka SA, Braile DM, Ramirez V, Goissis G. Reticulação de matrizes colagênicas com diacetais de glutaraldeído para a preparação de novos biomateriais. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 1995;Out/Dez :39-47.