JEAN NEWTON LIMA COSTA

**Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e
o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção
de biopróteses valvares cardíacas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2005

JEAN NEWTON LIMA COSTA

**Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e o
pericárdio bovino convencional utilizado na confecção
de biopróteses valvares cardíacas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Pablo Maria Alberto
Pomerantzeff

SÃO PAULO

2005

DEDICATÓRIA

A **Deus**,
pela existência com todo o seu encanto.

A **meus pais**,
pelo carinho desde os primeiros
passos e das primeiras letras.

À **Cilene** e à **Sarah**,
por quem tudo vale a pena.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Aos mestres

**Dr. Thomas McAllister,
Dra. Emília Vieira,
Prof. Dr. Paolo Andreazza,
Dr. João Vasconcelos,
Dr. Luiz Carlos Schimin,
Dr. João Guilherme Westin Duarte e
Dr. Itacir Arlindo Franceschini,**

pelas lições inesquecíveis.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **Domingo Marcolino Braile**, pela amizade e apoio, nos cedendo com generosidade as instalações da Braile Biomédica/ São José do Rio Preto-SP, onde realizamos a maior parte deste trabalho.

Ao biomédico **Vladimir Ramirez** com quem desenvolvemos ombro a ombro este projeto.

Ao engenheiro **Geraldo Herbert Sandoval** e a toda a equipe da Braile Biomédica pela colaboração inestimável.

A Professora Doutora **Sueli Suzigan** e ao Doutor **Mauro Canzian** pela cooperação preciosa no desenvolvimento das avaliações histológicas.

Aos Doutores **Jair Moraes Tostes** e **Gabriela Mariângela Farias de Oliveira** por nos ceder as instalações do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, cuidando com tanto profissionalismo nos nossos animais de experimentação.

Às Senhoras **Neusa Rodrigues Dini**, **Juliana Lattari Sobrinho**, **Eva Malheiros G. de Oliveira**, **Adriana Moreira de Quadros** e **Sônia Regina**

de Souza que contribuíram de modo importante para a realização deste estudo.

À estaticista **Mariana Curi** que nos auxiliou com tanta presteza.

Aos amigos da equipe do Cardiocentro/Hospital Sta. Lúcia – Brasília/DF pela amizade e incentivo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. **Pablo Maria Alberto Pomerantzeff**,
pela amizade, paciência e confiança que demonstrou desde os primeiros
momentos, jamais faltando com uma palavra de apoio e incentivo na
confeção deste projeto, além da orientação segura que tornou possível
transformar uma simples idéia em uma realização.

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando,
A certeza de que é preciso continuar
E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.”*

Fernando Sabino

NORMATIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com:

- Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).
- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação e dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE GRÁFICOS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTAS ABREVIATURAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS	viii
RESUMO	x
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. OBJETIVOS	5
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Obtenção do material biológico	14
3.2. Processo de decelularização	15
3.3. Reticulação com glutaraldeído	15
3.4. Controle de qualidade	16
3.4.1. Anatomia macroscópica	16
3.4.2. Exame histológico	17
3.4.3. Solventes e reagentes	18
3.4.4. Avaliação histológica do pericárdio	19
3.4.5. Resistência mecânica do pericárdio	19
3.4.6. Avaliação hidrodinâmica	20
3.4.7. Implante subcutâneo em ratos	23
3.4.8. Estudo histológico da prótese	25
3.4.9. Análise estatística dos dados	26
4. RESULTADOS	29
4.1. Avaliação histológica dos pericárdios	29
4.2. Avaliação da resistência mecânica do pericárdio	33
4.3. Avaliação histológica em modelo experimental com animais	39

4.4.	Avaliação hidrodinâmica das biopróteses	43
4.5.	Avaliação histológica das biopróteses	57
4.6.	Aspectos macroscópicos das biopróteses	58
4.7.	Aspectos microscópicos das biopróteses	60
5.	DISCUSSÃO	64
5.1.	Considerações Finais	74
6.	CONCLUSÕES	76
7.	ANEXOS	78
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
9.	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	111

LISTA DE FIGURAS

-		Pag
Figura 1	Aparelho simulador de fadiga	22
Figura 2	Sistema duplicador de pulso para avaliação hidrodinâmica	22
Figura 3	Rato Wistar em posição cirúrgica pós-tricotomia	24
Figura 4	Incisão cirúrgica para implante subcutâneo do pericárdio	24
Figura 5	Bioprótese de pericárdio exibindo as regiões de avaliação histológica pós-teste hidrodinâmico	25
Figura 6	Coloração por HE evidenciando ausência de celularidade em fragmento de pericárdio	30
Figura 7	Maior aumento que mostra ausência de celularidade e ondeamento normal das fibras de colágeno	30
Figura 8	Coloração por Tricrômio de Gomori evidenciando ondulado normal das fibras de colágeno	31
Figura 9	Detalhe do corte com TG exibindo fibra colágena	31
Figura 10	Coloração por Verhoeff que mostra a disposição das fibras de elastina	32
Figura 11	Detalhe corado por Verhoeff exibindo fibras de elastina	32
Figura 12	Fragmento de pericárdio bovino convencional com infiltrado inflamatório exuberante	41
Figura 13	Fragmento de pericárdio bovino decelularizado com formação granulomatosa	42
Figura 14	PBC – face anterior	57
Figura 15	PBC – face posterior	57
Figura 16	PBDC – face anterior	57
Figura 17	PBDC – face posterior	57
Figura 18	Avaliação macroscópica - PBDC1	58
Figura 19	Avaliação macroscópica - PBDC2	58
Figura 20	Avaliação macroscópica - PBDC3	59
Figura 21	Avaliação macroscópica - PBC	59
Figura 22 -	Aspecto microscópico final em fragmento de pericárdio de PBC	61

Figura 23 -	Aspecto microscópico final em maior aumento mostrando detalhe das fibras colágenas	61
Figura 24 -	Aspecto microscópico final em fragmento de pericárdio de PBDC	62
Figura 25 -	Aspecto microscópico final com detalhes do colágeno em fragmento de pericárdio de PBDC	62

LISTAS DE GRÁFICOS

	Pag
Gráfico 1. Espessura dos pericárdios	34
Gráfico 2. Tensão de ruptura	35
Gráfico 3. Elongação	36
Gráfico 4. Índice de tenacidade	37
Gráfico 5. Encolhimento	38
Gráfico 6. Fração de ejeção a 80 bpm	46
Gráfico 7. Fração de ejeção a 100 bpm	46
Gráfico 8. Débito cardíaco a 80 bpm	47
Gráfico 9. Débito cardíaco a 100 bpm	47
Gráfico 10. Duração do ciclo valvar a 80 bpm	48
Gráfico 11. Duração do ciclo valvar a 100 bpm	48
Gráfico 12. Fluxo de fase anterógrada a 80 bpm	49
Gráfico 13. Fluxo de fase anterógrada a 100 bpm	49
Gráfico 14. Fluxo médio a 80 bpm	50
Gráfico 15. Fluxo médio a 100 bpm	50
Gráfico 16. Pressão média a 80 bpm	51
Gráfico 17. Pressão média a 100 bpm	51
Gráfico 18. Volume de fechamento a 80 bpm	52
Gráfico 19. Volume de fechamento a 100 bpm	52
Gráfico 20. Volume de vazamento a 80 bpm	53
Gráfico 21. Volume de vazamento a 100 bpm	53
Gráfico 22. Fração regurgitante a 80 bpm	54
Gráfico 23. Fração regurgitante a 100 bpm	54
Gráfico 24. Área de orifício efetiva a 80 bpm	55
Gráfico 25. Área de orifício efetiva a 100 bpm	55
Gráfico 26. Índice de eficiência a 80 bpm	56
Gráfico 27. Índice de eficiência a 100 bpm	56

LISTA DE TABELAS

	Pag
Tabela 1. Medidas descritivas e comparação dos grupos de pericárdio quanto à variável “infiltrado inflamatório” a cada dia	39
Tabela 2. Medidas descritivas e comparação dos grupos de pericárdio quanto à variável “granuloma” a cada dia.	40

LISTAS DE ABREVIATURAS

AV →	área valvar
DC →	débito cardíaco
FC →	freqüência cardíaca
FE →	fração de ejeção
FM →	fluxo médio
FR →	fração regurgitante
GTA →	glutaraldeído
HE →	hematoxilina-eosina
IE →	índice de eficiência
IT →	índice de tenacidade
PB →	pericárdio bovino
PBC →	pericárdio bovino convencional
PBDC →	pericárdio bovino decelularizado
PM →	pressão média
TG →	tricroômio de Gomori
VH →	Verhoeff

LISTA DE SÍMBOLOS

°C →	grau Celsius
cm² →	centímetro quadrado
bpm →	batimentos por minuto
kg →	quilograma
l →	litro
l/m →	litros por minuto
min →	minuto
mmHg →	milímetro de Mercúrio
ml →	mililitro
mm →	milímetro
seg →	segundo
% →	percentual

Resumo

RESUMO

COSTA, JNL. *Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 133p.

O pericárdio bovino tratado com glutaraldeído (GTA) e armazenado em formaldeído tem sido utilizado para confecção de biopróteses cardíacas ao longo das últimas décadas, já se tendo acumulado grande experiência com seu manuseio. Sabemos, no entanto, que o uso do GTA associadamente à presença de restos celulares existentes em meio às fibras de colágeno e elastina do pericárdio, são fatores indutores de resposta inflamatória e de enucleação de cristais de cálcio, o que compromete a durabilidade da bioprótese *in vivo* a longo prazo.

No presente trabalho, tivemos como objetivo comparar a resistência mecânica do pericárdio decelularizado com o pericárdio convencional, assim como avaliar sua capacidade de induzir resposta inflamatória em modelo experimental com ratos. Para estudar as duas técnicas, dividimos os pericárdios em dois grupos: Grupo I – pericárdio submetido a tratamento convencional com GTA e Grupo II – pericárdio submetido a tratamento de decelularização previamente ao tratamento convencional com GTA. Após o processamento químico dos pericárdios, as amostras do Grupo II foram histologicamente avaliadas para confirmar a eficácia da decelularização. A seguir, analisamos a resistência mecânica nos dois grupos de pericárdio através dos testes de tração e de desnaturação térmica. Em nossa casuística, os dois grupos tiveram desempenho semelhante. A capacidade de induzir resposta inflamatória foi avaliada em estudo experimental em 50 ratos Wistar, machos, com 3 meses de idade, os quais foram submetidos a implante subcutâneo no abdome de fragmentos de pericárdio dos dois grupos. Igualmente, não evidenciamos diferença significativa. Nossa terceira etapa de avaliação consistiu em confeccionar 3 biopróteses (mitral n. 29) com o pericárdio decelularizado e que foram submetidas a avaliação hidrodinâmica juntamente com uma bioprótese convencional de teste. As biopróteses decelularizadas mostraram ter desempenho hidrodinâmico semelhante à prótese de teste e ao padrão de avaliação de próteses já conhecido da Braile Biomédica (S.J.Rio Preto-SP), todas atingindo a marca de 150 milhões de ciclos.

A avaliação histológica do pericárdio das próteses ao fim da ciclagem mostrou padrão microscópico habitual, não tendo havido ruptura ou fragmentação anormal induzida por estresse mecânico.

Temos como conclusão que a técnica de decelularização mantém a resistência física do pericárdio em comparação àquele convencionalmente preparado, não levando à fragmentação da matriz de colágeno e elastina e nem à perda de sua resistência mecânica tanto estática quanto dinâmica,

além de não ter induzido resposta inflamatória diferente daquela habitualmente encontrada no pericárdio convencional.

Descritores: estudo comparativo, pericárdio, bovinos, prótese das valvas cardíacas, bioprótese.

SUMMARY

COSTA, JNL. *Comparison between the decellularized bovine pericardium and the conventional bovine pericardium used in the manufacturing of cardiac bioprosthesis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo";2005. 133p.

The bovine pericardium treated with glutaraldehyde (GTA) and stored in formaldehyde has been used in the manufacturing of cardiac bioprosthesis through the past decades, and a great knowledge has been acquired in this field. We know however that the use of the GTA and the presence of cell debris among the collagen and elastin fibers are triggers to induce inflammatory response and calcium deposition in the tissue, what compromises the long term durability of bioprosthesis *in vivo*. In this paper, our objective was to compare the decellularized and the conventional pericardium mechanical resistance and also its capability of inducing inflammatory response in an animal experimental model. In order to study these two techniques, we divided the pericardia into two groups: Group I- pericardia conventionally treated with GTA and Group II – pericardia previously decellularized and then conventionally treated with GTA. At first, after the pericardia chemical treatment, we performed histological analysis of Group II to certify the efficacy of the decellularization process. Afterwards, we analyzed the mechanical resistance in both groups using the stretching and shrinkage tests. In our samples, both groups had the same performance. The capacity of inducing inflammatory response was evaluated in an experimental study with 50 Wistar rats, male, 3 months old, which were operated to receive the pericardia patches of both groups underneath the dermal layer in the abdomen. We also did not find any difference between the groups. The third step of evaluation was to manufacture three decellularized bioprosthesis and one no decellularized one that were submitted to hydrodynamic tests. The decellularized and the test prosthesis showed the same performance and there was also no difference when compared with the known performance of the Braile Biomédica's (S.J.R. Preto-SP) bioprosthesis. They all reached 150 million cycles. The histological evaluation of the bioprosthesis showed the usual microscopic pattern, and there was no abnormal rupture or fragmentation caused by mechanical stress. We have therefore reached to the conclusion that the decellularization technique keeps the physical resistance of the pericardium when compared with the conventionally prepared. It does not cause damage or fragmentation of the collagen and elastin fibers and does not lead to loss of the mechanical resistance. And also, there was no difference in both groups regarding to inflammatory response studied in the animal model.

Keywords: comparative study, pericardium, bovine, heart valve prosthesis, bioprosthesis.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O tratamento da doença cardíaca valvar tem sido um dos grandes desafios da Cirurgia Cardíaca nas últimas décadas, sendo que a substituição da valva nativa por uma prótese mostrou ser o mais importante avanço no tratamento de pacientes com doença sintomática, apesar de não ser destituída de complicações¹.

As próteses mecânicas oferecem função hemodinâmica satisfatória e excelente durabilidade a longo prazo, mas por serem trombogênicas requerem anticoagulação permanente, o que aumenta o risco de sangramento^{2,3,4,5}. As biopróteses apresentam perfil hemodinâmico ainda melhor, porém tanto os substitutos valvares confeccionados com valvas aórticas porcinas quanto aqueles de pericárdio bovino fixados com glutaraldeído induzem ativação do sistema imune^{6,7}, desencadeando reação inflamatória contra o tecido protético^{7,8}, o que leva a infiltração da matriz de colágeno, ruptura da malha colágeno-elastina e calcificação^{9,10,11}. Estes eventos culminam invariavelmente em disfunção de prótese e necessidade de reoperação^{2,3,4,5}.

Diante disto, muito tem sido pesquisado no intuito de se encontrar uma estratégia que crie uma prótese biocompatível e resistente a longo prazo. Evidências anteriores apontam que a decelularização em biomateriais torna o tecido menos antigênico, induzindo menor resposta inflamatória e menor degeneração tecidual^{12,13,14}. Porém, até o presente momento, não foi estudado o processo de decelularização em pericárdio bovino com o intuito de se confeccionar uma bioprótese cardíaca.

No presente trabalho, iremos comparar as propriedades físicas do pericárdio bovino decelularizado com o modelo convencional, sua capacidade de induzir resposta inflamatória em modelo experimental *in vivo*, assim como a durabilidade acelerada das próteses confeccionadas com estes materiais.

1.1 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos avaliar a resistência física do pericárdio bovino decelularizado, sua capacidade de gerar resposta inflamatória *in vivo* e sua resistência mecânica quando usado como bioprótese em comparação ao pericárdio convencional.

*Revisão da
Literatura*

2. REVISÃO DA LITERATURA

A necessidade de desenvolver um substituto de valva cardíaca tem impulsionado grande número de pesquisadores nas últimas décadas. Desde os anos 60 vem-se empreendendo grande esforço na busca de uma prótese valvar ideal. Já nesta época, a pesquisa iniciava-se em seus três setores: desenvolvimento de próteses mecânicas, de biopróteses homólogas e das biopróteses heterólogas¹⁵.

Em 1955, Murray et al.¹⁶ deram início ao emprego dos tecidos biológicos, utilizando homoenxertos valvares, através do implante valva aórtica fresca em aorta descendente de paciente com insuficiência grave.

A utilização de biopróteses heterólogas, no entanto, só foi possível após os estudos pioneiros de Carpentier et al.¹⁷ que descreveram em 1968 o uso do glutaraldeído em baixa concentração para tratamento de valvas aórticas porcinas. Na avaliação a longo prazo das biopróteses implantadas por este autor, foi demonstrada boa qualidade de vida dos pacientes, com baixas taxas de tromboembolismo, trombose da prótese, ausência de complicações hemorrágicas e taxa de disfunção protética de 7% em 6 anos. Porém, foi igualmente chamada a atenção, pela primeira vez,

para a durabilidade limitada dos enxertos devido à degeneração e ruptura tecidual, além do potencial de calcificação e enrijecimento dos folhetos valvares¹⁸. No início dos anos 70, Ionescu buscava desenvolver uma prótese de tecido biológico que mimetizasse uma valva aórtica humana¹⁹. Em 1971, foi então implantada a primeira prótese de pericárdio bovino tratado por glutaraldeído. Devido à excelente experiência inicial com este enxerto, Ionescu associou-se aos laboratórios Shiley e em 1976 foi lançada a primeira bioprótese de pericárdio bovino para uso comercial, Ionescu-Shiley.^{20,21}

Paralelamente, em 1971, no Brasil, Puig et al.^{22,23} iniciaram uma série clínica com 272 substituições valvares com prótese de duramáter preservadas com glicerol a 98%. Apesar da melhora no rendimento hemodinâmico e da boa durabilidade, com apenas 18% de disfunção protética em seis anos, estudos posteriores demonstraram que o glicerol, embora conservasse os tecidos, não promovia ligações químicas de reticulação, além de não conferir esterilização completa. A degeneração do colágeno foi igualmente um achado habitual após 23 meses de implante²⁴.

Desde então grande conhecimento e experiência foram acumulados com o uso do pericárdio bovino e do glutaraldeído.

A durabilidade mostrou-se limitada devido à degeneração do enxerto. O tempo médio na atualidade varia de 8 a 15 anos^{2,3,4,5,6}, sendo multifatorial a causa para tal desgaste. No Brasil, destacaram-se os estudos de Braile et al.²⁵ e Pomerantzeff et al.²⁶ que apresentaram incidência de

disfunção protética menor que 1%/paciente/ano em 11 e 15 anos respectivamente.

Aprendeu-se que o colágeno consiste em uma proteína fibrosa formada por uma tripla hélice. Esta configuração única é o resultado da geometria espiralada de três polipeptídeos (denominados cadeias α) dispostos ao redor de si mesmos^{27,28}. Embora tenham sido identificados pelo menos 22 tipos de colágeno, o tipo I formado por duas cadeias $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$ é o mais abundante do pericárdio bovino.

O glutaraldeído, por sua vez, reage com os ε -amino grupos de lisina (Lys) e hidroxilisina (Hyl) da matriz colagênica para formar ligações químicas do tipo base de Schiff ($-\text{CH}=\text{N}-$). Sendo uma molécula quimicamente bipolar, as sucessivas ligações das cadeias de colágeno levam à reticulação de toda a malha²⁹.

No entanto, as soluções aquosas de glutaraldeído não são homogêneas. São caracterizadas por misturas complexas em equilíbrio, contendo glutaraldeído livre, formas mono e diidratadas, hemiacetais cíclicos (monoméricos e poliméricos) e vários polímeros α, β -insaturados. Este equilíbrio depende da temperatura, concentração e pH^{29,30}. Comercialmente, as soluções são distribuídas a 25 e 50%, devendo ser purificadas através de destilações a vácuo ou extrações com carvão ativado. O controle de pureza é feito pela análise de absorbância em luz UV a 280 nm para formas monoméricas e 235 nm para formas poliméricas. A proporção de absorbância em UV destas formas (280/235nm) deve estar entre 1,5 e 2,5, sendo esta a faixa aceitável para a preservação adequada do tecido^{15,18}.

Estudos mais recentes demonstram que a reticulação do colágeno é concentração dependente. Concentrações mais altas de glutaraldeído induzem à formação de reações cruzadas na superfície das fibras, não levando a reticulação das regiões mais internas da matriz colagênica. Isso ocorre com as soluções habitualmente empregadas. Já concentrações menores progressivamente crescentes, tendem a reticular as regiões mais internas^{28,29,30,31}.

Ainda como consequência da heterogeneidade do glutaraldeído, surgem manifestações tóxicas em função da liberação de suas formas monoméricas, a partir de ligações cruzadas poliméricas, o que ocorre gradualmente após o implante³⁰.

É ainda amplamente demonstrado na literatura que o saco pericárdico bovino não consiste de uma malha homogênea de colágeno e elastina, mas é formado por regiões de espessura variável, com maior ou menor riqueza de fibras, infiltrados ou degenerações^{32,33,34}.

De todo o exposto, depreende-se a dificuldade de se obter materiais homogêneos e adequadamente fixados para a confecção de biopróteses cardíacas.

Neste contexto, veio à luz o conceito de que apesar da reticulação da malha de colágeno com glutaraldeído conferir-lhe boa resistência mecânica, não impede a ativação de resposta imune celular e humoral contra tecido heterólogo à semelhança dos transplantes⁶. A reação inflamatória contra o tecido estranho é tida hoje como um fator maior na degeneração valvar, contrariamente ao que se imaginava no passado - que

o glutaraldeído tornasse a prótese imunologicamente inerte⁷. Soma-se a isto a própria toxicidade do mesmo. Uma grande quantidade de experimentos corrobora a hipótese de que os grupos aldeídicos livres na malha de colágeno tem uma correlação importante com a atividade inflamatória local e com a indução à calcificação^{10,35,36,37}.

Assim, várias estratégias foram experimentadas nos últimos anos com o intuito de detoxicar o glutaraldeído ou mesmo de desenvolver um método alternativo a ele para a reticulação do colágeno. Vários surfactantes (dodecil sulfato de sódio, Polysorbato-80), solventes (toluidina azul), técnicas de impregnação (poliacrilamida), quelantes ou inibidores do cálcio (difosfonatos), antagonistas iônicos (alumínio), tratamento com amino-ácidos (l-lisina, l-glutamina, l-ácido glutâmico, l-arginina), azidas, epóxidos, carbodiimidas, pré-tratamento com álcool foram estratégias desenvolvidas, mas nenhuma atingiu um resultado definitivo^{28,38,39}.

Recentemente, baseado na evidência de que os restos celulares na matriz colagênica seriam um dos fatores indutores de inflamação e calcificação, veio à tona a hipótese de que a decelularização poderia tornar os tecidos protéticos mais biocompatíveis. Com esta premissa, várias técnicas de decelularização foram desenvolvidas e aplicadas como através de digestão celular enzimática, do uso de detergentes ou por foto-oxidação^{13,14}. Um dos estudos mais importantes foi o desenvolvimento da bioprótese porcina Synergraf por O'Brien et al.¹³ na Austrália. Neste estudo, os enxertos tratados foram implantados em carneiros, apresentando resultados impressionantes de desempenho hemodinâmico e redução do

potencial de inflamação/calcificação. No entanto, a experiência clínica inicial foi desastrosa, tendo havido degeneração e ruptura precoce das próteses, o que culminou em óbito e interrupção do trabalho⁴⁰.

O processo de decelularização, no entanto, tem sido pesquisado utilizando-se diversos biomateriais como valva aórtica e pulmonar, porcinas e ovinas, matrizes isoladas de colágeno solubilizado e pericárdio bovino, sendo os resultados iniciais promissores^{41,42,43,44,45}. Faz-se menção ao estudo recente desenvolvido por Nina et al.⁴⁶ no Incor/FMUSP que avaliou a técnica L-Hydro™ em biopróteses porcinas decelularizadas implantadas em carneiros, evidenciando perfil hemodinâmico satisfatório com maior resistência à calcificação e trombose. O pericárdio bovino, entretanto, não foi avaliado até o momento com o intuito de se confeccionar uma bioprótese valvar cardíaca, sendo este, então, o objetivo do presente estudo.

Métodos

3. MÉTODOS

3.1. Obtenção do material biológico

Os pericárdios foram obtidos em frigoríficos imediatamente após o abate dos animais com até 30 a 60 meses, sendo todos previamente examinados pelo SIF (Serviço de Inspeção Federal). Utiliza-se pericárdio bovino rico em fibras colágenas e livre de gordura.

O material foi então acondicionado em recipientes plásticos contendo solução hipertônica de NaCl com MgSO₄ 8 mOs, tamponada a pH 7.4 com tampão fosfato 0,13 M e transportado para o laboratório a 4° C, por no máximo 4 h¹⁵.

No laboratório, os pericárdios foram lavados em solução isotônica de NaCl 0,9% e toda a gordura e aderências foram retiradas.

3.2. Processo de decelularização

O pericárdios bovinos foram montados em suporte para serem submetidos ao tratamento de decelularização. Foram tratados a 20°C, por tempo de 24h, com uma solução alcalina (3 ml/g de tecido) contendo (v/v) dimetil sulfóxido 6%, sais (cloreto e sulfato), bases alcalinas (K^+ , 1,19 M e Na^+ , 1,74 M), e alcalina terrosa (Ca^{+2} , 0,86M). O material resultante foi equilibrado com solução de Na_2SO_4 , NaCl, KCl e $CaSO_4$ (6 ml de solução/ g de tecido) por um período de 6h, e o excesso de sais residuais ainda presentes foram removidos por lavagens sucessivas com ácido bórico a 3%, água destilada e EDTA 0,3% a pH 11, seguido da estabilização do material em tampão fosfato 0,14 mol.L⁻¹, pH 7,4. Após este procedimento as peças de pericárdio bovino foram lavadas (3x15min) com água destilada ¹⁶.

3.3. Reticulação com glutaraldeído

Os materiais obtidos foram tratados com uma solução de glutaraldeído a 0,05% em tampão fosfato 0,14 molL⁻¹, pH 7,4 por um período de 15 min, seguido do tratamento com solução de tampão glicina borato. Em seguida, foram lavados 6 vezes com tampão fosfato 0,14 mol.L⁻¹, pH 7,4 e encaminhados à Braile Biomédica para processamento. Todo este procedimento foi realizado na Faculdade de Química da USP/ São Carlos à temperatura de 5 °C⁴⁷.

Na Braile Biomédica, os pericárdios foram lavados em solução isotônica de NaCl 0,9%. A seguir, foram submetidos a fixação com glutaraldeído purificado a 0,5% em tampão fosfato 0,13 M, pH 7,4 por 3 horas em temperatura ambiente. Posteriormente foram transferidos para nova solução de glutaraldeído por 3 dias a 4°C. A solução foi novamente trocada e as amostras permaneceram por mais 12 dias, também a 4°C. Após este período, foram colocadas individualmente em cubas com 300 ml de solução de glutaraldeído por 3 dias a 23°C. A seguir, foram lavadas por seis vezes, durante 15 min, com tampão fosfato e tratadas com solução tampão borato 0,005 M/ ácido glutâmico 0,025 M, ajustando o pH alcalino com NaOH 0,1 N, deixando-as reagir por 24 h em temperatura ambiente.

Completo o período de curtimento, os pericárdios foram colocados em solução conservadora de formaldeído 4%, em tampão acetato, 0,2M, pH 5,4 por três dias, sendo então submetidos ao controle de qualidade¹⁵.

3.4. Controle de qualidade

3.4.1. Anatomia macroscópica

Todas as amostras de pericárdio foram analisadas quanto ao seu aspecto macroscópico. A seleção foi feita através de foco luminoso de luz polarizada, inspecionando-se a textura e a transparência, visando o aproveitamento de regiões homogêneas quanto à orientação e à

concentração de fibras. Foram descartados sumariamente aqueles com infiltrados anormais, espessamentos ou defeitos de qualquer natureza¹⁵

3.4.2. Exame histológico

Foi realizada igualmente avaliação microscópica por amostragem aleatória de diferentes fragmentos de pericárdio com o objetivo de estabelecer o padrão histológico presente no material de estudo, mesmo levando-se em conta que tal procedimento não seja rotineiro na confecção e preparo das biopróteses cardíacas.

O estudo histológico para avaliação da anatomia microscópica utiliza os métodos habituais de inclusão em parafina, com cortes de 3 a 5 Ôm de espessura e coloração com Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômio de Gomori (TG) e Verhoeff (VH).

Os critérios que definem bom padrão incluem ondulação proeminente dos feixes de fibras de colágeno, preservação de fibras elásticas, escassa quantidade de substância fundamental amorfa e espaço reduzido entre os diferentes extratos entrecruzados de feixes colágenos.

Os critérios de mau padrão incluem amostras de pericárdio com retificação ou ruptura dos feixes de fibras colágenas, alterações tintoriais ou degenerativas dos feixes, fragmentação ou irregularidades das fibras elásticas, aumento dos espaços entre os feixes colágenos de uma mesma camada, aumento da substância fundamental amorfa entre os feixes,

depósitos de material mixomatoso na substância fundamental amorfa ou outras alterações degenerativas, presença de vasos de paredes espessas ou qualquer tipo de infiltrado celular¹⁵.

3.4.3. Solventes e reagentes

Os reagentes utilizados são: tampões de sódio, fósforo e potássio, ácido glutâmico, formaldeído, glutaraldeído (GTA, Union Carbide), o qual é purificado conforme padronizado e descrito na literatura¹⁵, e sua pureza determinada pela relação das absorvâncias 280/235nm que, para o caso de válvulas cardíacas biológicas, deve estar compreendida entre 1,5 a 2,5. Esta relação é uma indicação da quantidade de glutaraldeído livre e polimérico em solução. A descrição das soluções consta no Anexo 1.

No laboratório, os pericárdios foram divididos em dois grupos:

- Grupo I: pericárdios sem pré-tratamento fixados com glutaraldeído.
- Grupo II: pericárdios decelularizados fixados com glutaraldeído.

3.4.4. Avaliação histológica do pericárdio

Após o tratamento químico, 6 (seis) sacos pericárdicos que deram origem às 3 (três) PBDC foram submetidos a avaliação histológica com o objetivo de confirmar a eficácia da técnica de decelularização nas amostras a serem estudadas, assim como avaliar o padrão da rede de colágeno e elastina. Utilizamos o mesmo padrão de colorações com HE, TG e VH.

3.4.5. Resistência mecânica do pericárdio

Esta avaliação consistiu em testes de tração estática (tensão de ruptura, alongação e índice de tenacidade) e teste de encolhimento. Utilizam-se amostras padronizadas de 6 x 20 mm fixada por pinças especiais nos aparelhos descritos abaixo^{48,49}.

Avaliamos três grupos com 10 fragmentos de pericárdio cada. Grupo 1 – pericárdio bovino convencional com parâmetros de aprovação para confecção de bioprótese. Grupo 2 – pericárdio convencional que apresenta parâmetros de descarte para confecção de bioprótese. Grupo 3 – pericárdio bovino decelularizado. Todos foram submetidos aos testes de resistência no aparelho de tração Q-Test/ 1L (MPS) – MPS Systems Co. e de encolhimento no dispositivo Avaliador de Encolhimento/ Braile Biomédica localizados na Braile Biomédica – São José do Rio Preto/SP segundo as normas NBR ISO 5840:1999 (ABTN) e ANSI/AAMI/ISO 5840:1996 (ANS) ^{50,51}.

3.4.6. Avaliação hidrodinâmica

Realizamos igualmente teste de fadiga ou durabilidade acelerada em aparelho simulador de fadiga da Shelhigh modelo FTS 300 – USA com 4 câmaras de avaliação (fig. 1) e análise das performances hidrodinâmicas em um sistema duplicador de pulso automático da Shelhigh, modelo V. 4.0 – USA (fig.2). Três biopróteses de pericárdio decelularizado (mitral n.29) e uma bioprótese de pericárdio bovino convencional (mitral, n. 29 – Braile Biomédica) foram confeccionadas e colocadas no simulador de fadiga para avaliação do desgaste mecânico. O teste foi interrompido a cada 50×10^6 de ciclos para avaliação do desempenho hidrodinâmico conforme preconizado pelas normas descritas. Os perfis hidrodinâmicos foram avaliados nos tempos zero, 50, 100 e 150×10^6 de ciclos. As variáveis analisadas foram:

1. fração de ejeção: volume em ml ejetado pelo sistema através da prótese
2. débito cardíaco: fluxo através da prótese em l/min.
3. duração do ciclo valvar: duração do ciclo em segundos incluindo abertura e fechamento.
4. fase de fluxo anterógrado ou adiantamento da fase de fluxo: fase do ciclo em que o fluxo se desloca anterogradamente durante a abertura da prótese. Dado em porcentagem.
5. fluxo médio: média do fluxo transvalvar, em l/min, medida por cálculo integral da curva de fluxo gerada no sistema.

6. pressão média: gradiente de pressão transvalvar dado em mmHg.
7. volume de fechamento: volume em ml necessário para fechar os folhetos da prótese.
8. volume de vazamento: volume de solução em ml que vaza através da prótese após o fechamento.
9. fração regurgitante: representa em porcentagem o volume que retorna durante o fechamento da prótese.
10. área efetiva do orifício: área interna da prótese, em cm², que abre efetivamente durante o ciclo cardíaco sob fluxo e pressão constantes. É calculada com base na fórmula de Gorlin indicada abaixo.
$$EAO = Q / C \times F \times \Delta P \quad (Q = \text{fluxo}, C \text{ e } F = \text{fatores constantes de conversão}, \Delta P = \text{variação da pressão}).$$
11. Índice de eficiência: relação da área efetivamente aberta e da teoricamente calculada.^{48,49}.

As próteses foram mantidas no simulador de fadiga até o tempo final de 150×10^6 ciclos

Figura 1. Aparelho simulador de fadiga.

Figura 2. Sistema duplicador de pulso

3.4.7. Implante subcutâneo em ratos

Fragmentos de pericárdio bovino dos Grupos I e II foram lavados com solução salina por aproximadamente 10 min previamente ao procedimento cirúrgico em 50 ratos machos (Wistar, com aprox. 180-240 g). Após a anestesia, cada animal foi submetido a tricotomia em região abdominal (fig.3) e a incisão mediana com aproximadamente 1 cm interessando apenas a pele (fig. 4), a partir da qual foram confeccionadas uma bolsa subcutânea de cada lado do abdome. Em cada bolsa foi implantado um fragmento de pericárdio de cada grupo. Cinco grupos de 10 ratos foram sacrificados com 7, 14, 30, 60 e 90 dias pós-implante respectivamente. O material retirado foi enviado para análise histológica, tendo sido estudado utilizando-se as colorações HE, TG E VH e Von Kossa. Os resultados da análise das lâminas foi numerado em escore de 0 a 4 cruces, indicando uma caracterização crescente da presença de atividade inflamatória, formação de granuloma e deposição de cálcio nos tecidos. Todo o material foi avaliado por observador único.

Figura 3. Rato Wistar em posição cirúrgica após tricotomia

Figura 4. Incisão abdominal para implante subcutâneo dos pericárdios.

A experimentação em animais foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

3.4.8. Estudo histológico da prótese

Após os testes dinâmicos, o pericárdio das próteses foi novamente submetido a estudo histológico para avaliação da integridade do mesmo após estresse mecânico.

Três próteses de pericárdio bovino decelularizado (PBDC) e uma prótese controle de pericárdio bovino convencional (PBC) tiveram uma de suas três lascíneas retirada e estudada em suas regiões basal (B), média (M) e livre (L) conforme exemplificado na figura 5.

Figura 5. Regiões basal, média e livre no folheto da prótese.

Os fragmentos isolados foram incluídos em parafina e submetidos à coloração com HE, TG e VH. Receberam contagem de zero a três cruzes

para caracterização da celularidade e do padrão de fibras de colágeno e elastina nos tecidos. Foram igualmente avaliados por observador único.

3.4.9. Análise estatística dos dados

Os dados foram descritos através de valores mínimo e máximo, mediana, média e desvio padrão.

Os grupos de pericárdio 1,2 e 3 foram comparados quanto às variáveis espessura, tensão de ruptura, alongação, índice de tenacidade e temperatura através da análise de variância. Comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey. As suposições de variâncias iguais entre os grupos e normalidade dos dados foram verificadas utilizando-se os testes de Levene e Kolmogorov-Smirnov, respectivamente.

Os dados da avaliação do implante de pericárdio convencional e decelularizado em modelo experimental com animais foram comparados quanto a granuloma e infiltrado, em cada dia de avaliação, utilizando-se o teste de sinais de Wilcoxon para amostras pareadas.

As comparações dos grupos com relação às 11 variáveis de desempenho hemodinâmico foram realizadas utilizando-se a análise de variância. Comparações múltiplas foram feitas através do teste de Wald e a suposição de distribuição Normal foi verificada pelos gráficos de probabilidade normal dos resíduos.

Um nível de significância igual a 0,05 foi adotado nas comparações.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação histológica dos pericárdios

Após a obtenção, tratamento e acondicionamento dos fragmentos de pericárdio bovino, procedemos à avaliação histológica dos mesmos para que confirmássemos a efetividade do processo de decelularização. Utilizamos a microscopia ótica para definir a ausência de fragmentos e restos celulares nos sacos pericárdicos tratados, assim como para caracterizar o padrão das fibras de colágeno e elastina. Pudemos observar a efetividade do método de decelularização que retira as matrizes de células fixadas e restos celulares que habitualmente permanecem no pericárdio após a fixação com glutaraldeído. Figuras 6 e 7.

Evidenciamos ainda que a técnica de decelularização não danifica a malha de fibras de colágeno e elastina. Figuras 8 a 11.

Figura 6. (HE200x) Coloração evidenciando ausência de celularidade na amostra.

Figura 7. (HE 400x) Detalhe mostrando ondulado de fibras sem células.

Figura 8. (TG 100x) Fibras de colágeno com ondulado habitual e discreta fragmentação.

Figura 9. (TG 400x) Detalhe do corte anterior, exibindo fibra colágena.

Figura 10. (VH 100x) Disposição ondulada das fibras de elastina.

Figura 11. (VH 400x) Detalhe das fibras de elastina.

4.2. Avaliação da resistência mecânica do pericárdio

Pelos níveis descritivos dos testes comparativos dos grupos, pode-se concluir que não há diferenças significativas entre os grupos quanto às variáveis espessura, elongação e temperatura conforme exibidos nos gráficos 1,3 e 5. Para esta última variável, apenas os grupos 1 e 3 foram considerados, pois não houve nenhum valor diferente de 0 para o grupo 2, impossibilitando sua inclusão na análise inferencial. Por outro lado, o grupo 1 apresentou valores médios de tensão de ruptura e índice de tenacidade significativamente maiores do que nos outros dois grupos (gráficos 2 e 4). As suposições de homocedasticidade e normalidade dos dados foram verificadas e satisfeitas em todas as comparações realizadas e estão apresentadas no anexo 2.

GRÁFICO 1. Espessura dos pericárdios (mm)

Observamos não haver diferença significativa quanto à espessura dos fragmentos analisados.

GRÁFICO 2. Tensão de ruptura (kg/mm²).

O grupo 1 demonstrou maior resistência à tração que os outros grupos.

Entre os grupos 2 e 3 não houve diferença estatística.

GRÁFICO 3. Elongação (%).

A elongação, sendo definida como a deformação sofrida pelo corpo de prova até que ocorra ruptura não demonstrou qualquer diferença entre os grupos.

GRÁFICO 4. Índice de tenacidade.

O grupo 1 demonstrou maior índice de tenacidade que os outros dois grupos à semelhança da resistência à tração. Não houve diferença entre os grupos 2 e 3.

GRÁFICO 5. Encolhimento (°C)

Entre os grupos 1 (pericárdios com critérios de aprovação para confecção de bioprótese) e grupo 3 (pericárdio decelularizado) não houve diferença no teste de encolhimento. O grupo 2 não foi avaliado por ter sido descartado após reprovação nos testes de tração.

4.3. Avaliação histológica em modelo experimental com animais

Pelos níveis descritivos dos testes comparativos dos grupos, pode-se concluir que não há diferenças significativas entre os grupos quanto às variáveis *infiltrado inflamatório* e *granuloma* em nenhum dos dias de avaliação. A análise inferencial da variável calcificação não foi realizada por não ter apresentado nenhum valor diferente de 0 (zero). Os resultados são explicitados nas tabelas abaixo.

Tabela 1. Medidas descritivas e comparação dos grupos quanto à variável *infiltrado inflamatório* em cada dia.

Variável	dia	grupo	n	mínimo	máximo	mediana	média	DP	p
Infiltrado inflamatório	7	I	10	1	3	1	1,5	0,71	0,059
		II	10	1	1	1	1,0	0,0	
	14	I	10	1	4	3	2,2	0,92	0,832
		II	9	1	4	3	2,0	1,0	
	30	I	10	1	4	3	2,5	1,08	0,145
		II	10	1	3	3	1,7	0,82	
	60	I	10	1	2	1	1,6	0,52	0,655
		II	10	1	3	2	2	0,67	
	90	I	10	1	2	1	1,0	0,48	0,317
		II	10	1	2	1,5	1,5	0,53	

Tabela 2. Medidas descritivas e comparação dos grupos quanto à variável granuloma em cada dia.

variável	dia	grupo	n	mínimo	máximo	mediana	média	DP	p
granuloma	7	I	10	1	2	1	1,2	0,42	0,257
		II	10	1	3	1	1,5	0,85	
	14	I	10	1	4	3	2,5	0,97	0,098
		II	9	2	4	3	3,1	0,60	
	30	I	10	1	3	2	2,5	0,71	0,317
		II	10	1	4	3	2,8	0,79	
	60	I	10	1	4	1	1,4	0,97	0,230
		II	10	1	4	2	2	1,05	
	90	I	10	0	2	1	1,1	0,57	0,096
		II	10	1	2	2	1,6	0,52

Figura 12. Fragmento de PBC com infiltrado inflamatório exuberante

A avaliação histológica mostra infiltrado inflamatório similar nos dois grupos. Na figura 12 vemos exemplo de grande infiltrado inflamatório considerado 4+/4 e que exhibe infiltração exuberante de monócitos e linfócitos em meio às fibras colágenas em fragmento de pericárdio convencional.

Figura 13. Fragmento de PBDC com abundante infiltrado inflamatório e formação de granuloma

O desenvolvimento de granulomas também se mostrou sem diferenças. Na figura 13 vemos formação granulomatosa típica com reação tipo “corpo estranho”, predomínio de monócitos e linfócitos e aglomeração celular sincicial em PBDC.

Não houve deposição de cálcio nos fragmentos de nenhum dos grupos em nenhum dos tempos avaliados.

4.4. Avaliação hidrodinâmica das biopróteses

O desempenho hidrodinâmico na avaliação comparativa global entre as 4 biopróteses estudadas mostrou-se semelhante, não havendo diferença entre elas. Encontramos diferença estatística entre algumas medidas analisadas, porém nenhuma traduziu-se em diferença de comportamento mecânico entre as próteses e todas as medidas mantiveram-se dentro dos valores preconizados na literatura. É importante ressaltar que a análise estatística para esta avaliação foi exploratória, não sendo possível fazer extrapolação de dados.

A análise para cada um dos parâmetros mostrou:

1. Fração de ejeção: a 80 bpm, houve diferença estatística no ciclo 0 (zero) entre as PBC e PBDC1 ($p=0,05$) e entre as PBC e PBDC3 ($p=0,0036$), porém não houve diferença entre as demais medidas. O desempenho hemodinâmico global foi semelhante e os valores estiveram dentro dos limites esperados. (Gráficos 6 e 7)
2. Débito cardíaco: a 80 e 100 bpm, as 4 próteses mostraram desempenho hemodinâmico semelhante, exibindo os valores esperados. Nota-se valor do DC diminuído ($DC= 5,75 \pm 0,21$ l/min) com $p<0,0001$ para PBDC1 a 100 bpm em 150×10^{-3} de ciclos em relação às demais próteses. (Gráficos 8 e 9)
3. Duração do ciclo: a 80 e 100 bpm não houve diferença de desempenho hidrodinâmico. Igualmente, nota-se variação

isolada para PBDC1 a 100 bpm em 150×10^3 ciclos. (Dur: $0,91 \pm 0,12$ s) com $p < 0,0001$. (Gráficos 10 e 11)

4. Fase de fluxo anterógrado: o desempenho foi semelhante, não havendo diferença entre as próteses. (Gráficos 12 e 13)
5. Fluxo médio: desempenho semelhante. Encontramos variação para PBDC1 a 100 bpm em 150×10^3 ciclos. (FM= $10,59 \pm 1,03$ l/min) com $p=0,002$. (Gráficos 14 e 15)
6. Pressão média: valores comparáveis entre as próteses e dentro da variação esperada. Diferença para PBDC1 a 100 bpm em 150×10^3 ciclos. (PM= $2,91 \pm 0,41$ mmHg) com $p < 0,0001$. (Gráficos 16 e 17)
7. Volume de fechamento: valores dentro do esperado, sendo que a 100 bpm no ciclo 0 (zero), as PBDC2 e PBDC3 necessitaram de volume de fechamento superior ao controle PBC ($p=0,001$), o mesmo ocorrendo com as três PBDC em relação à PBC em 150×10^3 ($p < 0,0001$). Todas as medidas estiveram dentro dos valores esperados. (Gráficos 18 e 19)
8. Volume de vazamento: valores comparáveis e dentro do esperado. Notou-se diferença estatística entre as medidas feitas a 100 bpm em 50×10^3 ciclos, sem que isso se traduzisse em comprometimento do desempenho. (Gráficos 20 e 21)
9. Fração regurgitante: Desempenho semelhante. Houve diferença estatística a 100 bpm no ciclo 0 (zero): PBCD2

/PBDC3 > PBDC1/PBC ($p=0,003$) e em 150×10^3 ciclos:
PBDC1/PBDC2/PBDC3 > PBC ($P<0,0001$). (Gráficos 22 e 23)

10. Área efetiva do orifício e índice de eficiência mostraram-se igualmente satisfatórios para as quatro próteses em todas as medidas. (Gráficos 24, 25, 26 e 27)

O detalhamento dos dados é exibido nos Anexos 3 e 4.

Gráfico 6. Fração de ejeção (ml) a 80 bpm

Gráfico 7. Fração de ejeção (ml) a 100 bpm

Gráfico 8. Débito cardíaco (l/min) a 80 bpm

Gráfico 9. Débito cardíaco (l/min) a 100 bpm

Gráfico 10. Duração do ciclo valvar (seg) a 80 bpm

Gráfico 11. Duração do ciclo valvar (seg) a 100 bpm

Gráfico 12. Adiantamento da fase de fluxo (seg) a 80 bpm

Gráfico 13. Adiantamento da fase de fluxo (seg) a 100 bpm

Gráfico 14. Fluxo médio (/min) a 80 bpm

Gráfico 15. Fluxo médio (l/min) a 100 bpm

Gráfico 16. Pressão média (mmHg) a 80 bpm

Gráfico 17. Pressão média (mmHg) a 100 bpm

Gráfico 18. Volume de fechamento (ml) a 80 bpm

Gráfico 19. Volume de fechamento (ml) a 100 bpm

Gráfico 20. Volume de vazamento (ml) a 80 bpm

Gráfico 21. Volume de vazamento (ml) a 100 bpm

Gráfico 22. Fração regurgitante (%) a 80 bpm

Gráfico 23. Fração regurgitante (%) a 100 bpm

Gráfico 24. Área efetiva do orifício (cm²) a 80 bpm

Gráfico 25. Área efetiva do orifício (cm²) a 100 bpm

Gráfico 26. Índice de eficiência a 80 bpm

Gráfico 27. Índice de eficiência a 100 bpm

4.5. Avaliação histológica das biopróteses

Os aspectos macroscópicos e histológicos observados são apresentados a seguir.

Fig. 14 . PBC – face anterior

Fig. 15. PBC – face posterior

Fig. 16. PBDC – face anterior

Fig. 17. PBDC – face posterior

4.6. Aspectos macroscópicos das biopróteses

Prótese Biológica Cardíaca PBDC 1: constituída por 03 lascíneas, de cor pardo-clara, de consistência firme-elástica, mostrando superfície inferior lisa, brilhante e superfície superior discretamente irregular (superfície de *peeling*). Ausência de rupturas ou de outras alterações significativas.

Figura 18. PBDC 1

Prótese Biológica Cardíaca PBDC 2: constituída por 03 lascíneas, de cor pardo-amarelada, escura (ocre), de consistência firme-elástica, mostrando superfície inferior lisa, brilhante e superfície superior discretamente irregular (superfície de *peeling*). Ausência de rupturas ou de outras alterações significativas.

Figura 19. PBDC 2

Prótese Biológica Cardíaca PBDC 3: constituída por 03 lascíneas, de cor pardo-clara, com áreas mais escuras, mal delimitadas, pardo-amareladas (ocre); de consistência firme-elástica, mostrando superfície inferior lisa, brilhante e superfície superior discretamente irregular (superfície de *peeling*). Ausência de rupturas ou de outras alterações significativas.

Figura 20. PBDC 3

Prótese Biológica Cardíaca PBC: constituída por 03 lascíneas, de cor pardo-clara, consistência firme-elástica, mostrando superfície inferior lisa, brilhante e superfície superior (superfície de *peeling*) discretamente irregular. Ausência de rupturas ou de outras alterações significativas.

Figura 21 . PBC

4.7. Aspectos microscópicos das biopróteses

Histologicamente, na prótese de PBC encontramos celularidade preservada (abundantes células estromais do tipo fibroblastos e escassas células inflamatórias mononucleares do tipo linfócitos). Fibras colágenas com discreta fragmentação; alterações degenerativas tais como aspecto “franjado” e degeneração basofílica; preservação do ondeamento habitual. As fibras elásticas mostraram igualmente discreta fragmentação e variação de espessura.

As próteses de PBDC mostraram ausência de celularidade seja de células tipo fibroblasto, endotelial, adiposa ou inflamatória (compatível com decelularização efetiva). Fibras colágenas com moderada fragmentação; alterações degenerativas como variação de espessura, áreas de espessamento e degeneração basofílica; preservação do padrão de ondeamento. Fibras elásticas com fragmentação discreta a moderada e diminuição do n. fibras de modo mais evidente em regiões B e M na face oposta à superfície de “peeling”.

O aspecto comparativo global entre os dois tecidos de pericárdio nos mostra que não há diferença histológica significativa. Os aspectos observados são considerados como padrão habitual de desgaste de tecido após a fadiga. O detalhamento dos achados é mostrado no Anexo 5.

Nas figuras 22 e 23 observamos respectivamente padrão habitual de disposição das fibras colágenas e ondeamento preservado em fragmentos

de PBC. As figuras 24 e 25 mostram o mesmo padrão para fragmentos de PBDC.

Figura 22. PBC (HE 100x). Preservação de fibras colágenas.

Figura 23. PBC (HE 400x). Ondeamiento habitual do colágeno.

Figura 24. PBDC (HE 200x). Fibras colágenas preservadas.

Figura 25. PBDC (HE 400x). Ondeamiento habitual preservado.

Discussão

5. Discussão

O implante de próteses valvares cardíacas vem sendo realizado há quase meio século, mas ainda não se chegou a um substituto valvar com critérios satisfatórios de durabilidade e biocompatibilidade. O enxerto ideal deveria apresentar resistência adequada, sendo capaz de tolerar o estresse mecânico a longo prazo; ter perfil hemodinâmico comparável às valvas nativas; ser imunocompatível, não desencadeando respostas de defesa por parte do hospedeiro; ser resistente à degeneração por infiltrações, ruptura da matriz fibro-elástica e deposição de cálcio; ter capacidade de manter a vitalidade da malha protéica de colágeno, elastina e glicosaminoglicanos e apresentar baixo custo.

E como é longamente conhecido pelos especialistas da área, a durabilidade da bioprótese valvar é influenciada por diversos fatores como idade, fatores metabólicos, tempo de implante e posição, estresse mecânico, técnica de conservação do tecido e preservação, técnica de manufatura, fatores cirúrgicos e qualidade e heterogeneidade do tecido biológico¹⁵.

De todos os fatores arrolados como responsáveis pela degeneração protética na atualidade, de longe, os que assumem maior

importância e que tem grande parte dos estudos dirigidos para sua pesquisa são a calcificação e a toxicidade do glutaraldeído^{52,53,54,55,56}. Dentre os mecanismos da calcificação, tem-se a evidência de que a presença de células mortas e debris de restos celulares incompletamente fixados pelos métodos de tratamento funcionariam como núcleos de calcificação, permitindo a deposição de cristais de fosfatos e carbonatos de cálcio, sódio e magnésio⁵⁶. Em adição a isso, o próprio tratamento com glutaraldeído funcionaria como fator desencadeante da deposição de cálcio. Já foi demonstrado que altos teores de glutaraldeído incorporado ao tecido biológico se relacionam com maior tendência à calcificação em modelo experimental com ratos⁵⁷. A relação causal entre pré-tratamento com glutaraldeído e calcificação foi estudada Nimni et al.⁵⁸ que demonstraram que os polímeros de glutaraldeído e os resíduos carbonílicos livres na matriz de colágeno provêm um sítio inicial para a deposição dos complexos de cálcio.

E, à parte do aparente papel do glutaraldeído no processo de calcificação, a própria natureza citotóxica desse preservante é avaliada em diversos estudos. Pôde ser demonstrado que os grupos aldeídicos livres liberados pelo material bioprotético inibem o crescimento de células endoteliais^{59,60,61}. Isso é facilmente percebido em avaliações morfológicas de biopróteses explantadas nas quais verifica-se apenas crescimento endotelial desordenado em regiões basais da prótese. E essa ausência de cobertura celular é tida como fator associado à degeneração do tecido, permitindo insudação de plasma e lípidos, além da invasão macrofágica⁵⁷.

Assim, diversas estratégias têm sido avaliadas com o objetivo de eliminar ou minimizar a degeneração tecidual induzida por esses fatores. Os tratamentos anti-calcificação podem ser divididos em três grupos: o primeiro é o uso de processos de reticulação não-aldeídica, como o tratamento por foto-oxidação, uso de carbodiimidas e azidas ou técnicas como o Synergraft e L-Hydro. O segundo é a modificação do tratamento com glutaraldeído através da adição de detergentes, solventes, amino-ácidos como o ácido L-glutâmico, pré-tratamento com álcool, dentre outros. E o terceiro, dentro do qual se insere esta pesquisa é o uso de técnicas de decelularização no intuito de prevenir a calcificação e a degeneração tecidual.

Várias técnicas de decelularização foram desenvolvidas. Utilizam-se detergentes como os descritos por Courtmann et al.⁶² e Dohmen et al.⁶³; extração enzimática através de I-tripsina descrita por Steinhoff et al.⁶⁴, a técnica Synergraft apresentada por O'Brien et al.¹³; ou ainda a extração celular utilizada por Goissis et al.^{47,65} no Instituto de Química da USP/ São Carlos e que foi o método empregado neste estudo.

No entanto, resultados conflitantes tem sido encontrados no que diz respeito à capacidade de decelularização e de manutenção da integridade estrutural da matriz extra-celular quando se utilizam os diferentes métodos.

Courtmann et al.^{62,66} relataram a preservação das características viscoelásticas, redução de 20% na falha por estresse mecânico e aumento na extensibilidade de folhetos porcinos decelularizados. O mesmo autor, ao estudar o pericárdio bovino decelularizado por digestão enzimática, notou

importante queda na temperatura de encolhimento do tecido tratado em relação ao controle e redução de até três vezes na espessura do tecido. Perda significativa na estabilidade térmica e infiltração do tecido também foram reportados por Boudnar et al.⁶⁷ que avaliaram folhetos de valvas porcinas. Observações semelhantes foram feitas por Samouillan et al.⁶⁸ que usaram análise termogravimétrica e varredura calorimétrica diferencial para avaliar o efeito da decelularização enzimática por Triton X-100 com colato de sódio (TRI-COL) e SDS (dodecil sulfato de sódio). Segundo estes autores, a extração por TRI-COL não afetou a integridade estrutural da matriz, mas o SDS teve efeito destrutivo através da desestabilização da conformação do colágeno e infiltração da rede de elastina. E é ainda reportado que a capacidade de decelularização completa depende do método utilizado, da concentração do reagente, da osmolaridade da solução, do pH e do tempo de incubação, nem sempre se obtendo uma matriz satisfatoriamente desvitalizada.

No nosso estudo, obtivemos decelularização completa. Isto foi verificado pela avaliação histológica inicial nos pericárdios tratados, dos quais foi retirado um fragmento para análise. E foi igualmente observado na histologia final do pericárdio das biopróteses que tiveram avaliação de três regiões de cada folheto. Outras avaliações histológicas feitas por nós em pericárdio bovino decelularizado e não incluídas neste estudo, confirmam a eficácia do método. Nota-se que nem sempre isso é obtido como reportado por Schenke-Layland et al.⁶⁹ que descrevem decelularização “quase

completa” em valvas porcinas tratadas por digestão enzimática com L-tripsina.

A matriz de colágeno e elastina foi preservada. Não encontramos fragmentação ou ruptura importante em nenhum dos espécimes avaliados. E mesmo, observamos que na análise comparativa final do pericárdio das biopróteses dos dois grupos, não houve diferença no padrão histológico. É importante notar que a avaliação histológica tem um componente subjetivo, dependente da avaliação do observador. Tendo isto em vista, para minimizar qualquer possibilidade de diferença de interpretação, todas as amostras foram estudadas por observador único.

Com relação aos testes de tração estática, encontramos resultados interessantes. Comparamos três grupos de pericárdio, como já descrito. Inserimos o grupo 2 (pericárdios sem critérios de aprovação para confecção de bioprótese) com o intuito de avaliar se o pericárdio bovino decelularizado teria comportamento físico comparável ao pericárdio de mau padrão caso se mostrasse inferior ao pericárdio convencional aprovado.

O critério “espessura” mostrou semelhança entre os três grupos, com $n = 0,117$. Esta é uma primeira evidência de que o processo químico de decelularização não afetou a qualidade da rede de colágeno e elastina. Esse resultado contrapõe-se a relatos anteriores que mostraram alteração da espessura dos pericárdios tratados por outras técnicas como já mencionamos.

A elongação definida como a deformação sofrida pelo corpo de prova até a ruptura mostrou-se semelhante entre os três grupos ($p=0,416$).

Esse dado fala igualmente a favor da manutenção da qualidade do pericárdio tratado e que a elasticidade do mesmo não foi afetada pelo tratamento.

A tensão de ruptura e o índice de tenacidade mostraram-se superiores para o pericárdio bovino convencional de bom padrão, sendo que o pericárdio decelularizado foi comparável àquele de mau padrão. Esse dado é conflitante tendo em vista que a espessura e a tensão de ruptura tem uma correlação linear, ou seja, quanto maior a espessura do material, tanto maior a tensão necessária para rompê-lo. No entanto, acreditamos que essa variação seja devida à retirada dos componentes celulares que mesmo incompletamente fixados, auxiliam na resistência do tecido, sem afetar a espessura da malha. Essa hipótese é corroborada pelo achado do índice de tenacidade. A tenacidade é a energia necessária para romper o tecido. Esta se mostrou superior para o grupo I em relação aos outros dois, e os grupos II e III tiveram comportamento semelhante.

E finalmente, e mais importante, a temperatura de encolhimento foi semelhante para os grupos I e III. Esta variável expressa a qualidade da técnica de reticulação do pericárdio e a resistência do mesmo após o processamento. Assim, ainda que a tração e a tenacidade tenham sido superiores para o grupo I, a resistência final dos pericárdios não foi afetada.

É importante notar que estes testes físicos são preliminares no estudo da qualidade do biomaterial e da prótese com ele confeccionada. A informação que eles nos trazem é que o pericárdio apresenta critérios mínimos de resistência, sendo possível então prosseguir na avaliação física

do material estudado com os testes hidrodinâmicos em laboratório e hemodinâmicos em animais antes de se aventar a possibilidade da aplicação clínica.

Concluída esta parte do estudo, avaliamos a capacidade de gerar resposta inflamatória e calcificação em modelo experimental com ratos.

Em nosso material, identificamos presença de atividade inflamatória e formação granulomatosa já nos explantes de 7 dias. Padrão semelhante foi observado nos grupos de animais sacrificados nos períodos posteriores. E não encontramos qualquer vestígio de calcificação nos espécimes dos dois grupos em todos os períodos de explante. Apesar do achado de ausência de calcificação no material de controle ter sido inesperado, resultado semelhante também foi encontrado por Marina Maizato no Instituto do Coração / FMUSP em estudo comparativo entre o pericárdio bovino liofilizado e o pericárdio bovino convencional (comunicação verbal).

Observamos que os resultados encontrados na literatura não são homogêneos. De um modo geral, observa-se atividade inflamatória e início da deposição de cálcio com 2 a 3 semanas e calcificação importante com 10 a 12 semanas nos pericárdios frescos e tratados com glutaraldeído^{70,71,72,73,74}. Porém, Chanda et al.⁷³ relatam início de calcificação com 11 semanas nos pericárdios frescos e Grabenwöger et al.⁵⁷ descrevem em seu material, calcificação importante com 3 semanas e desintegração dos fragmentos com 12 semanas.

A razão para isso talvez se deva ao fato de que os modelos experimentais em ratos para avaliação de inflamação e calcificação não obedecem qualquer padrão. Encontramos modelos com ratos Wistar, Sprague-Dawley, Lewis, WAG-Ry, Brown Norway, machos, fêmeas, com pesos de 50-60 g até 350 g. As técnicas de implante variam desde inserção de um até quatro fragmentos de pericárdio tanto no espaço subcutâneo ventral quanto dorsal. O modelo em ratos tem sido tradicional na avaliação de biomateriais, mas a nosso ver, não há dúvida que tal heterogeneidade leve a vieses nos resultados observados, não sendo possível a comparação entre as diversas experiências.

Na atualidade, os estudos pré-clínicos *in vivo* para avaliação de biomateriais utilizados em prótese valvar limitam-se aos modelos em ratos e ovelhas jovens⁷⁰. Aparentemente, os modelos em ratos tendem a mostrar maior calcificação em relação àquele em ovelhas, mesmo levando-se em conta o contato da bioprótese com o sangue e com elementos de defesa neste último^{70,71}. Essas discrepâncias podem ser explicadas pelas características genéticas e do metabolismo mineral em cada espécie. Desta forma, o uso de roedores poderia nos servir como uma triagem simples e inicial para teste de biocompatibilidade, desde que a técnica de experimentação fosse padronizada, o que não acontece. Já o modelo em ovelhas, mostra-se como a estratégia mais adequada de avaliação, porém a complexidade e o alto custo desses experimentos os tornam muitas vezes proibitivos. A maioria dos pesquisadores tenta evitá-los, preferindo estudar a calcificação com implante subcutâneo em ratos, o que obviamente submete

o biomaterial a um ambiente completamente diferente daquele encontrado em animais superiores. E mesmo levando-se em conta a superioridade do modelo em caprinos, a extrapolação de resultados para humanos deve ser feita com parcimônia. É preciso fazer referência à experiência recente com o Synergraft, na qual o estudo, em modelo experimental com ovelhas, elegantemente conduzido, levou a resultados surpreendentes acerca da prótese avaliada^{12,13}. Porém, o ensaio clínico inicial em crianças mostrou-se desastroso, com óbito precoce de três pacientes e interrupção do trabalho⁴⁰. Assim, várias questões ainda precisam ser avaliadas com mais cuidado e aguardam ser respondidas. Os modelos de avaliação pré-clínicos utilizados atualmente são adequados? Em virtude da complexidade e do custo da experimentação, tem-se preferido a simplicidade. Mas, será que uma das dificuldades em se encontrar esse material ideal para a confecção de biopróteses reside no fato de estarmos partindo de premissas incorretas?

É provável que nos próximos anos, o olhar da pesquisa esteja dirigido não só para a qualidade do enxerto, mas também para a forma de avaliá-lo e para as características do receptor.

Com relação aos testes de durabilidade acelerada e perfil hidrodinâmico, encontramos desempenho semelhante entre as 4 próteses. Realizamos o estudo de três BPDC contra um controle de PBC como preconizado pelas normas descritas. As próteses foram aceleradas a 60, 70, 80, 90 e 100 bpm a cada 50×10^6 de ciclos para avaliação de desempenho e o teste foi interrompido a 150×10^6 ciclos. No entanto, por uma questão de clareza, exibimos apenas os resultados a 80 bpm (frequência média) e a 100

bpm (frequência mais acelerada). Para as variáveis analisadas não houve diferença global entre as biopróteses em nenhum dos ciclos, e as variações exibidas graficamente foram atribuídas ao acaso. É digno de nota que em nosso projeto piloto, utilizamos duas próteses de pericárdio bovino decelularizado que foram submetidas à durabilidade acelerada com tempo superior a 300×10^6 de ciclos e que mantiveram sua integridade estrutural macro e microscópica à semelhança das BPDC aqui avaliadas. E além da resistência demonstrada, a avaliação de desempenho nos mostra que as BPDC não tiveram alteração de elasticidade ou movimentação de folhetos, assim como mantiveram boa abertura o que nos é exibido pelas curvas fluxo, pressão e abertura orifical. Assim, apesar de não ser possível fazer qualquer afirmação de modo definitivo sobre a qualidade da BPDC, tomamos o estudo hidrodinâmico como uma avaliação exploratória inicial e cujo resultado nos aponta para um campo de pesquisa promissor. Posteriormente, estes achados precisam ser confirmados por experimentação em modelo animal para avaliação do desempenho *in vivo*.

Finalmente, a avaliação dos folhetos retirados das biopróteses confirmou a ausência de celularidade nas amostras de PBDC e mostrou padrão habitual da rede de colágeno e elastina, não havendo diferença significativa entre os grupos.

5.1. Considerações Finais

Com vista nos resultados obtidos, ainda que haja algumas discrepâncias isoladas, consideramos o desempenho entre os dois tipos de pericárdio semelhante, tanto na avaliação do tecido isolado quanto como bioprótese. É bem verdade, no entanto, que este estudo faz parte de uma das etapas da avaliação de novos tecidos ou novas técnicas de confecção de uma prótese valvar cardíaca. Não é possível fazer qualquer generalização ou extrapolação sobre a prótese de pericárdio bovino decelularizado apenas a partir dos resultados encontrados. Nossos achados atestam a qualidade do biomaterial avaliado e o comportamento comparável dos dois tecidos, o que nos autoriza a partir para a etapa seguinte. Esta consistirá de estudo experimental *in vivo* em animais superiores, seja o cão, o porco ou o carneiro, nos quais poderemos analisar o comportamento das próteses em contato com o meio sangüíneo e em condições mais próximas àquelas encontradas no ser humano, ainda que tais modelos não sejam ideais como já discutido. No entanto, consistem em etapa fundamental da avaliação pré-clínica, sem a qual não é possível partir para a etapa final de estudo *in anima nobili*.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

1. A resistência física do pericárdio bovino decelularizado evidenciou:
 - a. diferença significativa entre o pericárdio bovino convencional e o decelularizado com relação às variáveis tensão de ruptura e índice de tenacidade.
 - b. ausência de diferença entre os grupos de pericárdio com relação às variáveis espessura, elongação e temperatura de encolhimento.
2. A capacidade de gerar resposta inflamatória do pericárdio decelularizado *in vivo* não apresentou diferença com relação ao pericárdio convencional.
3. As biopróteses de pericárdio decelularizado não apresentaram comportamento hidrodinâmico diferente daquele da bioprótese confeccionada com pericárdio bovino convencional.

7. ANEXOS

ANEXO 1

- Solução de limpeza:

Para limpeza do pericárdio bovino é utilizada solução de NaCl com MgSO₄ 8mOsm, tamponada, pH 7,4, com tampão fosfato 0,13 M.

1. Solução hipertônica de Cloreto de Sódio a 12 g%

NaCl p.a. (Merck).....1,2 g

H₂O q.s.p.....1000 ml

2. Solução de Sulfato de Magnésio (mãe)

MgSO₄ 7 H₂O (Merck).....100 g

H₂O q.s.p.....1000 ml

3. Solução de Sulfato de Magnésio a mOsm

Solução Sulf. Mag. (mãe).....10 ml

Sol. hipertônica NaCl q.s.p.....1000 ml

4. Solução de Fosfato Monoácido Dissódico 0,13 M

Na₂HPO₄ (Merck).....18,45 g

H₂O dest. q.s.p.....1000 ml

- Solução de fixação:

1. Solução de GTA a 25% purificada

Sol. GTA a 25%.....1000 ml
 Carvão ativado p.a.100 mg
 Agitação magnética por 1 h. Filtrar.

A esta, posteriormente serão acrescidas as soluções abaixo:

2. Solução de Fosfato Monoácido Dissódico a 0,13 M

3. Solução de Fosfato de Potássio 0,13 M

KH_2O_417,70 g

H_2O dest. q.s.p.1000 ml

4. Solução Tampão de Fosfato

Na_2HPO_4 0,13 M.....700 ml

KH_2PO_4 0,13 M.....200 ml

- Solução conservante

Os pericárdios foram acondicionados em solução de formaldeído a 4% tamponada a pH 5,4 com acetato de sódio 0,2 M na seguinte formulação:

1. Solução de Formaldeído a 4%

Formol a 35% (Merck).....114 ml

H_2O dest. q.s.p.....1000 ml

2. Solução de Acetato de Sódio a 0,2 M

Acetato de sódio $3\text{H}_2\text{O}$27,21 g

H_2O dest. q.s.p.....1000 ml

3. Purificação da Solução de Formaldeído

Sol. Formaldeído a 4% tamponada a pH 5,4 com acetato de sódio 0,2 M 1000 ml

Carvão ativado (Merck).....10 g

Agitação magnética por 1 h. Filtrar.

Anexo 2

Medidas descritivas e comparação dos grupos quanto aos testes de tração e encolhimento.

	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP	p
Espessura	1	10	.23	.42	.34	.33	.07	
	2	10	.27	.50	.38	.38	.07	0.117
	3	10	.31	.47	.38	.39	.05	
Tensão de ruptura	1	10	2.06	3.72	2.90	^Y 2.93	.57	
	2	10	.49	5.43	1.16	1.49	1.43	<0.001
	3	10	.64	1.57	.91	.99	.33	
Elongação	1	10	14.70	28.50	18.70	19.38	4.34	
	2	10	9.40	27.20	16.05	17.42	6.52	0.416
	3	10	13.10	31.50	17.95	21.09	7.08	
Índice de Tenacidade	1	10	20.80	38.97	27.62	^Y 27.88	5.90	
	2	10	3.57	17.05	8.30	9.04	4.40	<0.001
	3	10	5.40	24.72	8.99	10.62	5.87	
Temperatura	1	10	86.50	93.60	87.45	88.49	2.13	
	2	0	.00	.00	.00	.00	.00	0.140*
	3	10	85.40	89.90	87.10	87.20	1.57	

DP: desvio padrão

p: nível descritivo da análise de variância

p*: nível descritivo do teste t de Student para amostras independentes

^Y: diferença significativa dos demais grupos através das comparações múltiplas pelo teste de Tukey

Anexo 3:

Avaliação descritiva dos parâmetros hemodinâmicos a 80 bpm.

Avaliação descritiva dos valores de fração de ejeção a 80 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Fração de ejeção	braile	0	5	89,70	92,38	91,11	91,31	1,08
		50	5	85,15	89,29	88,05	87,74	1,56
		100	5	90,97	94,16	92,49	92,50	1,16
		150	5	91,47	95,69	93,18	93,43	1,52
	desc1	0	5	86,42	91,93	89,04	89,31	2,02
		50	5	89,18	91,55	89,54	89,89	0,97
		100	5	88,72	94,61	93,38	92,56	2,28
		150	5	91,18	94,56	92,14	92,47	1,32
	desc2	0	5	87,81	92,21	90,54	90,49	1,67
		50	5	87,54	92,74	89,51	89,71	1,90
		100	5	90,80	92,73	92,00	91,70	0,86
		150	5	90,94	95,95	93,63	93,49	1,96
	desc3	0	5	88,24	90,60	89,67	89,38	1,02
		50	5	87,52	92,39	91,21	90,67	1,85
		100	5	90,06	94,75	92,63	92,33	1,79
		150	5	92,10	94,79	93,51	93,45	0,96

Avaliação descritiva dos valores de débito cardíaco a 80 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Débito cardíaco	braile	0	5	7,17	7,31	7,21	7,22	0,05
		50	5	6,94	7,28	7,16	7,13	0,13
		100	5	7,39	7,54	7,41	7,44	0,06
		150	5	7,38	7,86	7,62	7,62	0,17
	desc1	0	5	7,08	7,48	7,14	7,25	0,20
		50	5	7,20	7,44	7,22	7,27	0,10
		100	5	7,37	7,83	7,67	7,64	0,17
		150	5	7,27	7,60	7,37	7,39	0,13
	desc2	0	5	7,13	7,52	7,35	7,35	0,14
		50	5	7,09	7,53	7,24	7,27	0,16
		100	5	7,43	7,67	7,46	7,49	0,10
		150	5	7,31	7,68	7,52	7,52	0,15
	desc3	0	5	7,16	7,41	7,26	7,27	0,11
		50	5	7,08	7,59	7,41	7,39	0,19
		100	5	7,21	7,53	7,40	7,38	0,13
		150	5	7,37	7,56	7,50	7,49	0,07

Avaliação descritiva dos valores de duração do ciclo valvar a 80 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Duração do ciclo valvar	braile	0	5	0,65	0,86	0,72	0,74	0,10
		50	5	0,65	0,78	0,73	0,72	0,05
		100	5	0,71	0,81	0,73	0,75	0,04
		150	5	0,61	0,74	0,65	0,66	0,06
	desc1	0	5	0,59	0,87	0,72	0,71	0,11
		50	5	0,67	0,74	0,73	0,71	0,04
		100	5	0,69	0,78	0,72	0,72	0,03
		150	5	0,72	0,76	0,75	0,75	0,02
	desc2	0	5	0,69	0,81	0,73	0,74	0,05
		50	5	0,71	0,78	0,74	0,74	0,03
		100	5	0,62	0,72	0,71	0,69	0,04
		150	5	0,60	0,81	0,76	0,72	0,10
	desc3	0	5	0,69	0,76	0,74	0,74	0,03
		50	5	0,73	0,74	0,73	0,73	0,01
		100	5	0,61	0,71	0,69	0,66	0,05
		150	5	0,69	0,80	0,73	0,74	0,04

Avaliação descritiva dos valores de fase de fluxo a 80 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
F. fluxo	braile	0	5	55,14	58,60	56,20	56,53	1,34
		50	5	46,91	56,16	52,33	52,08	3,87
		100	5	51,88	60,81	58,09	56,76	3,46
		150	5	55,74	69,87	59,13	60,90	5,52
	desc1	0	5	52,40	71,04	54,77	58,71	7,65
		50	5	47,81	60,87	49,64	52,27	5,61
		100	5	47,78	69,14	62,07	59,72	8,86
		150	5	48,25	62,86	51,48	53,73	6,31
	desc2	0	5	52,90	66,89	58,40	59,90	5,28
		50	5	46,93	53,36	49,10	49,93	2,63
		100	5	59,48	60,22	60,15	59,98	0,30
		150	5	58,10	73,45	63,70	64,01	6,26
	desc3	0	5	48,38	55,79	51,94	51,76	2,96
		50	5	46,55	49,10	48,55	48,22	1,02
		100	5	62,03	73,57	65,38	67,62	5,42
		150	5	48,58	57,98	53,00	53,48	3,77

Avaliação descritiva dos valores de fluxo médio medido a 80 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Fluxo médio	braile	0	5	11,28	15,07	13,77	13,24	1,72
		50	5	12,03	14,88	14,74	14,13	1,21
		100	5	11,63	15,01	13,09	13,18	1,22
		150	5	13,01	15,42	13,46	14,01	1,18
	desc1	0	5	10,34	15,38	12,94	13,06	1,82
		50	5	13,14	15,33	14,93	14,59	0,86
		100	5	11,19	15,47	12,97	13,10	1,57
		150	5	12,09	15,17	15,02	14,01	1,48
	desc2	0	5	10,19	13,14	12,91	12,34	1,23
		50	5	13,28	15,15	14,73	14,58	0,77
		100	5	12,61	15,00	13,04	13,33	0,97
		150	5	10,76	13,65	12,77	12,32	1,19
	desc3	0	5	12,82	15,06	14,52	14,16	0,94
		50	5	15,10	15,51	15,38	15,36	0,17
		100	5	12,28	12,54	12,48	12,44	0,11
		150	5	13,03	15,45	14,08	14,30	1,08

Avaliação descritiva dos valores de pressão média medida a 80 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Pressão média	braile	0	5	4,79	7,41	6,37	6,20	1,20
		50	5	3,26	6,16	4,00	4,31	1,09
		100	5	3,51	4,80	4,08	4,13	0,46
		150	5	3,85	5,19	4,23	4,47	0,56
	desc1	0	5	3,14	5,53	4,52	4,45	0,87
		50	5	4,72	5,56	5,40	5,29	0,33
		100	5	4,93	6,82	5,22	5,56	0,77
		150	5	3,74	4,91	4,46	4,45	0,45
	desc2	0	5	3,23	4,35	4,18	4,03	0,46
		50	5	3,62	4,24	4,00	3,96	0,28
		100	5	3,65	4,71	4,10	4,14	0,38
		150	5	4,04	6,96	5,92	5,72	1,07
	desc3	0	5	4,12	5,32	4,63	4,66	0,44
		50	5	4,09	4,69	4,26	4,30	0,24
		100	5	3,52	3,71	3,57	3,59	0,08
		150	5	4,29	5,47	5,15	4,89	0,52

Avaliação descritiva dos valores de volume de fechamento a 80 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Volume de fechamento	braile	0	5	6,95	9,12	8,22	8,19	0,87
		50	5	2,91	6,51	5,46	4,92	1,42
		100	5	3,64	4,98	4,01	4,24	0,56
		150	5	3,19	7,06	6,00	5,44	1,52
	desc1	0	5	3,42	10,36	6,23	7,11	2,97
		50	5	5,81	7,39	6,15	6,52	0,77
		100	5	4,10	7,92	6,83	6,25	1,47
		150	5	3,93	6,04	5,22	5,07	0,80
	desc2	0	5	5,58	6,98	6,49	6,39	0,53
		50	5	4,76	7,48	5,69	5,98	1,07
		100	5	4,05	9,37	5,05	5,72	2,11
		150	5	4,26	5,24	4,80	4,80	0,36
	desc3	0	5	7,69	10,33	8,39	8,62	1,04
		50	5	3,24	7,89	4,74	5,09	1,71
		100	5	2,94	4,65	3,18	3,44	0,70
		150	5	4,98	7,72	5,55	5,88	1,09

Avaliação descritiva dos valores de volume de vazamento a 80 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Volume de vazamento	braile	0	5	0,30	1,60	1,00	0,96	0,49
		50	5	0,36	3,37	2,20	1,84	1,23
		100	5	0,53	1,75	1,59	1,30	0,52
		150	5	0,16	0,91	0,52	0,49	0,29
	desc1	0	5	0,10	3,52	0,50	0,96	1,44
		50	5	0,51	2,44	1,53	1,50	0,81
		100	5	0,00	1,79	0,59	0,77	0,80
		150	5	0,49	1,74	0,89	0,96	0,47
	desc2	0	5	0,40	2,58	0,95	1,10	0,87
		50	5	0,55	3,55	1,75	1,85	1,09
		100	5	0,01	1,25	0,72	0,61	0,51
		150	5	0,09	0,81	0,43	0,41	0,28
	desc3	0	5	0,45	2,06	1,36	1,20	0,66
		50	5	1,76	2,57	2,22	2,16	0,32
		100	5	0,08	0,79	0,12	0,35	0,34
		150	5	0,66	1,92	0,78	1,08	0,54

Avaliação descritiva dos valores de fração regurgitante a 80 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Fração regurgitante	braile	0	5	7,95	10,47	8,94	9,16	1,19
		50	5	3,72	8,83	6,88	6,75	1,92
		100	5	4,63	6,28	5,51	5,54	0,60
		150	5	3,34	7,58	6,28	5,92	1,62
	desc1	0	5	6,11	10,86	6,94	8,07	2,21
		50	5	6,31	9,51	8,58	8,02	1,38
		100	5	5,50	9,71	6,90	7,03	1,61
		150	5	4,90	7,19	5,70	6,03	0,92
	desc2	0	5	5,97	9,56	7,55	7,48	1,34
		50	5	6,19	11,03	7,34	7,83	1,86
		100	5	4,94	9,38	5,32	6,33	1,85
		150	5	4,35	5,78	5,16	5,21	0,59
	desc3	0	5	8,40	11,69	9,38	9,82	1,27
		50	5	5,00	10,22	7,01	7,25	1,89
		100	5	3,13	4,77	3,59	3,79	0,62
		150	5	5,92	8,51	6,59	6,96	1,04

Avaliação descritiva dos valores de área efetiva do orifício a 80 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Área efetiva do orifício	braile	0	5	1,65	1,79	1,74	1,72	0,06
		50	5	1,84	2,42	2,33	2,22	0,24
		100	5	2,01	2,21	2,06	2,09	0,08
		150	5	2,04	2,20	2,14	2,14	0,06
	desc1	0	5	1,89	2,11	2,02	2,00	0,08
		50	5	1,95	2,10	2,08	2,05	0,06
		100	5	1,63	1,91	1,81	1,79	0,10
		150	5	1,95	2,32	2,21	2,15	0,15
	desc2	0	5	1,83	2,61	2,01	2,10	0,30
		50	5	2,26	2,44	2,38	2,37	0,07
		100	5	2,03	2,23	2,12	2,12	0,08
		150	5	1,35	1,70	1,52	1,54	0,14
	desc3	0	5	2,04	2,19	2,11	2,12	0,06
		50	5	2,30	2,46	2,41	2,39	0,06
		100	5	2,07	2,16	2,12	2,12	0,03
		150	5	2,00	2,18	2,10	2,09	0,07

Avaliação descritiva dos valores de índice de eficiência a 80 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Índice de eficiência	braile	0	5	0,29	0,31	0,29	0,29	0,01
		50	5	0,31	0,41	0,38	0,37	0,04
		100	5	0,36	0,38	0,37	0,37	0,01
		150	5	0,36	0,39	0,37	0,37	0,02
	desc1	0	5	0,34	0,38	0,36	0,35	0,02
		50	5	0,33	0,35	0,34	0,34	0,01
		100	5	0,30	0,33	0,32	0,32	0,01
		150	5	0,34	0,38	0,37	0,37	0,01
	desc2	0	5	0,35	0,37	0,37	0,36	0,01
		50	5	0,37	0,41	0,39	0,39	0,01
		100	5	0,35	0,39	0,37	0,37	0,01
		150	5	0,24	0,31	0,29	0,28	0,02
	desc3	0	5	0,34	0,36	0,35	0,35	0,01
		50	5	0,36	0,40	0,39	0,39	0,02
		100	5	0,38	0,40	0,39	0,39	0,01
		150	5	0,34	0,37	0,35	0,35	0,01

Anexo 4

Avaliação descritiva dos parâmetros hemodinâmicos a 100 bpm.

Avaliação descritiva dos valores de fração de ejeção a 100 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Fração de ejeção	braile	0	5	87,51	89,63	88,42	88,53	0,82
		50	5	87,01	89,12	87,85	87,88	0,78
		100	5	90,20	93,72	92,20	92,10	1,42
		150	5	90,36	95,33	92,18	92,44	1,83
	desc1	0	5	85,80	89,55	87,71	87,55	1,59
		50	5	84,87	88,50	87,52	86,77	1,71
		100	5	91,89	93,85	92,77	92,71	0,75
		150	5	91,28	95,22	94,00	93,59	1,59
	desc2	0	5	87,72	91,32	88,22	88,77	1,46
		50	5	86,51	88,90	87,66	87,80	0,89
		100	5	88,39	93,67	91,63	91,10	2,20
		150	5	91,24	94,78	92,90	92,72	1,38
	desc3	0	5	87,97	88,99	88,83	88,56	0,48
		50	5	86,38	89,34	88,45	88,26	1,12
		100	5	88,29	93,84	91,87	91,41	2,01
		150	5	91,28	95,25	93,04	93,07	1,52

Avaliação descritiva dos valores de débito a 100 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Débito cardíaco	braile	0	5	8,65	8,92	8,80	8,79	0,11
		50	5	8,62	8,76	8,71	8,69	0,06
		100	5	9,23	9,53	9,33	9,37	0,11
		150	5	9,04	9,53	9,21	9,25	0,20
	desc1	0	5	8,40	9,00	8,73	8,70	0,22
		50	5	8,41	8,77	8,67	8,60	0,15
		100	5	9,19	9,34	9,24	9,26	0,06
		150	5	5,52	5,98	5,69	5,75	0,21
	desc2	0	5	8,69	9,13	8,78	8,83	0,17
		50	5	8,65	8,81	8,76	8,75	0,06
		100	5	8,88	9,37	9,12	9,12	0,20
		150	5	8,96	9,47	9,37	9,31	0,21
	desc3	0	5	8,72	8,85	8,78	8,78	0,05
		50	5	8,56	8,89	8,85	8,79	0,14
		100	5	8,64	9,15	9,07	8,99	0,21
		150	5	8,93	9,57	9,39	9,30	0,25

Avaliação descritiva dos valores de duração do ciclo a 100 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Duração do ciclo valvar	braile	0	5	0,53	0,65	0,57	0,58	0,05
		50	5	0,59	0,65	0,60	0,61	0,02
		100	5	0,52	0,63	0,59	0,59	0,04
		150	5	0,53	0,65	0,61	0,61	0,05
	desc1	0	5	0,50	0,65	0,57	0,57	0,06
		50	5	0,54	0,63	0,59	0,59	0,03
		100	5	0,52	0,63	0,59	0,58	0,04
		150	5	0,73	1,05	0,92	0,91	0,12
	desc2	0	5	0,49	0,65	0,59	0,59	0,06
		50	5	0,58	0,62	0,61	0,60	0,02
		100	5	0,54	0,64	0,59	0,59	0,04
		150	5	0,50	0,60	0,57	0,56	0,04
	desc3	0	5	0,57	0,62	0,60	0,60	0,02
		50	5	0,59	0,61	0,60	0,60	0,01
		100	5	0,55	0,68	0,61	0,62	0,05
		150	5	0,51	0,62	0,61	0,59	0,05

Avaliação descritiva dos valores de fase de fluxo a 100 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
F. fluxo	braile	0	5	53,81	65,69	56,38	58,05	4,78
		50	5	50,00	54,35	50,22	51,41	1,95
		100	5	51,36	65,64	59,15	59,14	5,22
		150	5	53,91	63,32	55,00	57,44	4,13
	desc1	0	5	49,79	71,96	58,54	58,04	9,09
		50	5	48,68	58,13	51,06	51,57	3,84
		100	5	59,15	71,79	62,90	64,36	4,86
		150	5	47,83	75,37	55,33	59,93	11,80
	desc2	0	5	53,64	63,39	54,92	56,37	3,98
		50	5	48,93	50,23	49,78	49,65	0,47
		100	5	52,50	69,65	58,08	60,73	7,22
		150	5	59,82	72,04	62,79	63,89	4,98
	desc3	0	5	49,33	52,36	51,07	50,94	1,08
		50	5	47,79	49,78	48,88	48,85	0,77
		100	5	56,68	68,78	63,51	63,26	4,32
		150	5	49,57	65,80	58,55	58,18	5,92

Avaliação descritiva dos valores de fluxo médio medido a 100 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Fluxo médio	braile	0	5	14,52	16,95	15,77	15,74	1,14
		50	5	15,50	17,75	17,49	16,84	1,08
		100	5	15,17	18,17	15,30	15,95	1,27
		150	5	15,11	17,14	15,74	16,06	0,96
	desc1	0	5	14,82	17,09	16,02	16,01	0,85
		50	5	16,59	17,54	17,20	17,07	0,39
		100	5	14,77	15,19	15,02	14,99	0,15
		150	5	9,52	11,67	10,40	10,59	1,03
	desc2	0	5	14,79	17,41	17,02	16,28	1,24
		50	5	17,30	17,76	17,69	17,58	0,20
		100	5	14,73	15,95	15,65	15,45	0,50
		150	5	15,12	16,50	15,50	15,61	0,53
	desc3	0	5	16,80	18,04	17,36	17,41	0,61
		50	5	17,83	18,44	18,00	18,09	0,25
		100	5	12,19	14,76	14,66	14,16	1,11
		150	5	15,28	18,18	15,80	16,33	1,20

Avaliação descritiva dos valores de pressão média medida a 100 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Pressão média	braile	0	5	7,29	8,72	8,14	7,95	0,62
		50	5	4,72	5,37	5,18	5,07	0,32
		100	5	5,17	6,40	5,30	5,54	0,51
		150	5	4,98	6,27	5,34	5,47	0,55
	desc1	0	5	5,22	6,10	5,83	5,77	0,36
		50	5	5,44	6,02	5,75	5,73	0,26
		100	5	5,77	5,91	5,85	5,85	0,06
		150	5	2,45	3,43	2,96	2,91	0,41
	desc2	0	5	5,26	6,82	6,25	6,08	0,75
		50	5	5,20	5,46	5,29	5,33	0,12
		100	5	4,81	6,02	5,12	5,29	0,50
		150	5	7,24	8,19	7,47	7,57	0,39
	desc3	0	5	4,97	5,79	5,60	5,52	0,33
		50	5	5,36	5,57	5,46	5,46	0,08
		100	5	3,95	4,97	4,77	4,64	0,40
		150	5	5,72	7,24	6,15	6,26	0,62

Avaliação descritiva dos valores de volume de fechamento a 100 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Volume de fechamento	braile	0	5	2,99	6,41	4,03	4,32	1,27
		50	5	5,49	7,44	6,23	6,47	0,81
		100	5	2,44	4,91	3,71	3,73	1,04
		150	5	1,30	3,93	2,76	2,72	0,97
	desc1	0	5	2,27	6,59	4,20	4,41	1,55
		50	5	5,62	12,46	5,88	7,52	2,94
		100	5	4,00	4,92	4,11	4,31	0,39
		150	5	5,85	7,74	7,46	6,90	0,95
	desc2	0	5	5,53	8,62	6,21	6,53	1,22
		50	5	4,45	6,26	5,63	5,51	0,66
		100	5	2,58	4,67	2,68	3,40	1,07
		150	5	3,45	5,20	4,20	4,34	0,73
	desc3	0	5	5,73	9,64	6,57	7,34	1,69
		50	5	2,74	8,66	4,95	5,16	2,21
		100	5	2,82	4,04	3,73	3,52	0,56
		150	5	3,56	5,90	4,61	4,62	0,84

Avaliação descritiva dos valores de volume de vazamento a 100 bpm em cada ciclo

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Volume de vazamento	braile	0	5	0,09	1,85	0,43	0,76	0,77
		50	5	0,18	1,27	0,89	0,76	0,41
		100	5	0,15	1,68	0,81	0,87	0,67
		150	5	0,18	0,68	0,53	0,46	0,22
	desc1	0	5	0,13	1,71	0,31	0,65	0,68
		50	5	0,07	2,06	1,62	1,24	0,93
		100	5	0,19	0,78	0,44	0,49	0,27
		150	5	0,17	2,07	0,84	0,90	0,73
	desc2	0	5	0,30	1,28	0,52	0,75	0,46
		50	5	0,92	2,63	1,64	1,80	0,69
		100	5	0,02	1,04	0,20	0,39	0,44
		150	5	0,04	0,64	0,41	0,40	0,23
	desc3	0	5	0,35	1,98	0,85	0,96	0,61
		50	5	0,08	0,77	0,32	0,37	0,27
		100	5	0,02	0,57	0,18	0,24	0,21
		150	5	0,17	1,37	0,48	0,60	0,46

Avaliação descritiva dos valores de fração regurgitante a 100 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Fração regurgitante	braile	0	5	3,15	8,26	4,71	5,08	1,93
		50	5	6,76	7,97	7,12	7,22	0,47
		100	5	2,59	6,33	4,89	4,60	1,45
		150	5	1,59	4,46	3,36	3,19	1,03
	desc1	0	5	2,40	8,30	4,48	5,06	2,17
		50	5	6,31	12,54	7,68	8,77	2,52
		100	5	4,23	5,69	4,77	4,80	0,57
		150	5	6,05	9,53	8,41	7,80	1,54
	desc2	0	5	6,30	9,14	6,73	7,28	1,13
		50	5	6,09	8,63	7,15	7,31	1,06
		100	5	2,64	5,51	3,23	3,79	1,32
		150	5	3,81	5,61	4,54	4,73	0,78
	desc3	0	5	6,58	9,99	8,18	8,31	1,37
		50	5	2,82	8,86	5,27	5,53	2,25
		100	5	2,96	4,61	3,91	3,75	0,73
		150	5	3,73	6,28	5,30	5,22	1,01

Avaliação descritiva dos valores de área efetiva do orifício a 100 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Área efetiva do orifício	braile	0	5	1,73	1,89	1,79	1,80	0,07
		50	5	2,30	2,52	2,44	2,42	0,09
		100	5	2,13	2,32	2,17	2,19	0,07
		150	5	2,19	2,29	2,21	2,22	0,04
	desc1	0	5	2,02	2,29	2,16	2,16	0,12
		50	5	2,28	2,33	2,31	2,31	0,02
		100	5	1,96	2,02	2,01	2,00	0,03
		150	5	1,93	2,12	2,00	2,01	0,08
	desc2	0	5	2,08	2,25	2,11	2,13	0,07
		50	5	2,39	2,50	2,47	2,46	0,04
		100	5	2,10	2,23	2,16	2,17	0,06
		150	5	1,81	1,87	1,82	1,83	0,03
	desc3	0	5	2,32	2,44	2,42	2,40	0,05
		50	5	2,46	2,55	2,50	2,50	0,04
		100	5	1,98	2,18	2,15	2,12	0,08
		150	5	2,02	2,18	2,13	2,11	0,07

Avaliação descritiva dos valores de índice de eficiência a 100 bpm em cada ciclo.

Variável	Grupo	Ciclo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Índice de eficiência	braile	0	5	0,31	0,34	0,33	0,33	0,01
		50	5	0,41	0,42	0,42	0,42	0,01
		100	5	0,37	0,39	0,38	0,38	0,01
		150	5	0,39	0,41	0,41	0,40	0,01
	desc1	0	5	0,38	0,40	0,40	0,39	0,01
		50	5	0,36	0,40	0,39	0,38	0,02
		100	5	0,36	0,37	0,37	0,37	0,00
		150	5	0,32	0,35	0,34	0,34	0,01
	desc2	0	5	0,37	0,39	0,38	0,38	0,01
		50	5	0,35	0,42	0,41	0,40	0,03
		100	5	0,37	0,42	0,41	0,40	0,02
		150	5	0,32	0,34	0,33	0,33	0,01
	desc3	0	5	0,40	0,41	0,40	0,41	0,01
		50	5	0,38	0,42	0,39	0,40	0,02
		100	5	0,40	0,41	0,40	0,40	0,00
		150	5	0,36	0,38	0,38	0,37	0,01

Anexo 5

Prótese Biológica Cardíaca PBC

Achados microscópicos		PBDC 2 B	PBDC 2 M	PBDC 2 L
Diminuição da celularidade (células do tipo fibroblastos) (H.E.)		-	-	-
Fibras colágenas (T.G.)	Fragmentação	3+/3	-	-
	Variação de espessura	-	-	-
	Diminuição em número	-	-	-
	" Borramento" (degeneração)	-	-	-
	Aspecto "franjado"	1+/3	2+/3	2+/3
	Ondeameto preservado	3+/3	3+/3	2+/3
	Degeneração basofílica	1+/3	2+/3	1+/3
Fibras elásticas (Verhoeff)	Fragmentação	1+/3	1+/3	1+/3
	Variação de espessura	1+/3	1+/3	1+/3
	Espessamento focal	-	-	-
	Aspecto ramificado	-	-	-
	Diminuição em número	1+/3	-	-

Prótese Biológica Cardíaca PBDC 1

Achados microscópicos		PBDC 1 B	PBDC 1 M	PBDC 1 L
Diminuição da celularidade (células do tipo fibroblastos) (H.E.)		3+/3	3+/3	3+/3
Fibras colágenas (T.G.)	Fragmentação	-	2+/3	1+/3
	Variação de espessura	2+/3	2+/3	2+/3
	Diminuição em número	-	1+/3	-
	" Borramento" (degeneração)	2+/3	2+/3	1+/3
	Aspecto "franjado"	1+/3	1+/3	1+/3
	Ondeameto preservado	2+/3	2+/3	2+/3
	Degeneração basofílica	2+/3	1+/3	1+/3
Fibras elásticas (Verhoeff)	Fragmentação	2+/3	3+/3	3+/3
	Variação de espessura	2+/3	2+/3	1+/3
	Espessamento focal	-	-	-
	Aspecto ramificado	1+/3	1+/3	1+/3
	Diminuição em número	1+/3	2+/3	3+/3

Prótese Biológica Cardíaca PBDC2

Achados microscópicos		PBB B	PBB M	PBB L
Diminuição da celularidade (células do tipo fibroblastos) (H.E.)		3+/3	3+/3	3+/3
Fibras colágenas (T.G.)	Fragmentação	1+/3	-	1+/3
	Variação de espessura	1+/3	-	1+/3
	Diminuição em número	1+/3	1+/3	-
	" Borramento" (degeneração)	-	1+/3	1+/3
	Aspecto "franjado"	1+/3	1+/3	2+/3
	Ondeamento preservado	2+/3	2+/3	2+/3
	Degeneração basofílica	-	-	-
Fibras elásticas (Verhoeff)	Fragmentação	-	-	1+/3
	Variação de espessura	-	2+/3	1+/3
	Espessamento focal	-	-	-
	Aspecto ramificado	-	2+/3	1+/3
	Diminuição em número	-	-	-

Prótese Biológica Cardíaca PBDC 3

Achados microscópicos		PBDC 3 B	PBDC 3 M	PBDC 3 L
Diminuição da celularidade (células do tipo fibroblastos) (H.E.)		3+/3	3+/3	3+/3
Fibras colágenas (T.G.)	Fragmentação	2+/3	1+/3	1+/3
	Variação de espessura	3+/3	-	2+/3
	Diminuição em número	1+/3	-	1+/3
	" Borramento" (degeneração)	3+/3	1+/3	2+/3
	Aspecto "franjado"	3+/3	1+/3	2+/3
	Ondeamento preservado	1+/3	3+/3	2+/3
	Degeneração basofílica	-	-	-
Fibras elásticas (Verhoeff)	Fragmentação	2+/3	1+/3	1+/3
	Variação de espessura	1+/3	1+/3	1+/3
	Espessamento focal	-	-	-
	Aspecto ramificado	2+/3	1+/3	2+/3
	Diminuição em número	2+/3	3+/3	1+/3

***Referências
Bibliográficas***

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rahimtoola SH. Lessons learned about the determinants of the results of valve surgery. *Circulation*. 1988;78:1503-7.
2. Blomfield P, Wheatley DJ, Prescott RJ, Miller HC. Twelve-year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprosthesis. *New Engl J Med*. 1991;324:573-9.
3. Hammermeister KE, Sethi GK, Henderson WG, Oprian C, Kim T, Rahimtoola S. A comparison of outcomes in men 11 years after heart-valve replacement with a mechanical valve or bioprosthesis. *New Engl J Med*. 1993;328:1289-96.
4. Hammermeister KE, Sethi GK, Henderson WG, Oprian C, Grover FL. Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs Randomized Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:1152-8.

5. Peterseim DS, Cen YY, Cheruvu S, Landolfo K, Bashore TM, Lowe WG, et al. Long-term outcome after biologic versus mechanical aortic valve replacement in 841 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117:890-7.
6. Dahm M, Lyman WD, Schwell AB, Factor SM, Frater RWM. Immunogenicity of Glutaraldehyde-tanned bovine pericardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;99:1082-90.
7. Gong G, Seiffter E, Lyman WD, Factor SM, Blau S, Frater RWM. Bioprosthetic cardiac valve degeneration: role of inflammatory and immune reactions. *J Heart Valve Dis.* 1993;2:684-93.
8. 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;9:562-6.
9. Schoen FJ, Golomb G, Levy RJ. Calcification of bioprosthetic heart valves: a perspective on models. *J Heart Valve Dis.* 1992;1:110-4

10. Pelletier LC, Carrier M, Leclerc Y, Lepage G, deGuise P, Dyrta I. Porcine versus pericardial bioprosthesis: a comparison of late results in 1593 patients. *Ann Thorac Surg.* 1989;47:352-61.
11. Cunanan CM, Cabiling CM, Dinh TT, Shen S, Tran-Hata P, Rutledge III JH, Fishbein MC. Tissue characterization and calcification potential of commercial bioprosthetic heart valves. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:S417-21.
12. Elkins RC, Dawson PE, Goldstein S, Walsh SP, Black KS. Decellularized human valve allografts. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:S428-32.
13. O'Brien MF, Goldstein S, Walsh SP, Black KS, Elkins R, Clarke D. The Synergraft Valve: a new acellular (nonglutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Sem Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;11:194-200.
14. Grauss RW, Hazekamp MG, Vleit S, Gittenberg-de-Groot AC, DeRuiter MC. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126:2003-10.

15. Braile DM. Prótese valvular de pericárdio bovino: desenvolvimento e aplicação clínica em posição mitral [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; São Paulo;1990.
16. Murray G. Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology*. 1955;7:466-71.
17. Carpentier A, Deloche A, Relland J, Fabiani JN, Forman J, Camilleri JP et al. Six years follow-up of glutaraldehyde preserved heterografts with particular reference to the treatment of congenital valve malformations. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1974;68:771-82.
18. Jamieson WR, Munro AI, Miyagishima RT, Allen P, Burr LH, Tyers FO. Carpentier-Edwards Standard Porcine Bioprosthesis: clinical performance to seventeen years. *Ann Thorac Surg*. 1995;60:999-1007.
19. Ionescu MI. Tissue heart valves. London: Butterworths;1979.
20. Ionescu D, Pakrashi BC, Mary DAS. Long-term evaluation of tissue valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1974;68:361-79.

21. Ionescu MI, Tandon AP, Mary DAS, Abid A. Heart valve replacement with the Ionescu-Shiley pericardial xenograft. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1977;73:31-42.
22. Puig LB, Virginelli G, Belotti G, Kawabe L, Frack CCR, Pileggi F, Decourt LV, Zerbini EJ. Homologous dura mater cardiac valve. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1972;64:154-60.
23. Zerbini EJ, Puig LB. Tissue heart valve valves. London:Butterworth;1979.p.255-301
24. Allen DJ, Highison GJ, Didio LJA, Zerbini EJ, Puig LB. Evidence of remodeling in dura mater cardiac valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982;84:267-81.
25. Braile DM, Zaiantchick M, Souza DRS. Prótese de pericárdio bovino PB IMC: 11 anos em posição mitral. *Arq Bras Cardiol.* 1992;59:13-21.
26. Pomerantzeff PMA, Brandão CMA, Cauduro P, Puig LB, Grinberg M, Tarasoutchi F et al. Fisics – Incor bovine pericardial bioprotheses: 15 years results. *Heart Surg Fórum.* 1998;1:130-5.

27. Jiménez SA. Current Molecular Medicine: Principles of Molecular Rheumatology. Totowa: G.C.Tsokos; 2000. p.175-196.
28. Carnevalli NC. Estudo da reticulação progressiva e do tratamento com ácido glutâmico sobre as propriedades do pericárdio bovino utilizado em biopróteses valvulares[dissertação]. São Carlos: Instituto de Química, Universidade de São Paulo/São Carlos; 2003.
29. Goissis G, Braile DM, Giglioti AF. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 1999;9:46-57.
30. Woodroof EA. Use of glutaraldehyde and formaldehyde to process tissue heart valves. *J Bioeng*. 1978;2:1-19.
31. Cheung DT, Perelman N, Ko E, Nimni M. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reactions with collagen in tissues. *Connect Tissue Res*. 1985;13:109-15.
32. Braile DM, Soares MJF, Souza DRS, Ramirez VA, Suzigan S, Lourenço MF. Expectativa funcional de biopróteses valvulares. I. Testes biofísicos e histopatológicos para aproveitamento de regiões do pericárdio bovino. *Arq Bras Cardiol*. 1992;59:169-175.

33. Simionescu D, Simionescu A, Deac R. Mapping of glutaraldehyde-treated bovine pericardium and tissue selection for bioprosthetic heart valves. *J Biomed Mater Res*. 1993;27:697-704.
34. Braile DM, Soares MJF, Souza DRS, Ramirez VA, Suzigan S, Godoy MF. Mapping of bovine pericardium: physical and histopathologic tests. *J Heart Valve Dis*. 1998;7:202-6.
35. Vincentelli A, Latrémouille C, Zegdi R, Shen M, Lajos PS, Chachques JC et al. Does glutaraldehyde induce calcification of bioprosthetic tissues? *Ann Thorac Surg*. 1998;66:S255-8.
36. Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Levy R. The role of glutaraldehyde-induced cross-links on calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprosthesis. *Am J Pathol*. 1987;127:122-30.
37. Levy RJ. Glutaraldehyde and the calcification mechanism of bioprosthetic heart valves[editorial]. *J Heart Valve Dis*. 1994;3:101-4.
38. Herrero JE, Fernández P, Escudero C, García-Páez JM, Castillo-Olivares JL. Calcification of pericardial tissue pretreated with different amino acids. *Biomaterials*. 1996;17:571-5.

39. Gott JP, Chih P, Dorsey LMA, Jay JL, Jett GK, Shoen FJ, Girardot JM, Guyton RA. Calcification of porcine valves: a successful new method of antimineralization. *Ann Thorac Surg.* 1992;53:207-16.

40. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Riedel E, Wolner E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003; 23:1002-6.

41. Dohmen PM, Scheckel M, Stein-Konertz M, Erdbruegger W, Affeld K, Konertz W. In vitro hydrodynamics of a decellularized pulmonary porcine valve, compared with a glutaraldehyde and polyurethane heart valve. *Int J Artif Organs.* 2002;25:1089-94.

42. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König I, Riemann I, Halbhuber K et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineered of heart valves. *J Struct Biol.* 2003;143:201-8.

43. Chang Y, Liang HC, Wei HJ, Chu CP, Sung HW. Tissue regeneration patterns in acellular bovine pericardia implanted in a canine model as a vascular patch. *J Biomed Mater Res.* 2004;69:323-33.

44. Chang Y, Liang HC, Tsai CC, Sung HW. In vivo avaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). *Biomaterials*. 2001;23:2447-57.

45. Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, McComb D, Lee JM, Wilson GJ. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res*. 1994;28:655-66.

46. Nina VJS. Endotelização *in vivo* das biopróteses cardíacas porcinas: comparação entre a preservação convencional e a não-aldeídica.[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.

47. Rosa FP, Lia RCM, Souza KO, Goissis G, Marcantonio E. Tissue response to polyanionic collagen: elastin matrices implanted in rat calvaria. *Biomaterials*. 2003;24:207-12.

48. Braile DM. (Braile Biomédica – São José do Rio Preto/SP e Instituto de Física e Química – USP de São Carlos/SP). Programa de pesquisa e desenvolvimento de biomateriais a base de colágeno e poliuretana. São José do Rio Preto: Braile Biomédica;1993. Relatório II.

49. Braile DM. (Braile Biomédica – São José do Rio Preto/SP e Instituto de Física e Química – USP de São Carlos/SP). Programa de pesquisa e desenvolvimento de biomateriais a base de colágeno e poliuretano. São José do Rio Preto: Braile Biomédica;1994. Relatório III.
50. Implantes cardiovasculares – Próteses de válvulas cardíacas – NBR ISO 5840. Rio de Janeiro (RJ): Associação Brasileira de Normas e Técnicas, Comitê Brasileiro Odonto-Médico-Hospitalar/ Comissão de Estudos de Implantes; 1999. Projeto nº 26:003.01-086:1998.
51. Meyers DJ, Nolan SP. Cardiovascular Implants – Cardiac Valve Prosthesis ANSI/AAMI/ISO 5840 – 1996. Arlington (VA): Association for the Advancement of Medical Instrumentation; 1996.
52. Meuris B, Phillips R, Moore MA, Flameng W. Porcine stentless bioprosthesis: prevention of aortic wall calcification by mediated photo-oxidation. *Artif Organs*. 2003; 27:537-43.
53. Maizato MJS, Higa OZ, Mathor MB, Camillo MAP, Spencer PJ, Pito RN et al. Glutaraldehyde-treated bovine pericardium: effects of lyophilization on cytotoxicity and residuals aldehydes. *Artif Organs*. 2003;27:692-4.

54. Grimm M, Eybl E, Grabenwöger M, Griesmacher A, Losert U, Böck P et al. Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991;102:195-201.

55. Grabenwöger M, Fitzal F, Gross C, Simon P, Hutschala D, Böck P. Different modes of degeneration in autologous and heterologous heart valve prostheses. *J Heart Valve Dis.* 2000; 9:104-11.

56. Schoen FJ. Future directions in tissue heart valves: impact of recent insights from biology and pathology[editorial]. *J Heart Valve Dis.* 1999; 8:350-8.

57. Grabenwöger M, Sider J, Fitzal F, Zelenka C, Windberger U, Grimm M et al. Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:772-7.

58. Nimni ME, Bernick S, Cheung DT. Biochemical differences between dystrophic calcification of cross-linked collagen implants and mineralization during bone induction. *Calcif Tissue Int.* 1988;42:313-20.

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

60. Eberl T, Siedler S, Schumacher B, Zilla P, Schlaudraff K, Fasol R. Experimental in vitro endothelialization of cardiac valve leaflets. *Ann Thorac Surg.* 1992;53:487-92.

61. Eybl E, Grimm M, Grabenwöger M, Böch P, Muller MM, Wolner E. Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve materials. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;104:763-9.

62. Courtmann DW, Pereira CA, Kashef V, Lee JM. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial – biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res.* 1994;28:655-66.

63. Dohmen PM, Shigeyuki O, Yperman J, Flameng W, Konertz W. Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep. *Sem Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;13:93-8.

64. Steinhoff G, Stock UA, Najibulla K. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allergenic acellular matrix conduits- in vivo restoration of valve tissues. *Circulation.* 2000;102:50-5.

65. Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials.* 2002;23:449-56.

66. Courtman DW, Pereira CA, Omar S, Kashef V. Biomechanical and ultrastructural comparison of cryopreservation and a novel cellular extraction of porcine aortic valve leaflets. *J Biomed Mater Res.* 1995;29:1507-16.

67. Boudnar E, Olsen EGJ, Florio R, Dobrin J. Damage of porcine aortic valve tissue by the surfactant sodium dodecylsulfate. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986;34:82-5.

68. Samouillan V, Denadurand-Lods J, Lamure A. Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve bioprostheses. *J Biomed Mater Res.* 1999;46:531-8.

69. Schenke-Layland K, Opitz F, Gross M, Döring C, Halbhuber KJ, Schirrmeister F et al. Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals – an in vitro study. *Cardiovasc Res.* 2003;60:497-509.

70. Gross JM. Calcification of bioprosthetic heart valves and its assessment[editorial]. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121:428-30.

71. Meuris B, Shigeyuki O, Herijgers P, Verbeken E, Flameng W. Influence of species, environmental factors, and tissue cellularity on

calcification of porcine aortic wall tissue. *Sem Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;13:99-105.

72. Mirzaie M, Meyer T, Schwartz P, Dalichau H. Preimplant ultrastructure and calcification tendency of various biological aortic valves. *J Heart Valve Dis.* 2000;9:576-82.
73. Chanda J. Prevention of calcification of heart valve bioprostheses: an experimental study in rat. *Ann Thorac Surg.* 1995;60:S339-42.
74. Grabenwöger M, Grimm M, Eybl E, Leukauf C, Muller MM, Plenck H et al. Decreased tissue reaction to bioprosthetic heart valve material after l-glutamic acid treatment. A morphological study. *J Biomed Mater Res.* 1992;26:1231-40.

***Bibliografia
Consultada***

,

9. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Aulete C. Minidicionário contemporâneo da língua portuguesa. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 2004.
2. Ferreira ABH. Novo dicionário da língua portuguesa. 2ª ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1986.
3. Spector N. Manual para redação de teses, projetos de pesquisa e artigos científicos. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
4. Severino AJ. Metodologia do trabalho científico. 21ª ed. São Paulo: Cortez Editora; 2000.
5. Rapoport A. Mestrado e doutorado na área de saúde. São Paulo: Pancast Editora; 1997.
6. Filho UD. Introdução à bioestatística para simples mortais. São Paulo: Negócio Editora; 1999.