

GEORGE RONALD SONCINI DA ROSA

**UTILIZAÇÃO DO ETANOL NA PREVENÇÃO DA CALCIFICAÇÃO EM
HETEROENXERTO VALVAR PULMONAR PORCINO: ESTUDO
EXPERIMENTAL EM OVINOS**

**Tese apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau acadêmico de Doutor.
Programa de Pós-Graduação em Clínica
Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco Diniz
Affonso da Costa**

**Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo
Fouto Matias**

CURITIBA

2005

Aos meus pais José e Tânia,
exemplos de luta, dedicação e amor aos filhos.

À minha querida esposa Andréa, pelo carinho, compreensão e incentivo durante todas as etapas deste trabalho, e aos meus filhos Rafael e Eduarda, pela alegria irradiante e estímulo permanente e impulsionador na busca de meus ideais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Iseu de Santo Elias Affonso da Costa, pelo incentivo à produção científica, pelos valiosos ensinamentos e minuciosas correções deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa, pelas orientações criteriosas, minuciosas correções deste trabalho e pelo apoio imprescindível à sua concretização.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) pela oportunidade de utilizar o Hospital Veterinário e Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Operatória da PUCPR para a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de aprendizado e evolução em minha carreira universitária.

À Dra. Andréa Corleto Hoelzl, pelo precioso auxílio na execução deste trabalho.

À Dra. Lismari Mesquita, patologista, pelas análises histológicas e participação na interpretação dos dados.

Aos Drs. Américo Farinha Martins, João Madeira Neto, Guilherme Lacerda de Oliveira pelo harmonioso convívio profissional que possibilitou a execução deste trabalho.

Às funcionárias da CARDIOPRÓTESE®, Sr^a. Ângela Maria Peruzzo, Srt^a. Julia Affonso da Costa, Sr^a. Caroline Wendler, Sr^a. Cristina Ciniava, Sr^a. Eunice Pereira Santos, Sr^a. Luciana Serraglio de Lima, Sr^a. Marlene Tomen e Sr^a. Thereza Lurdes Pedrolli, pelo processamento e fornecimento dos heteroenxertos pulmonares porcinos

Ao Prof. Felipe Phol de Souza pelo empenho, organização e seriedade na condução do projeto.

Ao Prof. Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani pela dedicação e competência na realização dos procedimentos anestésicos.

Ao Prof. Antônio Felipe Paulino de Figueredo Wolk, pelo apoio e confiança depositados nesse trabalho.

Ao Prof. Marconi Rodrigues de Farias, diretor do Hospital Veterinário pela compreensão e incentivo à produção científica.

À Dra. Lorena Reichert pela disponibilidade e apoio na realização dos exames ecocardiográficos

Ao biólogo Eduardo Discher Vieira, pela dedicação, organização e planejamento operacional em várias etapas do projeto.

À bióloga Ana Paula Camargo Martins do laboratório de Patologia pela dedicação e pelo preparo do material histológico.

Ao farmacêutico João Gabriel Roderja Vieira pela dedicação em registrar os dados necessários e disponibilidade inrestrita no apoio na execução dos exames ecocardiográficos.

Ao residente de cirurgia veterinária Tiago Sillas pelo importante auxílio nas cirurgias.

A perfusionista Rosália Ramos e instrumentadora Salete de Cássia R. G. Gonçalves de Castro pela disponibilidade e competência no auxílio nas cirurgias.

A todos os profissionais que direta ou indiretamente, contribuíram para concretização dessa dissertação.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	vii
	LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
	LISTA DE TABELAS.....	viii
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
	RESUMO.....	x
	ABSTRACT.....	xi
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	OBJETIVO.....	3
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3	MATERIAL E MÉTODO.....	9
3.1	MODELO EXPERIMENTAL.....	9
3.2	PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO.....	10
3.3	ANESTESIA.....	10
3.3.1	Monitorização Anestésica.....	11
3.4	OBTENÇÃO DOS HETEROENXERTOS VALVARES PULMONARES PORCINOS.....	12
3.4.1	Procedimento Químico	12
3.5	PROTOCOLO CIRÚRGICO.....	14
3.6	CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS IMEDIATOS E TARDIOS	16
3.7	EQUIPE CIRÚRGICA.....	17
3.8	OBSERVAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA.....	17
3.8.1	Avaliação Ecocardiográfica.....	18
3.9	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	19
3.9.1	Análise Macroscópica.....	19
3.9.2	Análise Microscópica.....	19
3.10	MENSURAÇÃO DO CÁLCIO.....	20
3.11	METODOLOGIA ESTATÍSTICA.....	21
4	RESULTADOS.....	22
4.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA	22
4.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA	25
4.2.1	Calcificação.....	25

4.2.2	Presença de Infiltrado Inflamatório.....	27
4.3	MENSURAÇÃO DO CÁLCIO.....	27
4.4	AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA.....	28
5	DISCUSSÃO.....	32
6	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37
	ANEXOS.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	CARNEIRO SENDO MONITORIZADO E ANESTESIADO.....	10
FIGURA 2 -	HETEROENXERTO VALVAR PULMONAR PORCINO APÓS TRATAMENTO	13
FIGURA 3 -	CARNEIRO SENDO COLOCADO EM CEC(Superior esquerdo), SEGUIDO DE IMPLANTAÇÃO DO HETEROENXERTO VALVAR PULMONAR PORCINO(Superior direito), OBSERVAÇÃO APÓS FECHAMENTO TORÁCICO(Inferior esquerdo) E 30 MINUTOS APÓS EXTUBAÇÃO, NO PIQUETE ANEXO AO CENTRO CIRÚRGICO(Inferior direito).....	15
FIGURA 4 -	CARNEIROS EM BAIA DEVIDAMENTE PREPARADA PARA OBSERVAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA	16
FIGURA 5 -	CARNEIRO SENDO PREPARADO PARA REALIZAÇÃO DE ESTUDO ECOCARDIOGRÁFICO.....	18
FIGURA 6 -	HETEROENXERTO VALVAR PULMONAR PORCINO TRATADO COM ETANOL, APÓS RETIRADA, ONDE SE OBSERVA SINAIS DE CALCIFICAÇÃO EM SUA PAREDE.....	23
FIGURA 7 -	HETEROENXERTO VALVAR PULMONAR PORCINO EM GDA, APÓS RETIRADA, ONDE SE OBSERVA IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO NA PAREDE.....	23
FIGURA 8 -	HETEROENXERTO VALVAR PULMONAR PORCINO TRATADO COM ETANOL, APÓS RETIRADA, ONDE SE OBSERVA AS SUAS CÚSPIDES SEM CALCIFICAÇÃO E DELGADAS.....	24
FIGURA 9 -	HETEROENXERTO VALVAR PULMONAR PORCINO EM GDA, APÓS RETIRADA, ONDE SE OBSERVA CALCIFICAÇÃO IMPORTANTE EM SUAS CÚSPIDES.....	24
FIGURA 10 -	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE DO HETEROENXERTO VALVAR PULMONAR PORCINO, TRATADO COM ETANOL, SEM SINAIS DE CALCIFICAÇÃO APÓS 210 DIAS DE IMPLANTE (von Kossa 40x).....	26
FIGURA 11 -	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE DO HETEROENXERTO VALVAR PULMONAR PORCINO, TRATADO COM GLUTARALDEÍDO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 210 DIAS DE IMPLANTE (von Kossa 40x).....	26

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA CÚSPIDE DO HETEROENXERTO PULMONAR PORCINO, NOS GRUPOS DE ESTUDO - 210 DIAS	28
GRÁFICO 2	MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA CÚSPIDE DO HETEROENXERTO PULMONAR PORCINO, NOS GRUPOS DE ESTUDO - 210 DIAS	28
GRÁFICO 3	GRADIENTE TRANSVALVAR NOS GRUPOS DE ESTUDO - 30 DIAS	29
GRÁFICO 4	GRADIENTE TRANSVALVAR NOS GRUPOS DE ESTUDO - 90 DIAS	29
GRÁFICO 5	GRADIENTE TRANSVALVAR NOS GRUPOS DE ESTUDO - 180 DIAS	30
GRÁFICO 6	GRADIENTE TRANSVALVAR NOS GRUPOS DE ESTUDO - 210 DIAS	30
GRÁFICO 7	GRADIENTE TRANSVALVAR NOS GRUPOS DE ESTUDO.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	PRESENÇA DE CALCIFICAÇÃO EM RELAÇÃO À LOCALIZAÇÃO E INTENSIDADE, NOS GRUPOS DE ESTUDO	25
TABELA 2	PRESENÇA DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO NOS GRUPOS DE ESTUDO.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
H&E	Hematoxilina e Eosina
GDA	Glutaraldeído
E 80%	Etanol a 80%
AG 0,8%	Ácido L- Glutâmico a 0,8%
AG	Ácido L- Glutâmico a 0,8%
µg	Micrograma
®	Marca registrada
A.O.A	Ácido 2 – Alfa – Amino- Oléico
SDS	Sulfato Dodecil de Sódio
Al ⁺³	Alumínio trivalente
Fe ⁺³	Ferro trivalente
NS	Não significante
S	Significante
PBS	Solução de paraben

RESUMO

Este estudo tem por objetivo analisar comparativamente o uso do etanol com o glutaraldeído, como método de inibição da calcificação dos heteroenxertos valvares pulmonares porcinos implantados na via de saída do ventrículo direito de ovinos jovens. Foram utilizados dez ovinos jovens, distribuídos em dois grupos contendo cinco animais cada. A operação consistiu na implantação do heteroenxerto valvar pulmonar porcino na via de saída de ventrículo direito de corações de ovinos com a utilização de circulação extracorpórea (CEC), divididos em dois grupos; o grupo do GDA (controle) e o grupo Etanol (grupo em que os heteroenxertos foram pré-tratados com etanol a 80%). Realizou-se estudo ecocardiográfico para medida do gradiente transvalvar pulmonar no período de 30, 90, 180 e 210 dias após implante, análise macroscópica da parede do heteroenxerto e análise microscópica quanto à presença de calcificação; localização e intensidade e presença de infiltrado inflamatório; localização e tipo do mesmo e mensuração do cálcio na cúspide valvar no período de 210 dias. Na mensuração do cálcio na cúspide do heteroenxerto encontrou-se no grupo GDA (controle) 210 dias ($7,98 \pm 6,82 \mu\text{g}$ cálcio/mg tecido), no grupo Etanol 210 dias ($0,31 \pm 0,33 \mu\text{g}$ cálcio/ mg tecido). Em relação ao gradiente transvalvar máximo em 30 dias não houve diferença significativa entre os grupos, já aos 90, 180 e 210 dias o grupo GDA apresentou maior gradiente transvalvar do que o grupo do etanol. Na análise macroscópica da parede do heteroenxerto, observou-se calcificação em ambos os grupos, sendo mais intensa no grupo do GDA. Na avaliação microscópica das cúspides do heteroenxerto em relação à presença de calcificação, observou-se que no grupo GDA esteve presente em todos os animais, com localização focal, enquanto no grupo do Etanol, esteve ausente em todos os animais. Infiltrado inflamatório esteve presente em todos os animais dos dois grupos. Conclui-se que etanol a 80% inibe a calcificação das cúspides no período analisado, mas não inibe a calcificação da parede do heteroenxerto valvar pulmonar porcino.

Palavras-chave: Etanol, Calcinose, Transplante heterólogo, Ovinos, glutaral

ABSTRACT

USE OF ETHANOL IN PREVENTING CALCIFICATION OF PORCINE PULMONARY VALVE HETEROGRAFT: TRIAL STUDY IN OVINES

The objective of this study was to perform a comparative evaluation of the use of ethanol with glutaraldehyde, to inhibit the calcification of the porcine pulmonary valve heterograft implanted on the right ventricle outlet of young ovines. Ten young ovines were used, divided into two groups with five animals each: the GDA (control) group and the Ethanol group (in which the heterografts were pre-treated with ethanol-80). The surgery consisted in implanting the heterograft on the right ventricle outlet of young ovines by using extracorporeal circulation (EEC). Echocardiography was performed to measure the pulmonary transvalvar gradient at 30, 90, 180 and 210 days after the implant, as well as microscopic analysis for calcification; location, intensity and presence of inflammatory infiltrate; measurement of the calcium in the valve cusp at 210 days; and macroscopic analysis of the heterograft wall. The calcium in the heterograft cusp of the GDA (control) group at 210 days was ($7.98 \pm 6.82 \mu\text{g calcium/mg tissue}$) and in the Ethanol group at 210 days was ($0.31 \pm 0.33 \mu\text{g calcium/ mg tissue}$). As to the maximum transvalvar gradient in 30 days, there was no significant difference between the groups, but at 90, 180 and 210 days the GDA group showed a greater transvalvar gradient than the ethanol group. The macroscopic analysis of the heterograft wall evidenced calcification in both groups, more pronounced in the GDA group. The microscopic analysis of the cusp valve revealed the presence of calcification in all animals of the GDA group, with focal location, while in the ethanol group it was absent in all animals. Inflammatory infiltrate was found in all animals of both groups. The conclusion was that the ethanol-80% inhibits calcification in the cusps during the period of the analysis, but does not inhibit the calcification of the porcine pulmonary valve heterograft wall.

Key words: Ethanol, Calcinosis, Sheep, Transplantation heterologous, glutaral