VINÍCIUS JOSÉ DA SILVA NINA

**Endotelização *in vivo* das biopróteses
cardíacas porcinas:** comparação entre a preservação
convencional e a não-aldeídica

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

**SÃO PAULO
2003**

VINÍCIUS JOSÉ DA SILVA NINA

Endotelização *in vivo* das biopróteses

cardíacas porcinas: comparação entre a preservação
convencional e a não-aldeídica

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 M. A.
Pomerantzeff.

SÃO PAULO
2003

“The past two decades have seen spectacular gains in our knowledge and treatment of most diseases affecting the heart and circulatory system. In some areas, progress has been “literally beyond prophecy”. And what of the future? Science is an endless frontier. The horizons for future achievements are limited only by the limitations upon one’s imagination”.

C. Walton Lillehei, M.D., Ph.D.

Speech at The New York Academy of Science, 1969.

DEDICATÓRIA

A Deus, fonte de vida e toda a sabedoria.

À minha esposa Rachel e ao meu filho Arthur.

Aos meus pais, Valdemir e Maria de Lourdes.

Aos meus padrinhos, João e Maria Nazaré.

Aos meus irmãos, Fátima, Valderise, Luiza, Valdemir Filho e Antônia
de Lourdes.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Professor Doutor, Pablo Maria Alberto Pomerantzeff,
pela acolhida e pelo empenho incansável em colaborar na construção da
minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Doutores: Noedir Antônio Groppo Stolf e Luiz Felipe de Pinho Moreira e ao Doutor Carlos Manuel de Almeida Brandão, pelo apoio e sugestões na elaboração desta tese.

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

Aos Doutores Luiz Alberto Benvenuti e Sérgio Antônio Barbosa do Nascimento pela valiosa contribuição na realização dos estudos histológicos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo fomento à microscopia desta tese – Processo nº 2002/08298-4.

Ao Professor Doutor José Albuquerque de Figueiredo Neto e à Estaticista Mariana Curi, pela Análise Estatística.

Aos companheiros de trabalho: Marco Aurélio Salles Assef e Raimundo Reis Rodrigues, pelo apoio e incentivo.

Ao Professor Doutor Natalino Salgado Filho, em nome do Hospital Universitário “Presidente Dutra” da Universidade Federal do Maranhão.

À Bibliotecária Maria Madalena Peixoto Costa, pela amizade e dedicação em todos os momentos da elaboração desta tese.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de símbolos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3	MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1	Seleção da amostra.....	10
3.1.1	Preparo das próteses.....	11
3.1.1.1	Prótese não-aldeídica.....	11
3.1.1.2	Prótese aldeídica.....	12
3.1.2	Preparo dos animais de experimentação.....	13
3.1.3	Implantes em animais	15
3.1.3.1	Técnica operatória	15
3.1.3.2	Cuidados pós-operatórios	18
3.1.3.3	Avaliação ecoDopplercardiográfica.....	19
3.1.3.4	Avaliação angiográfica	21
3.2	Explante das próteses	23
3.2.1	Avaliação macroscópica	24
3.2.2	Avaliação radiológica	25

3.2.3	Avaliação histológica e imuno-histoquímica...	26
3.2.3.1	Microscopia óptica	27
3.2.3.2	Microscopia eletrônica de varredura	27
3.2.3.3	Microscopia eletrônica de transmissão .	28
3.3	Análise estatística dos dados	29
4	RESULTADOS	31
4.1	Análise ecoDopplercardiográfica	31
4.2	Análise angiográfica	32
4.3.	Avaliação macroscópica	34
4.4	Análise dos achados radiológicos.....	36
4.5	Análise histológica	38
4.5.1	Aspectos da microscopia óptica.....	38
4.5.1.1	Análise imuno-histoquímica	42
4.5.2	Aspectos da macroscopia eletrônica de varredura.....	45
4.5.3	Aspectos da macroscopia eletrônica de transmissão.....	47
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	61
7	ANEXOS	63
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AV	área valvar
C	controle
CEC	circulação extracorpórea
DC	débito cardíaco
DN	data do nascimento
Eco	ecoDopplercardiograma
EV	endovenoso
FiO₂	fração inspirada de oxigênio
GA	glutaraldeído
Grad. Máx.	gradiente máximo
Grad. Médio	gradiente médio
HE	hematoxilina-eosina
IM	intramuscular
Mi	mitral
Op.	operação
p	probabilidade de um evento
PAM	pressão arterial média
PAP	pressão arterial pulmonar
PCP	pressão capilar pulmonar
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial de hidrogênio
Regurg	regurgitação
T	teste
TCEC	tempo de circulação extracorpórea
Timplante	tempo de implante

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Médias e erros-padrão das variáveis ecoDopplercardiográficas nos 2 grupos	32
TABELA 2	Médias e erros-padrão das variáveis angiográficas nos 2 grupos	34
TABELA 3	Frequências absolutas e relativas dos achados histológicos após 150 dias do implante valvular.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a	Prótese porcina não-aldeídica (L-Hydro™) – face atrial	12
Figura 1b	Prótese porcina não-aldeídica (L-Hydro™) – face ventricular.....	12
Figura 2	Implante da prótese em posição mitral.....	17
Figura 3	Esquema para quantificação da insuficiência mitral pelo Doppler pulsátil	20
Figura 4	Esquema para classificação do grau de calcificação pela mamografia	26
Figura 5	Prótese aldeídica (Labcor®) após 150 dias do implante.....	35
Figura 6	Prótese não-aldeídica (L-Hydro™) após 150 dias do implante.....	36
Figura 7	Aspecto radiológico de uma prótese aldeídica.....	37
Figura 8	Aspecto radiológico de uma prótese não-aldeídica.....	38
Figura 9	Coloração por HE de uma prótese não-aldeídica	39
Figura 10	Coloração por HE de uma prótese aldeídica.....	40
Figura 11	Coloração por von Kossa de uma prótese aldeídica.....	41
Figura 12	Coloração por von Kossa de uma prótese não-aldeídica	42
Figura 13	Expressão do fator VIII em uma prótese não-aldeídica .	43
Figura 14	Expressão do fator VIII em uma prótese aldeídica.....	44
Figura 15	Microscopia de varredura de uma prótese não-aldeídica.....	46
Figura 16	Microscopia de varredura de uma prótese aldeídica.....	47

Figura 17	Microscopia de transmissão de uma prótese não-aldeídica.....	48
Figura 18	Microscopia de transmissão de uma prótese aldeídica	49

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
CO₂	dióxido de carbono
Fr	French
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
O₂	Oxigênio
Kg	Quilograma
Kg⁻¹	por quilograma de peso corporal
kV	quilovolts
L	litro
mA	miliampére
mEq	miliequivalente
mg	miligrama
mmHg	milímetro de mercúrio
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
µm	Micrômetro
UI	unidade internacional

RESUMO

NINA, V.J.S. **Endotelização *in vivo* das biopróteses cardíacas porcinas: comparação entre a preservação convencional e a não-aldeídica.** São Paulo, 2003, 94p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

O revestimento completo das superfícies das biopróteses cardíacas por uma camada protetora de células endoteliais do hospedeiro ainda não foi relatado. As próteses cardíacas de uso corrente são comumente preservadas em glutaraldeído, o qual é citotóxico para as células do hospedeiro evitando a endotelização espontânea. O objetivo deste estudo é demonstrar o potencial para a endotelização *in vivo* das próteses cardíacas tratadas por um processo alternativo de preservação tecidual (L-Hydro™). O processo de preservação L-Hydro™ consiste na extração controlada de substâncias antigênicas do tecido valvar e na incorporação de um agente antiinflamatório e anti-trombótico. Sete biopróteses porcinas com suporte tratadas pelo processo L-Hydro™ (grupo teste) e três fixadas em glutaraldeído (grupo controle) foram implantadas na posição mitral de ovelhas jovens. As próteses foram avaliadas pela ecocardiografia e angiografia antes do sacrifício aos cinco meses. As próteses explantadas foram avaliadas quanto ao aspecto radiológico, histológico e histoquímico. O teste-t não-pareado de Student e o teste exato de Fisher foram utilizados para a análise estatística. Não houve diferença hemodinâmica entre os grupos, exceto pela pressão capilar mais elevada no grupo controle. Entretanto, a microscopia óptica e a eletrônica de varredura e transmissão mostraram o revestimento quase completo de células endoteliais na superfície de todos os folhetos das próteses tratadas pelo L-Hydro™ após cinco meses de implante. As células endoteliais estavam em contato direto com a camada do colágeno subjacente e expressaram antígenos ligados ao fator von Willebrand. As superfícies das próteses tratadas pelo glutaraldeído encontravam-se cobertas por depósitos de fibrina, macrófagos, cálcio e material trombótico. Apenas células endoteliais esparsas foram observadas neste grupo, e o contato destas células com o colágeno subjacente foi incompleto. Estes dados indicam que a preservação tecidual não-aldeídica (L-Hydro™) utilizada neste estudo é capaz de induzir a endotelização espontânea evidenciada pela boa adesividade celular do novo endotélio à matriz do colágeno, e pela maior resistência à trombose e à calcificação.

ABSTRACT

NINA, V.J.S. ***In vivo* endothelialization of conventional and non-aldehyde-fixed porcine bioprostheses: comparative study.** São Paulo, 2003, 94p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A protective layer of endothelial cells of host origin on the entire surfaces of bioprosthetic heart valves has never been reported. Current commercial bioprosthetic heart valves are commonly preserved in glutaraldehyde which is cytotoxic to host cells preventing spontaneous endothelialization. The aim of this study is to demonstrate the potential for *in vivo* endothelialization of heart valves treated by an alternative tissue preservation process (L-Hydro™). L-Hydro™ preservation process consists of controlled extraction of antigenic substances from the valvular tissue and incorporation of an anti-inflammatory and a anti-thrombotic agent. Seven stented porcine heart valves treated by the L-Hydro™ process (test group) and three glutaraldehyde-fixed porcine heart valves (control group) were implanted in the mitral position of juvenile sheep. The valves were evaluated echocardiographically and angiographically prior to sacrifice at five months. Recovered valves were also radiologically, histologically and histochemically evaluated. Unpaired t-test of Student and Fisher's exact test were performed for statistical analysis. There were no hemodynamic differences between groups except for a higher pulmonary artery wedge pressure in the control group. However, optical microscopy, scanning and transmission electron microscopy showed a nearly complete coverage of endothelial cells on the surfaces of all leaflets in the L-Hydro™ treated valves after five months of implantation. The endothelial cells were in direct contact with the underlying collagen layer and expressed von Willebrand-related antigens. The surfaces of the glutaraldehyde-treated valves were covered by fibrin deposition, macrophages, calcium and thrombotic material. Only sparse endothelial cells were observed in this group, and contact of the endothelial cells with the underlying tissue was incomplete. These data indicate that the non-aldehyde tissue preservation (L-Hydro™) utilised in this study is capable of inducing spontaneous endothelialization with evidence of strong cell attachment of the new endothelium to the collagen tissue matrix, and it also provides a greater resistance to thrombosis and calcification.