

**GEORGE RONALD SONCINI DA ROSA**

**ESTUDO COMPARATIVO DA EFICÁCIA DO ETANOL E ÁCIDO L-  
GLUTÂMICO NA PREVENÇÃO DA CALCIFICAÇÃO DAS CÚSPIDES  
E PAREDE AÓRTICA PORCINA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM  
RATOS**

**Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau acadêmico de Mestre. 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. Antônio Carlos Ligoeki  
Campos

**CURITIBA**

**2001**

Soncini da Rosa, George Ronald

Estudo comparativo da eficácia do etanol e ácido L-glutâmico na prevenção da calcificação das cúspides e parede aórtica porcina. Estudo experimental em ratos.

– Curitiba, 2001.

f. 62.

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

Dissertação (Mestrado)/Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1. Etanol e Ácido L-glutâmico. 2. Parede Aórtica Porcina.
3. Estudo Experimental.

II. Título

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

À minha querida esposa Andréa, pelo carinho e incentivo durante as etapas deste trabalho, e ao meu filho Rafael, pela alegria irradiante nas nossas horas de convívio familiar.

## 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, orientador, pelas orientações criteriosas, minuciosas correções deste trabalho e pelo apoio imprescindível à sua concretização.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) e ao Prof. Dr. Fernando Hintz Greca, por acreditar em meu projeto e pela oportunidade de utilizar o Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Operatória da PUC-PR para a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos, 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. Luiz Fernando Kubrusly, Américo Farinha Martins, João Madeira Neto, pelo harmonioso convívio profissional que possibilitaram a execução deste trabalho.

Às funcionárias da CARDIOPRÓTESE®, Sr<sup>a</sup>. Ângela Maria Peruzzo, Srt<sup>a</sup>. Julia Affonso da Costa, Sr<sup>a</sup>. Caroline Wendler, Sr<sup>a</sup>. Cristina Ciniava, Sr<sup>a</sup>. Eunice Pereira Santos, Sr<sup>a</sup>. Luciana Serraglio de Lima, Sr<sup>a</sup>. Marlene Tomen e Sr<sup>a</sup>. Thereza Lurdes Pedrolli, pelo processamento e fornecimento das cúspides e paredes aórticas porcinas.

Ao médico veterinário, Dr. Indalécio Mainardes Sutil, pela colaboração deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Operatória da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Sr. Daniel Fiedler, Sr. Álvaro Roberto Gonçalves Machado, Sr. Alaércio Zeglan, Sr. Charles Pires Melo, Sr. Fernando Ubirajara Pires e Sr<sup>a</sup>. Rosana Nunes Ferreira, pela inestimável colaboração na realização das cirurgias experimentais e cuidados pós-operatórios.

À Sr<sup>a</sup>. Ângela da Matta Silveira Martins, pelo estudo estatístico aqui realizado.

À Sr<sup>a</sup>. Edlaine Araújo dos Santos, pela normatização de trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE GRÁFICOS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
1.1 OBJETIVO.....	4
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>11</b>
3.1 MODELO EXPERIMENTAL.....	11
3.2 PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO.....	12
3.3 ANESTESIA.....	12
3.4 OBTENÇÃO DAS CÚSPIDES E PAREDES DE AORTA PORCINAS..	13
3.4.1 Procedimento Químico.....	13
3.5 TÉCNICA OPERATÓRIA.....	15
3.6 OBSERVAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA.....	16
3.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	17
3.7.1 Análise Microscópica.....	17
3.8 MENSURAÇÃO DO CÁLCIO.....	18
3.9 METODOLOGIA ESTATÍSTICA.....	19
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
4.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	22

4.1.1 Calcificação.....	22
4.1.2 Infiltrado Inflamatório.....	26
4.2 MENSURAÇÃO DO CÁLCIO.....	29
5 <b>DISCUSSÃO</b> .....	41
6 <b>CONCLUSÕES</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48
<b>ANEXOS</b> .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

PUC-PR	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
Nº	Número
mg	Miligrama
®	Marca registrada
A.O.A	Ácido 2 – Alfa – Amino- Oléico
g	Gramma
SDS	Sulfato Dodecil de Sódio
n	Número
cm	centímetro
x	vezes
Al <sup>+3</sup>	Alumínio trivalente
Fe <sup>+3</sup>	Ferro trivalente
NS	Não significativa
S	Significativa

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	RAIZ AÓRTICA PORCINA, DA QUAL FORAM OBTIDAS AS CÚSPIDES E O SEGMENTO DE PAREDE AÓRTICA.....	14
FIGURA 2	RATO ANESTESIADO, EM DECÚBITO VENTRAL APÓS REALIZADO O IMPLANTE DAS ESTRUTURAS ESTUDADAS.....	15
FIGURA 3	RATO EM DECÚBITO VENTRAL APÓS SACRIFÍCIO, QUANDO SE REALIZOU A RETIRADÀ DA CÚSPIDE E DO SEGMENTO DA PAREDE AÓRTICA.....	16
FIGURA 4	APARELHO UTILIZADO PARA MENSURAÇÃO DO CÁLCIO.....	19
FIGURA 5	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO EM QUE SE OBSERVA UMA ACENTUADA E INTENSA CALCIFICAÇÃO APÓS 30 DIAS DE IMPLANTE. AG SUBGRUPO 30 DIAS (von Kossa 40x).....	23
FIGURA 6	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO, EM QUE SE OBSERVA UMA ACENTUADA E DIFUSA CALCIFICAÇÃO APÓS 60 DIAS DE IMPLANTE. GDA SUBGRUPO 60 DIAS (H&E 40x).....	24
FIGURA 7	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE LONGITUDINAL DA PAREDE AÓRTICA TRATADA COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO, APRESENTANDO CALCIFICAÇÃO MULTIFOCAL E DISCRETA APÓS 15 DIAS DE IMPLANTE. AG SUBGRUPO 15 DIAS (H&E 100x).....	25
FIGURA 8	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE LONGITUDINAL DA PAREDE AÓRTICA, TRATADA COM ETANOL 80%, APRESENTANDO CALCIFICAÇÃO DIFUSA E MODERADA APÓS 30 DIAS DO IMPLANTE. E 80% SUBGRUPO 30 DIAS (von Kossa 100x).....	26
FIGURA 9	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CUSPIDE AÓRTICA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO, COM INFILTRADO INFLAMATÓRIO CRÔNICO TIPO CORPO ESTRANHO. GDA SUBGRUPO 30 DIAS (H&E 200x).....	28
FIGURA 10	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ETANOL 80%, SEM SINAIS DE CALCIFICAÇÃO APÓS 15 DIAS DE IMPLANTE. E 80% SUBGRUPO 15 DIAS (von Kossa 40x).....	30

FIGURA 11	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 15 DIAS DE IMPLANTE. AG SUBGRUPO 15 DIAS (H&E 40x).....	31
FIGURA 12	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 15 DIAS DE IMPLANTE. GDA SUBGRUPO 15 DIAS (von Kossa 100x).....	31
FIGURA 13	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ETANOL 80%, SEM SINAIS DE CALCIFICAÇÃO APÓS 30 DIAS DE IMPLANTE. E 80% SUBGRUPO 30 DIAS (von Kossa 100x) .....	32
FIGURA 14	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 30 DIAS DE IMPLANTE. AG SUBGRUPO 30 DIAS (von Kossa 40x).....	33
FIGURA 15	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 30 DIAS DE IMPLANTE. GDA SUBGRUPO 30 DIAS (H&E 100x).....	33
FIGURA 16	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ETANOL 80%, SEM SINAIS DE CALCIFICAÇÃO APÓS 60 DIAS DE IMPLANTE. E 80% SUBGRUPO 60 DIAS (H&E 40x) .....	34
FIGURA 17	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 60 DIAS DE IMPLANTE. AG SUBGRUPO 60 DIAS (H&E 40x).....	35
FIGURA 18	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 60 DIAS DE IMPLANTE. GDA SUBGRUPO 60 DIAS (von Kossa 40x).....	35
FIGURA 19	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE LONGITUDINAL DA PAREDE AÓRTICA TRATADA COM ETANOL 80%, APRESENTANDO CALCIFICAÇÃO DIFUSA E MODERADA APÓS 15 DIAS DO IMPLANTE. E 80% SUBGRUPO 15 DIAS (von Kossa 100x).....	37
FIGURA 20	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE LONGITUDINAL DE PAREDE AÓRTICA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO, APRESENTANDO CALCIFICAÇÃO DIFUSA E ACENTUADA APÓS 30 DIAS DO IMPLANTE. GDA SUBGRUPO 30 DIAS (von Kossa 100x).....	38

FIGURA 21	FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE LONGITUDINAL DA PAREDE AÓRTICA TRATADA COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO, APRESENTANDO CALCIFICAÇÃO DIFUSA E ACENTUADA, APÓS 60 DIAS DO IMPLANTE. AG SUBGRUPO 60 DIAS (von Kossa 100x).....	39
-----------	---	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	DISTRIBUIÇÃO DE GRUPOS E SUBGRUPOS.....	12
TABELA 2	CALCIFICAÇÃO QUANTO À <u>LOCALIZAÇÃO</u> , SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - <b>CÚSPIDE AÓRTICA</b> .....	22
TABELA 3	CALCIFICAÇÃO QUANTO À <u>INTENSIDADE</u> , SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - <b>CÚSPIDE AÓRTICA</b> .....	23
TABELA 4	CALCIFICAÇÃO QUANTO À <u>LOCALIZAÇÃO</u> , SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - <b>PAREDE DE AORTA</b> .....	24
TABELA 5	CALCIFICAÇÃO QUANTO À <u>INTENSIDADE</u> , SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - <b>PAREDE DE AORTA</b> .....	25
TABELA 6	INFILTRADO INFLAMATÓRIO QUANTO À <u>LOCALIZAÇÃO</u> , SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - <b>CÚSPIDE AÓRTICA</b> .....	27
TABELA 7	INFILTRADO INFLAMATÓRIO QUANTO AO <u>TIPO</u> , SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - <b>CÚSPIDE AÓRTICA</b> .....	27
TABELA 8	INFILTRADO INFLAMATÓRIO QUANTO À <u>LOCALIZAÇÃO</u> , SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - <b>PAREDE DE AORTA</b> .....	28
TABELA 9	INFILTRADO INFLAMATÓRIO QUANTO AO <u>TIPO</u> , SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - <b>PAREDE DE AORTA</b> .....	29

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA CÚSPIDE AÓRTICA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - <b>15 DIAS</b> .....	30
GRÁFICO 2	MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA CÚSPIDE AÓRTICA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - <b>30 DIAS</b> .....	32
GRÁFICO 3	MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA CÚSPIDE AÓRTICA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - <b>60 DIAS</b> .....	34
GRÁFICO 4	MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA CÚSPIDE AÓRTICA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E NOS TEMPO DE OBSERVAÇÃO.....	36
GRÁFICO 5	MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA PAREDE DE AORTA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - <b>15 DIAS</b> .....	36
GRÁFICO 6	MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA PAREDE DE AORTA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - <b>30 DIAS</b> .....	37
GRÁFICO 7	MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA PAREDE DE AORTA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - <b>60 DIAS</b> .....	38
GRÁFICO 8	MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA PAREDE DE AORTA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E NOS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO.....	39

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi analisar comparativamente dois métodos de prevenção da calcificação (etanol 80% e ácido L-glutâmico 0,8%) em cúspide e parede aórtica porcina implantadas no subcutâneo em ratos, tendo como grupo controle as cúspides e os segmentos de parede aórtica fixadas em glutaraldeído (GDA). Foram utilizados 45 ratos jovens, distribuídos em 3 grupos contendo 15 animais cada que por sua vez foram subdivididos em 3 subgrupos de 5 animais nos quais foram implantados, em 2 bolsas no subcutâneo, uma cúspide e um segmento de parede aórtica em cada. Em cada grupo assim nominados: GDA (grupo controle), E80% (grupo cuja as estruturas foram pré-tratadas com etanol 80%) e o AG 0,8% (grupo cuja as estruturas foram pré-tratadas com ácido L-glutâmico 0,8%) foram realizadas a mensuração do cálcio e análise microscópica quanto à presença de calcificação: localização e intensidade da mesma; Infiltrado inflamatório: localização e tipo, no período de 15,30 e 60 dias após implante. Na mensuração do cálcio na cúspide aórtica encontrou-se no grupo E80% 15 dias ( $1,30 \pm 0,21$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido), E80% 30 dias ( $1,05 \pm 0,22$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido) e E80% 60 dias ( $0,53 \pm 0,42$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido); no grupo AG 0,8% 15 dias ( $12,17 \pm 0,66$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido), AG0,8% 30 dias ( $15,31 \pm 2,82$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido) e AG0,8% 60 dias ( $34,24 \pm 16,28$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido) com o grupo controle GDA 15 dias ( $12,44 \pm 2,26$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido), GDA 30 dias ( $13,44 \pm 3,34$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido) e GDA 60 dias ( $50,85 \pm 8,71$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido). Em relação à mensuração do cálcio na parede aórtica, encontrou-se no grupo de E80% 15 dias ( $4,62 \pm 0,68$   $\mu\text{g}$  cálcio/ mg tecido), 3 E80% 30 dias ( $9,47 \pm 2,59$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido) e E80% 60 dias ( $23,56 \pm 7,75$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido) no grupo de AG 0,8% 15 dias ( $4,31 \pm 0,85$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido), AG 0,8% 30 dias ( $7,69 \pm 1,48$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido) e AG 0,8% 60 dias ( $20,50 \pm 1,22$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido) com o grupo controle GDA 15 dias ( $7,34 \pm 1,32$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido), GDA 30 dias ( $9,28 \pm 0,76$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido) e GDA 60 dias ( $27,60 \pm 1,08$   $\mu\text{g}$  cálcio/mg tecido). Na avaliação microscópica da cúspide aórtica houve uma progressiva calcificação naquelas submetidas a fixação com GDA. Esse processo foi parcialmente encontrado com o AG 0,8% e totalmente ausente com o E80%. Quanto à avaliação referente aos segmentos da parede aórtica, também evidenciou-se progressiva calcificação, não sendo inibidas pelos tratamentos com AG 0,8% e E80%. Concluiu-se que o pré-tratamento com etanol a 80% inibiu a calcificação nas cúspides aórticas porcinas, entretanto não teve a mesma eficácia na parede aórtica. Contudo, o ácido L-glutâmico a 0,8% demonstrou minimizar a calcificação na parede aórtica. Estudos devem ser feitos para evidenciar se a ação anticalcificante do etanol a 80% mantém-se em as biopróteses aórticas porcinas forem implantadas no sistema circulatório.

## ABSTRACT

### COMPARATIVE STUDY ON THE EFFICACY OF ETHANOL AND L-GLUTAMIC ACID FOR PREVENTING CALCIFICATION OF PIG CUSPS AND AORTIC WALL. EXPERIMENTAL STUDY IN RATS

This study aims at comparing and analyzing two methods (ethanol 80% and L-glutamic acid 0.8%) to prevent calcification in pig cusps and aortic wall implanted subcutaneously in rats. The cusps and aortic wall segments of the group control were in glutaraldehyde (GDA). We used 45 young rats, distributed in 3 groups of 15 rats each, which in turn were subdivided in 3 subgroups of 5 rats each, in which we implanted one cusp and one aortic wall segment in 2 subcutaneous pouches for each rat. We called each group as follows: GDA (control group), E80% (the group whose structures were previously prepared with ethanol 80% and GA 0.8% (group previously prepared with L-glutamic acid 0.8%); in those groups we measured calcium and performed a microscopic analysis seeking for any calcification, its location and intensity; inflammatory infiltrate, location and type, during a 15, 30, and 60-day period after the implant. Calcium was found in the aortic cusp in the E80% group ( $1.30 \pm 0.21$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue) at day 15, ( $1.05 \pm 0.22$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue) at day 30, and ( $0.53 \pm 0.42$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue) at day 60; in the GA 0.8% group ( $12.17 \pm 0.66$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue) at day 15, ( $15.31 \pm 2.82$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue) at day 30, and ( $34.24 \pm 16.28$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue) at day 60; and in the control group, at day 15 ( $12.44 \pm 2.26$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue), at day 30 ( $13.44 \pm 3.34$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue), and at day 60 ( $50.85 \pm 8.71$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue). As for the calcium measured in the aortic wall, in the E80% group we found ( $4.62 \pm 0.68$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue) at day 15, ( $9.47 \pm 2.59$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue) at day 30, and ( $23.56 \pm 7.75$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue) at day 60; in the GA 0.8% group at day 15 ( $4.31 \pm 0.85$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue), at day 30 ( $7.69 \pm 1.48$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue), and at day 60 ( $20.50 \pm 1.22$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue); and in the control group at day 15 ( $7.34 \pm 1.32$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue), at day 30 ( $9.28 \pm 0.76$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue), at day 60 ( $27.60 \pm 1.08$   $\mu\text{g}$  calcium/mg tissue). Microscopic evaluation of the aortic cusp, showed a progressive calcification in those fixed with GDA. Such process was found partially in the GA 0.8% group, and totally absent in the E80% group. As for the assessment of the aortic wall segments, we also observed progressive calcification, which was not inhibited by the treatment with either GA 0.8% or E80%. We concluded that a pre-treatment with ethanol at 80% inhibited calcification in pig aortic cusps, however it was not as effective on the aortic wall. However, L-glutamic acid at 0.8% did show that it minimizes calcification in the aortic wall. Further studies are required, to evidence if the anti-calcifying action of ethanol 80% is kept if the pig aortic bioprostheses are implanted in the circulatory system.



## 1 INTRODUÇÃO

Cirurgiões vêm investigando e tentando desenvolver um substituto valvar cardíaco ideal há muitos anos. De modo geral, os substitutos valvares cardíacos são divididos em dois tipos: as próteses mecânicas e as biológicas. Estas, por sua vez, podem ser fabricadas de tecido humano ou animal. As próteses de tecidos animal são manufaturadas com pericárdio bovino ou com cúspides porcinas, podendo, ou não, incluir segmento de parede aórtica. (SCHOEN & LEVY, 1999).

Não obstante os avanços das técnicas de reconstrução, muitos dos pacientes submetidos a procedimentos conservadores recebem substitutos valvares. A vantagem da maior durabilidade das válvulas mecânicas é contrabalançada pela necessidade do uso de anticoagulantes para evitar a ocorrência de tromboembolismo. Ao contrário, os portadores de próteses biológicas dispensam anticoagulação indefinida, mas estas são propensas à calcificação e degeneração, sendo necessárias reoperações para substituí-las (COSGROVE, 1987; GOTT et al., 1992).

Tecidos biológicos têm sido usados como substituto valvar desde 1962, quando uma valva aórtica humana fresca foi transplantada (ROSS, 1962). Posteriormente, foram introduzidas próteses manufaturadas com pericárdio bovino (IONESCU et al., 1967; BRAILE et al., 1974), e dura-máter humana (PUIG & VERGINELLI, 1971). O uso do glutaraldeído para a fixação de próteses porcinas foi recebido como um considerável progresso nos processos de conservação dos tecidos biológicos (CARPENTIER et al., 1968). Além da redução da antigenicidade do tecido heterólogo, a fixação obtida pela ligação co-valente foi considerada como vantajosa (CARPENTIER et al., 1968). Nos anos seguintes, a fixação pelo glutaraldeído foi amplamente empregada na manufatura de próteses porcinas e de pericárdio bovino (POTKIN et al., 1988; PELLETIER et al., 1989; VYAVAHARE et al., 1997).

Hoje os tecidos valvares são utilizados em aproximadamente 40% na substituição valvar em todo mundo, porém com diferenças entre os países desenvolvidos e os subdesenvolvidos onde por sua vez utiliza-se mais tecido biológico. (ROSS, 1962; BARRATT-BOYES, 1964; CARPENTIER et al., 1974; SCHOEN & LEVY, 1999). A incidência de falência valvar é ao redor de 10 a 20% em 10 anos em pacientes adultos e 40 a 50% em 4 anos em crianças (CARPENTIER et al., 1984).

O estresse mecânico e o depósito lipídico nas células dos folhetos aórticos porcinos decorrentes da fixação com GDA têm sido indicados como os principais fatores que influenciam a calcificação (AUPART et al., 1996; JAMIESON et al., 1995; SCHELD et al., 1994; GRUNKEMEIER et al., 1995).

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

Dentre os tratamentos investigados estão o emprego do etanol e do ácido L-glutâmico (AG), que se mostraram eficazes quando utilizados como anticalcificantes para o pericárdio bovino. O etanol apresentou efeito anticalcificante no pericárdio bovino de implantes subcutâneos em ratos e de próteses mitrais em ovelhas (VYAVAHARE et al., 1997; LEE et al., 1998; VYAVAHARE et al., 2000).

Vários estudos têm demonstrado a eficácia do etanol como inibidor da calcificação de biopróteses porcinas, sendo seu principal efeito a extração lipídica (VYAVAHARE et al., 1997; VYAVAHARE et al., 2000; SCHOEN & LEVY, 1999; SHEN et al., 2001).

O ácido L-glutâmico, utilizado para tratamento do pericárdio bovino, juntamente com o glutaraldeído, evidenciou diminuir sua toxicidade e melhorar a conservação das células endoteliais, tendo como resultado menor índice de

calcificação (SCHOEN et al., 1988; GOLOMB et al., 1987; GRIMM et al., 1991; GRANBENWOGGER et al., 1992).

Tendo em vista a necessidade de um tratamento anticalcificante eficaz, tanto para as cúspides quanto para a parede aórtica porcina, está sendo proposto um estudo comparativo entre o etanol e o ácido L-glutâmico na prevenção da calcificação nestas estruturas, com implante subcutâneo em ratos jovens, com a perspectiva de minimizar a calcificação e aumentar a durabilidade das biopróteses em pacientes jovens e crianças.

## 1.1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é analisar comparativamente dois métodos de inibição da calcificação de cúspides aórticas porcinas e segmentos de parede aórtica implantados no tecido subcutâneo da região dorsal de ratos jovens no período de 15, 30 e 60 dias após implante.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A falência das biopróteses valvares cardíacas decorrentes da calcificação vem sendo estudada há mais de trinta anos. (PELLETIER et al., 1989; POTKIN et al., 1988; SCHOEN et al., 1992; TURINA et al., 1993; SCHOEN, 1989; SCHOEN, 1991; FERRANS et al., 1987 e 1993; SCHOEN & HOBSON, 1985; SCHOEN & LEVY, 1984 e 1999).

Os mecanismos de falência das biopróteses valvares são progressivos e as razões de sua ocorrência são dependentes do tempo e do estresse mecânico a que elas são submetidas (SCHOEN et al., 1992; TURINA et al., 1993; BLOOMFIELD et al., 1991; SCHOEN, 1989 e 1991; FERRANS et al., 1993; JAMIESON et al., 1995; GRUNKEMEIER et al., 1994; SCHOEN & LEVY, 1999).

No trabalho de SCHOEN et al. (1987), estudaram-se próteses removidas após longo período de implante. Nas 32 próteses porcinas excisadas 36 a 156 meses depois do implante, o conteúdo médio de cálcio foi 113 µg/mg de tecido. O valor máximo foi de, aproximadamente, 200-250 µg/mg de tecido. Inexplicavelmente, em algumas próteses havia um mínimo teor de cálcio, e até mesmo este estava ausente depois de 10 ou mais anos.

Aproximadamente 75% das próteses porcinas disfuncionantes apresentam regurgitação causada por ruptura de cúspides calcificadas (SCHOEN, 1989 e 1991; SCHOEN & HOBSON, 1985; SCHOEN & LEVY, 1984).

A calcificação inicia-se, tipicamente, dentro da cúspide (mineralização intrínseca) (SCHOEN, 1989 e 1991; SCHOEN & HOBSON, 1985; SCHOEN & LEVY, 1984 e 1986; FERRANS et al., 1980; SCHOEN et al., 1988). Os depósitos de cálcio predominam no tecido comissural adjacente ao pilar de sustentação e na base de fixação marginal, áreas onde a curvatura dos folhetos provoca a deformação e o estresse mecânico máximos. Podem ocorrer também em trombos aderidos ou vegetações infectadas (mineralização extrínseca) (SCHOEN, 1989 e 1991; SCHOEN

& HOBSON, 1985; SCHOEN & LEVY, 1984 e 1986; FERRANS et al., 1980; SCHOEN et al., 1988).

SCHOEN & LEVY (1999) vêm estudando, há longo tempo, os mecanismos da calcificação dos tecidos bioprotéticos, na clínica e experimentalmente, e afirmam que a patologia e a fisiopatologia independem do local de implante, e, por isso, este estudo pode ser feito em modelos experimentais. (SCHOEN, 1991; SCHOEN et al., 1985, 1986, 1988 e 1994; SCHOEN & LEVY, 1984 e 1986; LEVY et al., 1983).

Do mesmo modo que ocorre em pacientes jovens, em animais imaturos a calcificação se faz aceleradamente. Calcificação similar à que ocorre em espécimes clínicos observa-se três semanas após implantes praticados no tecido subcutâneo de ratos desmamados com idade de três semanas. O nível máximo de 200-250 µg/mg de tecido é alcançado na idade de aproximadamente oito semanas (SCHOEN et al., 1985 e 1986; LEVY et al., 1983).

Partindo do fato de que a calcificação é o principal fator que contribui para o processo patológico da falência protética, extensos estudos foram realizados para seu entendimento e prevenção. Basicamente, três estratégias foram seguidas: (a) terapia sistêmica com agentes anticalcificantes; (b) terapia local com dispositivo implantado de liberação de drogas; (c) biomaterial modificado, para remoção do componente calcificante, adição de agentes exógenos, ou alteração química (SCHOEN et al., 1992; VYAVAHARE et al., 1997).

LEVY et al. Relataram, em 1987, que a calcificação de tecidos utilizados em biopróteses implantados no tecido subcutâneo de ratos pode ser prevenida por doses adequadas de agentes que se empregam no tratamento de doenças metabólicas ósseas, mas alertaram que aquelas drogas interferem na calcificação fisiológica. Animais tratados com doses suficientes para evitar a calcificação apresentaram atraso no crescimento ósseo, o que provavelmente impediria seu uso generalizado.

Estudos de LEVY et al. (1985), JOHNSTON et al. (1992 e 1993), demonstraram que substâncias como o acetato de etileno-vinil e outros polímeros são efetivas em modelos animais, desde que sejam liberadas controladamente na proximidade das próteses, prevenindo os efeitos sistêmicos.

Várias substâncias, com mecanismos específicos de ação e ausência de efeitos adversos, demonstraram potencial utilidade clínica como agentes anticalcificantes (SCHOEN & LEVY, 1999). Dentre elas, citam-se: os difosfonatos (LEVY et al., 1985 e 1987; JOHNSTON et al., 1992 e 1993) , íons metal trivalente (WEBB et al., 1991; LEVY et al., 1991), ácido amino-oléico (CHEN et al., 1994a; CHEN et al., 1994b; GOTT et al., 1997), surfactantes (SCHOEN et al., 1992; HIRSCH et al., 1993), decelularização (WILSON et al., 1995; COURTMAN et al., 1994; COURTMAN et al., 1995), etanol (VYAVAHARE et al., 1997, 1998 e 2000; SHEN et al., 2001), ácido L-glutâmico (GRABENWOGER et al., 1992; GRIMM et al., 1991).

LEVY et al., em 1987, verificaram que compostos difosfonatos usados no pré-tratamento de segmentos de valvas aórticas porcinas fixadas em glutaraldeído implantadas no tecido subcutâneo de ratos inibiram a calcificação.

Segundo WEBB et al., 1991, o pré-tratamento com  $\text{FeCl}_3$  ou  $\text{AlCl}_3$  de cúspides porcinas e pericárdio bovino, fixados em glutaraldeído inibiu a calcificação quando estes tecidos foram implantados no subcutâneo de ratos. Estes cátions atuam formando fosfatos complexos, prevenindo a formação de fosfatos de cálcio que são ativos quando liberados de um polímero controle implantado. Tanto o cloreto de ferro quanto o cloreto de alumínio alteram a molécula da elastina de maneira a evitar a calcificação.

CHEN et al. (1994) sugeriram que o ácido 2-alfa-amino-oléico (AOA®; Biomedical Design, Atlanta, GA) apresenta ligações covalentes com o tecido da bioprótese pela ligação amino ao aldeído residual, que desempenha sua função, além de inibir o fluxo de cálcio através da cúspide da bioprótese. O ácido 2-alfa-amino-oléico é efetivo na minimização da calcificação da cúspide aórtica porcina,

mas não é efetivo na parede aórtica porcina, tanto no implante subcutâneo em ratos como no sistema cardiovascular (CHEN et al., 1994b; GOTT, 1997).

O tratamento do tecido das biopróteses com surfactantes (sulfato dodecil de sódio) (SDS) e outros detergentes extrai a maioria dos fosfolipídeos da célula, levando à redução da mineralização da célula (SCHOEN et al., 1992; HIRSCH et al., 1993).

Pelo fato de a mineralização ocorrer no interior das células conectivas desvitalizadas do tecido das biopróteses, procurou-se retirar estas células, obtendo uma matriz menos propensa ao acúmulo de cálcio. É o processo de decelularização, proposto por autores como WILSON et al., 1995; COURTMAN et al., 1994 e 1995.

Ainda nessa linha, VYAVARARE et al., (1997), referem que próteses porcinas fixadas pelo glutaraldeído, quando tratadas previamente com etanol a 80%, têm a calcificação prevenida em trocas valvares mitrais em ovelhas e implante subcutâneo em ratos. O tratamento com etanol promoveu a extração quase total dos fosfolipídeos e do colesterol e causou uma alteração permanente na conformação do colágeno. Nas cúspides, há uma interação da água com os lipídeos que aumenta a resistência à ação da colagenase (VYAVARARE et al., 1998).

O pericárdio bovino foi estudado quanto à ação do ácido L-glutâmico como agente anticalcificante. Diminuição acentuada no teor de cálcio foi notada em segmentos implantados no tecido subcutâneo de ratos, quando tratados pelo ácido L-glutâmico após fixação com glutaraldeído, o que foi atribuído à diminuição da ação adversa do aldeído. (GRIMM et al., 1991; GRABENWOGER et al., 1992).

SHEN et al., (2001), verificaram que o etanol ou o etanol e éter associados ao tratamento do pericárdio bovino por glutaraldeído e surfactante diminuem a calcificação dos segmentos implantados em subcutâneo de ratos jovens.

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

---

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Operatória da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) , no Laboratório da Cardioprótese Ltda. e Laboratório de Patologia da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba.

Foram adotadas as Normas de Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (2000) e a Nomina Anatômica Veterinária (1983). Respeitaram-se os princípios éticos de experimentação animal, conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (PEREIRA et al., 1998).

#### 3.1 MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 45 ratos machos (*Rattus norvegicus*), clinicamente sadios da linhagem Wistar, com o peso entre 84 a 109 g, proveniente do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Os animais foram divididos em 3 grupos de 15. Cada grupo foi subdividido em 3 lotes de 5 animais, estudados depois de 15, 30 e 60 dias de observação, conforme TABELA 1.

- **Grupo GDA** (n= 15) - (grupo controle) Cúspides e paredes aórticas porcinas conservadas em glutaraldeído.

- **Grupo E 80%** (n=15) - Cúspides e paredes aórticas porcinas pré-tratadas com glutaraldeído e após tratamento e conservação em solução de etanol a 80%.

- **Grupo AG** (n=15) - Cúspides e paredes aórticas porcinas pré-tratadas com glutaraldeído e após tratamento e conservação em solução de ácido L-glutâmico a 0,8%.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DE GRUPOS E SUBGRUPOS

GRUPOS		PROCEDIMENTO	TEMPO DE OBSERVAÇÃO
GDA	n= 15	Implante de cúspide	Grupo GDA15 n= 5 15 dias
		+	Grupo GDA30 n= 5 30 dias
		Parede de aorta	Grupo GDA60 n= 5 60 dias
E80%	n= 15	Implante de cúspide	Grupo E80%15 n= 5 15 dias
		+	Grupo E80%30 n= 5 30 dias
		Parede de aorta	Grupo E80%60 n= 5 60 dias
AG	n= 15	Implante de cúspide	Grupo AG15 n= 5 15 dias
		+	Grupo AG30 n= 5 30 dias
		Parede de aorta	Grupo AG60 n= 5 60 dias

### 3.2 PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO

Os ratos foram mantidos no Biotério da PUC-PR, onde receberam ração balanceada para espécie (Nuvitab CR1®) durante todo o período de crescimento.

No momento do implante, foram submetidos a tricotomia da região dorsal e antissepsia com álcool iodado. Para a feitura das lojas subcutâneas, os animais foram anestesiados com éter sulfúrico durante todo procedimento.

### 3.3 ANESTESIA

Os animais foi colocados em decúbito ventral na mesa operatória. A anestesia induzida via inalatória com éter sulfúrico e mantida durante todo o procedimento. Após o implante da cúspide e parede aórtica nas lojas na região dorsal, os animais foram colocados em gaiolas apropriadas, com cinco ratos cada.

### 3.4 OBTENÇÃO DAS CÚSPIDES E PAREDES DE AORTA PORCINA

As cúspides e paredes aórticas foram obtidas no Laboratório de Valvas Cardíacas (Cardioprótese®), onde foram preparadas conforme o solicitado pelo pesquisador.

#### 3.4.1 Procedimento Químico

Todas as cúspides aórticas foram obtidas de valvas aórticas de corações porcinos, obtendo-se então as 3 cúspides de cada valva. Após esta separação, foram também recortados segmentos da parede de aorta com tamanhos de 1cm x 1cm e preparados com a mesma metodologia utilizadas para as cúspides.

As 45 cúspides e os segmentos de paredes aórticas foram fixados em solução de glutaraldeído 0,6% (Urcacid®) com 50mmol/L HEPES (Solução Tampão), pH 7.4, durante 24 horas em recipientes apropriados. Após 24 horas foram deixados em solução de glutaraldeído 0,2% (GDA 0,2%) (Urcacid®) (GDA 0,2%) com solução HEPES durante 7 dias, para completar a fixação.

Após os 7 dias, a solução de GDA 0,2% foi trocada e as estruturas permaneceram por mais 24 horas em solução.

Depois de 24 horas, todas as cúspides e os segmentos de parede de aorta foram lavados 5 vezes com solução salina isotônica 0,9% à temperatura ambiente.

Até esse momento todas as cúspides e os segmentos da parede de aorta foram fixados de maneira idêntica.

Terminada essa preparação básica, 15 cúspides e 15 segmentos de parede aórtica foram lavados 3 vezes em solução salina isotônica 0,9% e colocados durante 24 horas em solução aquosa de ácido L-glutâmico a 0,8%, pH 3.5 (Gibco BRL®). Depois desse período, foram lavados 5 vezes com solução salina isotônica 0,9% e armazenados nesta última solução.

Quinze cúspides e os segmentos de parede de aorta foram lavados em salina isotônica 0,9% 3 vezes e colocados durante 24 horas sob agitação constante, em solução de etanol 80% (Labsynth®) com tampão HEPES à temperatura de 25° C.

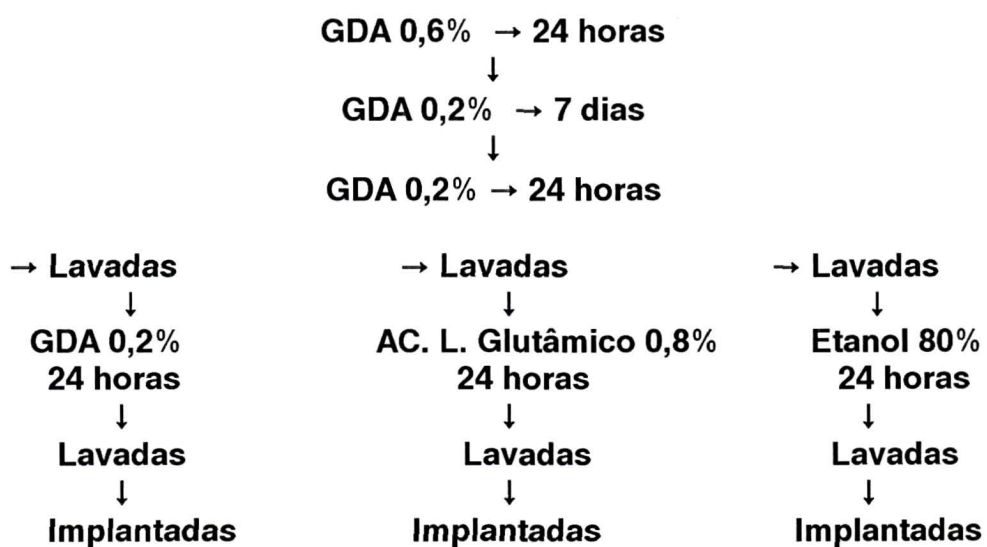
Finalizado esse período ambos foram lavados 5 vezes cada em solução salina isotônica 0,9% e armazenados nesta última solução.

As 15 cúspides e paredes de aorta restantes foram mantidas em glutaraldeído e lavadas antes do implante, utilizadas como grupo controle.

FIGURA 1 - RAIZ AÓRTICA PORCINA, DA QUAL FORAM OBTIDAS AS CÚSPIDES E O SEGMENTO DE PAREDE AÓRTICA



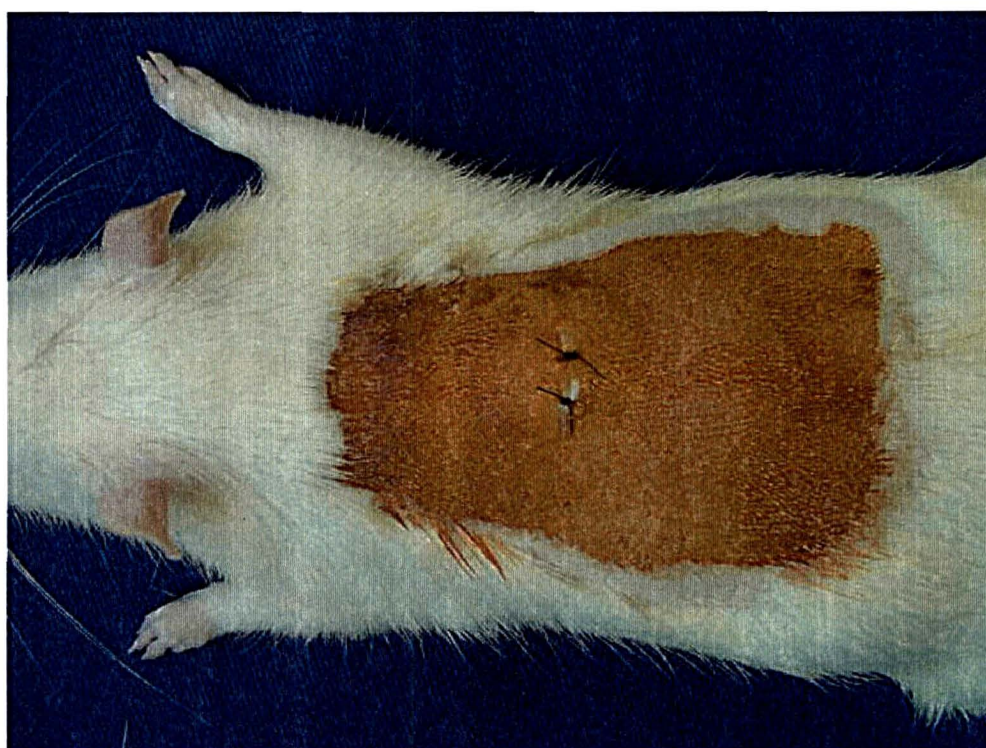
**Processo Químico esquemático:**



### 3.5 TÉCNICA OPERATÓRIA

A equipe cirúrgica foi formada por duas pessoas: o autor, que foi o cirurgião, e um médico veterinário do Departamento de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental de PUC-PR, que realizou as anestésias.

FIGURA 2 – RATO ANESTESIADO, EM DECÚBITO VENTRAL APÓS REALIZADO O IMPLANTE DAS ESTRUTURAS ESTUDADAS



Os ratos foram tricotomizados na região dorsal, posicionados na mesa cirúrgica em decúbito ventral. A antissepsia da região operatória foi feita com uma solução de tintura de polivinilpirrolidona (Povidine®).

Foram realizadas incisões de aproximadamente 2cm na região dorsal e confeccionadas duas lojas subcutâneas para o implante da cúspide e parede de aorta.

Para a sutura da incisão, foi utilizado fio de mononylon 3-0 monofilamentar (Mononylon®, Ethicon).

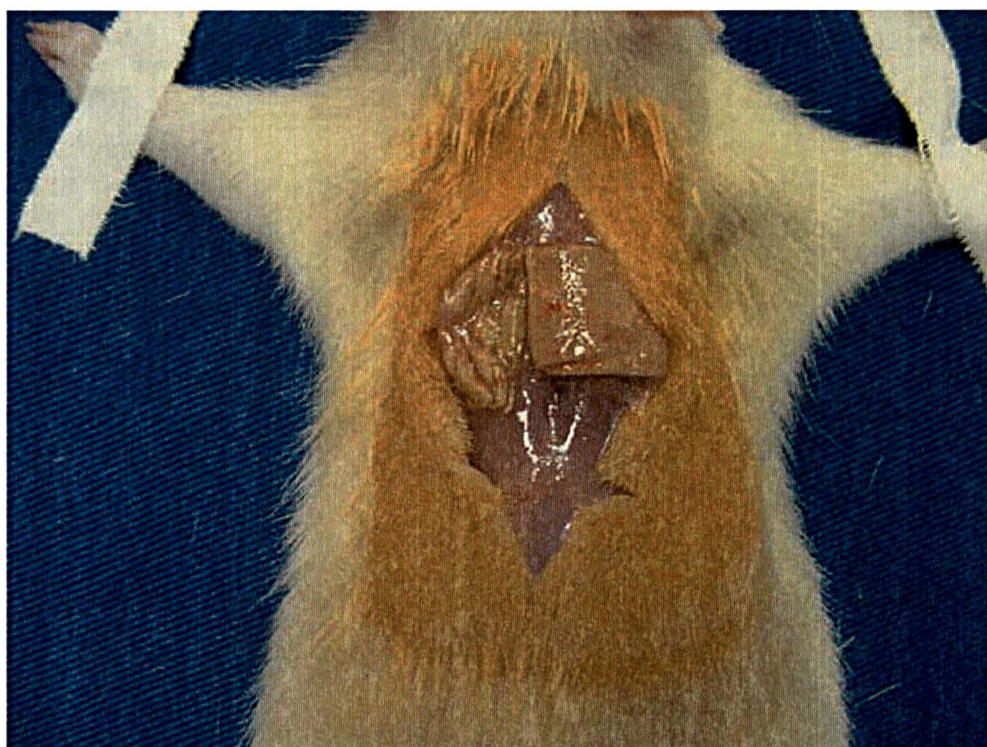
### 3.6 OBSERVAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

Após o ato operatório, os ratos foram marcados com canetas especiais para identificação e colocados em gaiolas apropriadas. Em cada gaiola ficaram cinco ratos.

Os ratos foram mantidos com alimentação e cuidados usuais do biotério, observados e submetidos ao sacrifício em 15, 30 e 60 dias.

O sacrifício dos ratos foi feito por intoxicação anestésica com éter sulfúrico em recipiente fechado.

FIGURA 3 – RATO EM DECÚBITO VENTRAL APÓS SACRIFÍCIO, QUANDO SE REALIZOU RETIRADA DA CÚSPIDE E DO SEGMENTO DE PAREDE AÓRTICA



Quando da retirada das peças, foi realizada incisão longitudinal na região dorsal, para análise microscópica e mensuração do cálcio por espectrofotometria de absorção atômica com atomização em chama.

### 3.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA

#### 3.7.1 Análise Microscópica

As peças cirúrgicas, tanto os segmentos de aorta quanto as cúspides, foram fixadas em solução de formalina a 10% e encaminhadas para análise microscópica.

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

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

Realizaram-se cortes de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de espessura, corados com hematoxilina-eosina (H&E) e von Kossa (método específico para visualização de calcificação). Utilizou-se microscópio tetraocular (*American Optical*) para a análise.

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

#### Cúspide Aórtica:

##### I Calcificação:

##### 1- Localização

I 1a - focal

I 1b - multifocal

I 1c - difusa

I 1d - ausente.

##### 2 - Intensidade

I 2 a- discreta

I 2 b – moderada

I 2 c - acentuada.

## II -Infiltrado inflamatório:

### 1 - Localização

II 1 a – focal

II 1b – difuso

II 1c - ausente.

### 2 – Tipo

II 2a – agudo

II 2b -crônico discreto

II 2c - granulomatoso moderado.

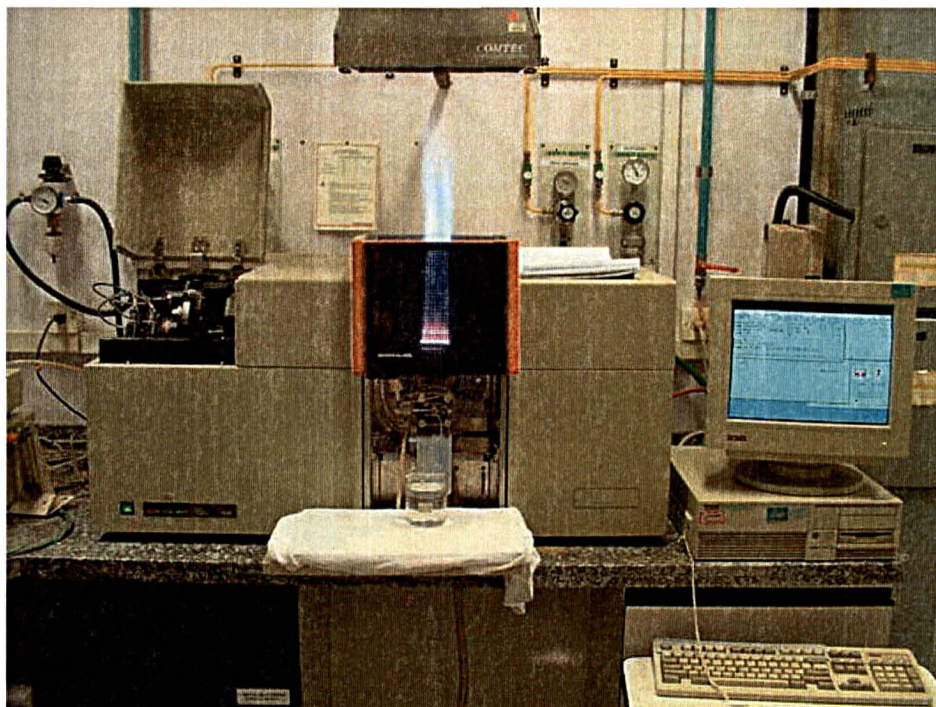
### - Parede de Aorta:

Para a parede de aorta foi utilizado o mesmo protocolo histológico da cúspide aórtica, com as mencionadas subdivisões.

## 3.8 MENSURAÇÃO DO CÁLCIO

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

FIGURA 4 – APARELHO UTILIZADO PARA MENSURAÇÃO DO CÁLCIO, ESPECTRÔMETRO PERKIN ELMER, 4100



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

### 3.9 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Recorreu-se à análise descritiva dos dados pelas tabelas, quadros e gráficos. Foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA) e os testes paramétrico “t de Student” e o não-paramétrico “Mann-Whitney” (utiliza-se software “Primer of Biostatistics”).

O teste da ANOVA também foi utilizado para amostras relacionadas (“Repetead Measures ANOVA”), os demais para amostras independentes. O nível de significância (probabilidade de significância) mínimo adotado foi de 5% (0,05).



## 4 RESULTADOS

Não houve óbito durante o procedimento cirúrgico, ou no período pós-operatório.

### 4.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA

#### 4.1.1 Calcificação

##### *Cúspide Aórtica*

Conforme se observa nas tabelas 2 e 3, houve calcificação progressiva das cúspides valvares submetidas ao tratamento com GDA. Esse processo foi parcialmente encontrado com o ácido L-glutâmico e totalmente ausente com o etanol.

TABELA 2 - CALCIFICAÇÃO QUANTO À LOCALIZAÇÃO, SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - CÚSPIDE AÓRTICA

LOCALIZAÇÃO	ÁCIDO L- GLUTÂMICO		ETANOL 80%		GDA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>15 DIAS</b>						
• Ausente	01	20,0	05	100,0	-	-
• Difusa	03	60,0	-	-	05	100,0
• Focal	01	20,0	-	-	-	-
<b>30 DIAS</b>						
• Ausente	-	-	05	100,0	-	-
• Difusa	03	60,0	-	-	05	100,0
• Multifocal	02	40,0	-	-	-	-
<b>60 DIAS</b>						
• Ausente	-	-	05	100,0	-	-
• Difusa	03	60,0	-	-	05	100,0
• Focal	01	20,0	-	-	-	-
• Multifocal	01	20,0	-	-	-	-

E em relação à intensidade, também foi constatada ausência de calcificação. (Tabela 3).

TABELA 3 - CALCIFICAÇÃO QUANTO À INTENSIDADE, SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - CÚSPIDE AÓRTICA

INTENSIDADE	ÁCIDO L-GLUTÂMICO		ETANOL 80%		GDA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>15 DIAS</b>						
• Ausente	01	20,0	05	100,0	-	-
• Discreta	01	20,0	-	-	-	-
• Moderada	03	60,0	-	-	05	100,0
• Acentuada	-	-	-	-	-	-
<b>30 DIAS</b>						
• Ausente	-	-	05	100,0	-	-
• Moderada	03	60,0	-	-	-	-
• Acentuada	02	40,0	-	-	05	100,0
<b>60 DIAS</b>						
• Ausente	-	-	05	100,0	-	-
• Moderada	01	20,0	-	-	-	-
• Acentuada	04	80,0	-	-	05	100,0

FIGURA 5 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO EM QUE SE OBSERVA UMA ACENTUADA E INTENSA CALCIFICAÇÃO APÓS 30 DIAS DE IMPLANTE. AG SUBGRUPO 30 DIAS (von Kossa 40x)

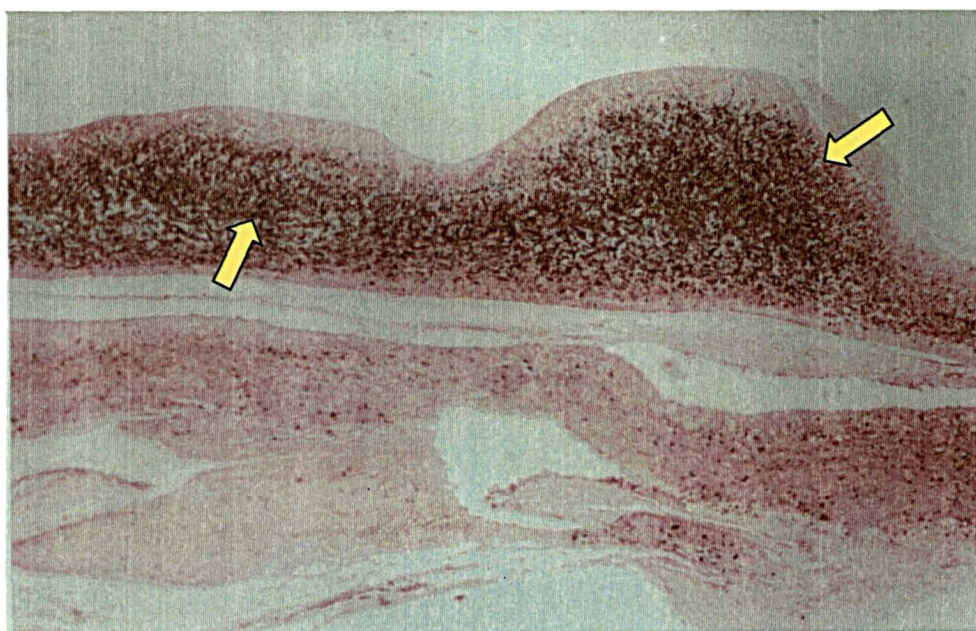
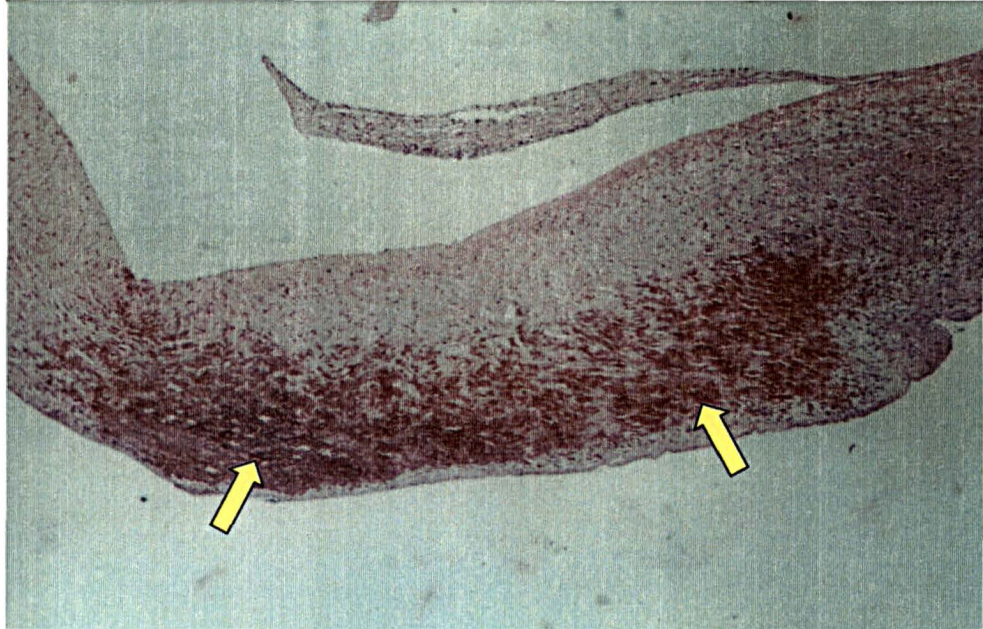


FIGURA 6 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO, EM QUE SE OBSERVOU UMA ACENTUADA E DIFUSA CALCIFICAÇÃO APÓS 60 DIAS DE IMPLANTE. GDA SUBGRUPO 60 DIAS (H&E 40x)



### *Parede de Aorta*

Os segmentos de parede aórtica também demonstraram calcificação progressiva, não sendo inibidos pelos tratamentos com ácido L-glutâmico e etanol.

Conforme demonstrado nas tabelas 4 e 5.

TABELA 4 - CALCIFICAÇÃO QUANTO À LOCALIZAÇÃO, SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - PAREDE DE AORTA

LOCALIZAÇÃO	ÁCIDO L-GLUTÂMICO		ETANOL 80%		GDA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>15 DIAS</b>						
• Difusa	02	40,0	05	100,0	05	100,0
• Focal	01	20,0	-	-	-	-
• Multifocal	02	40,0	-	-	-	-
<b>30 DIAS</b>						
• Difusa	05	100,0	05	100,0	05	100,0
<b>60 DIAS</b>						
• Difusa	05	100,0	05	100,0	05	100,0

Em relação à intensidade da calcificação, verificou-se que tanto os segmentos submetidos à conservação com etanol 80% quanto os submetidos ao GDA apresentaram intensidade moderada aos 15 dias e 30 dias. Aos 60 dias ambos apresentaram intensidade moderada (20,0%) e acentuada (80,0%) (Tabela 5).

FIGURA 7 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE LONGITUDINAL DA PAREDE AÓRTICA TRATADA COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO, APRESENTANDO CALCIFICAÇÃO MULTIFOCAL E DISCRETA APÓS 15 DIAS DE IMPLANTE. AG SUBGRUPO 15 DIAS (H&E 100x)

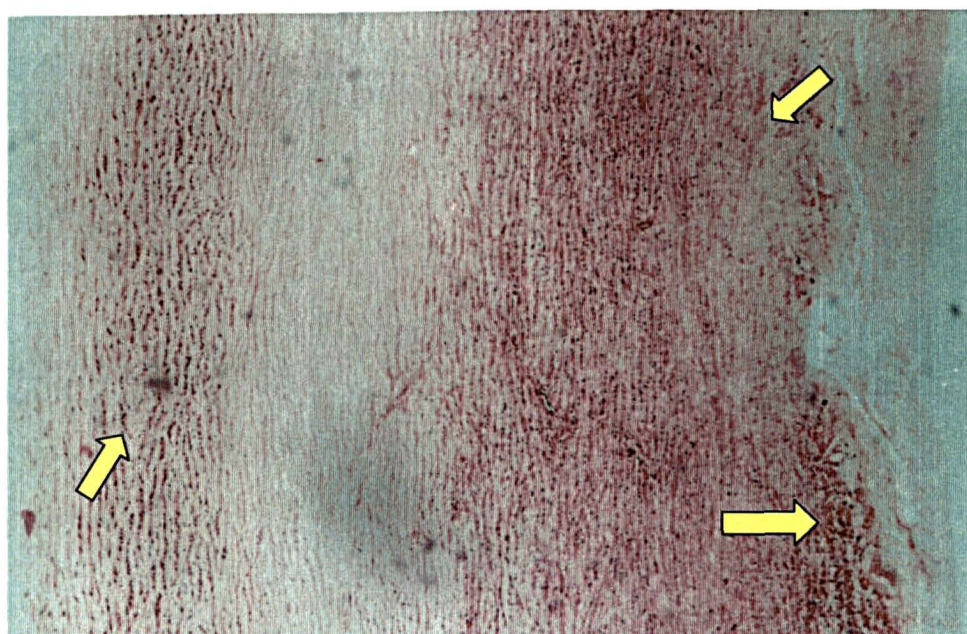
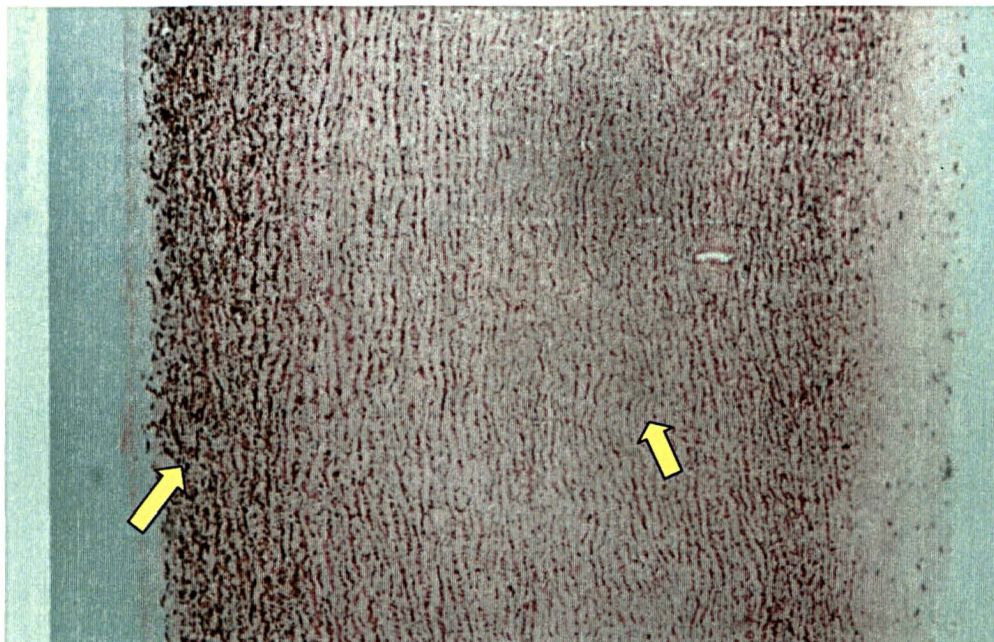


TABELA 5 - CALCIFICAÇÃO QUANTO À INTENSIDADE, SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - PAREDE DE AORTA

INTENSIDADE	ÁCIDO L-GLUTÂMICO		ETANOL 80%		GDA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>15 DIAS</b>						
• Discreta	05	100,0	-	-	-	-
• Moderada	-	-	05	100,0	05	100,0
<b>30 DIAS</b>						
• Moderada	05	100,0	05	100,0	05	100,0
<b>60 DIAS</b>						
• Moderada	-	-	01	20,0	01	20,0
• Acentuada	05	100,0	04	80,0	04	80,0

FIGURA 8 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE LONGITUDINAL DA PAREDE AÓRTICA, TRATADA COM ETANOL 80%, APRESENTANDO CALCIFICAÇÃO DIFUSA E MODERADA APÓS 30 DIAS DO IMPLANTE. E 80% SUBGRUPO 30 DIAS (von Kossa 100x)



#### 4.1.2 Infiltrado Inflamatório

##### *Cúspide Aórtica*

Em relação ao infiltrado inflamatório na cúspide aórtica, observa-se que o método de conservação no qual utilizou-se o ácido L-glutâmico apresentou localização focal, em todos os casos do período de 60 dias (Tabela 6).

TABELA 6 - INFILTRADO INFLAMATÓRIO QUANTO À LOCALIZAÇÃO, SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - CÚSPIDE AÓRTICA

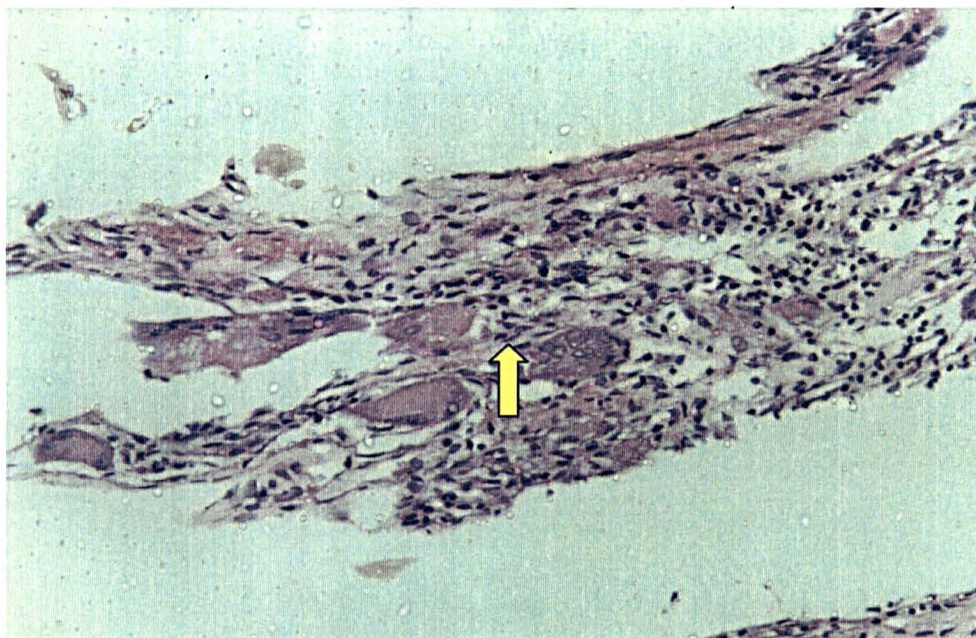
LOCALIZAÇÃO	ÁCIDO GLUTÂMICO		ETANOL 80%		GDA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>15 DIAS</b>						
• Focal	03	60,0	03	60,0	05	100,0
• Difuso	02	40,0	02	40,0	-	-
<b>30 DIAS</b>						
• Focal	02	40,0	03	60,0	-	-
• Difuso	03	60,0	02	40,0	05	100,0
<b>60 DIAS</b>						
• Focal	05	100,0	04	80,0	04	80,0
• Difuso	-	-	01	20,0	01	20,0

Em relação ao tipo, observa-se que o método de conservação do ácido L-glutâmico permaneceu inalterado em todos os tempos de observação (Tabela 7).

TABELA 7 - INFILTRADO INFLAMATÓRIO QUANTO AO TIPO, SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - CÚSPIDE AÓRTICA

INTENSIDADE	ÁCIDO GLUTÂMICO		ETANOL 80%		GDA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>15 DIAS</b>						
• Crônico Discreto	03	60,0	03	60,0	04	80,0
• Crônico Granulomatoso	02	40,0	02	40,0	01	20,0
Moderado						
<b>30 DIAS</b>						
• Crônico Discreto	03	60,0	01	20,0	02	40,0
• Crônico Granulomatoso	02	40,0	04	80,0	03	60,0
Moderado						
<b>60 DIAS</b>						
• Crônico Discreto	03	60,0	03	60,0	04	80,0
• Crônico Granulomatoso	02	40,0	02	40,0	01	20,0
Moderado						

FIGURA 9 – FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSO DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO, COM INFILTRADO INFLAMATÓRIO CRÔNICO, TIPO CORPO ESTRANHO. GDA SUBGRUPO 30 DIAS (H&E 200x)



### *Parede de Aorta*

Em relação ao infiltrado inflamatório na parede de aorta, observa-se que todos os métodos de conservação apresentaram localização focal, em todos os tempos de observação (Tabela 8).

TABELA 8 – INFILTRADO INFLAMATÓRIO QUANTO À LOCALIZAÇÃO, SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - PAREDE DE AORTA

LOCALIZAÇÃO	ÁCIDO GLUTÂMICO		ETANOL 80%		GDA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>15 DIAS</b>						
• Focal	05	100,0	05	100,0	05	100,0
<b>30 DIAS</b>						
• Focal	05	100,0	05	100,0	05	100,0
<b>60 DIAS</b>						
• Focal	05	100,0	05	100,0	05	100,0

Em relação ao tipo, verifica-se que o método de conservação do ácido L-glutâmico apresentou em todos os casos, intensidade crônico discreto para o período de 60 dias (Tabela 9).

TABELA 9 - INFILTRADO INFLAMATÓRIO QUANTO AO TIPO, SEGUNDO OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO - PAREDE DE AORTA

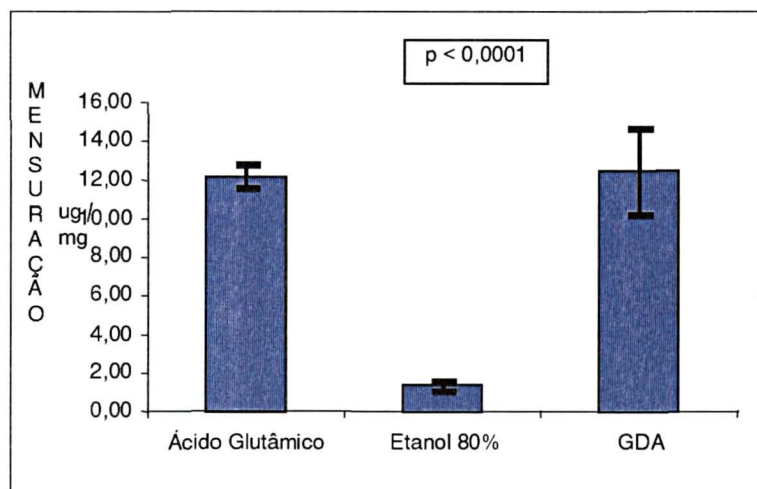
INTENSIDADE	ÁCIDO GLUTÂMICO		ETANOL 80%		GDA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>15 DIAS</b>						
• Crônico Discreto	02	40,0	02	40,0	02	40,0
• Crônico Granulomatoso	03	60,0	03	60,0	03	60,0
Moderado						
<b>30 DIAS</b>						
• Crônico Discreto	03	60,0	-	-	02	40,0
• Crônico Granulomatoso	02	40,0	05	100,0	03	60,0
Moderado						
<b>60 DIAS</b>						
• Crônico Discreto	05	100,0	03	60,0	04	80,0
• Crônico Granulomatoso	-	-	02	40,0	01	20,0
Moderado						

#### 4.2 MENSURAÇÃO DO CÁLCIO

Na comparação da mensuração do cálcio, da cúspide aórtica, entre os métodos de conservação (grupo de estudo), em cada tempo de observação, separadamente, foi constatada significância estatística, em todos os tempos de observação:

- O método de conservação etanol 80% apresentou menor mensuração do cálcio, em 15 dias ( $p < 0,0001$ ) (Gráfico 1); 30 ( $p < 0,0001$ ) (Gráfico 2) e 60 ( $p < 0,0001$ ) (Gráfico 3);

GRÁFICO 1 - MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA CÚSPIDE AÓRTICA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - 15 DIAS



FONTE: Quadro 1

FIGURA 10 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ETANOL 80%, SEM SINAIS DE CALCIFICAÇÃO APÓS 15 DIAS DE IMPLANTE. E 80% SUBGRUPO 15 DIAS (von Kossa 40x)

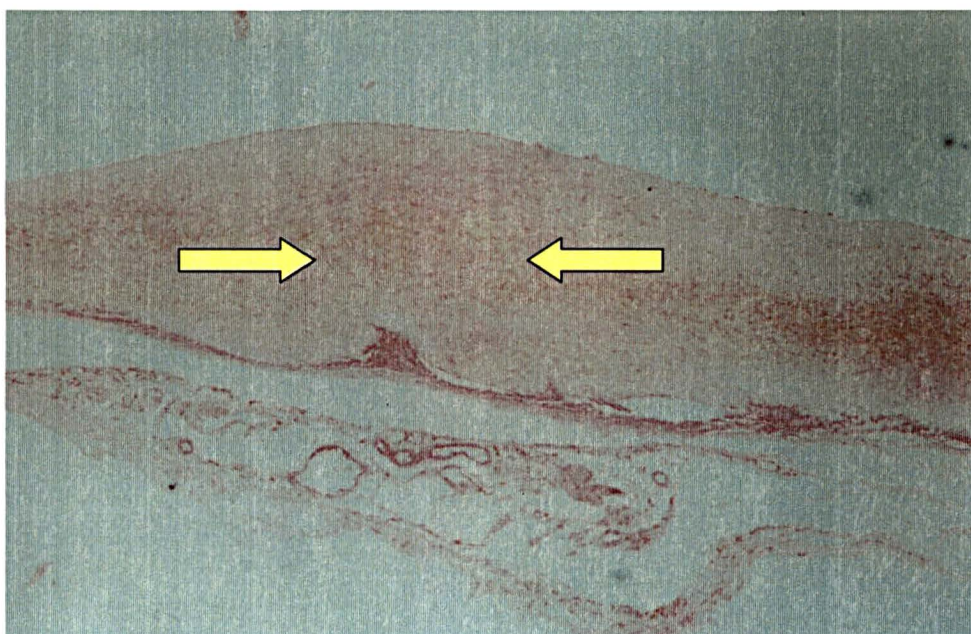


FIGURA 11 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 15 DIAS DE IMPLANTE. AG SUBGRUPO 15 DIAS (H&E 40x)

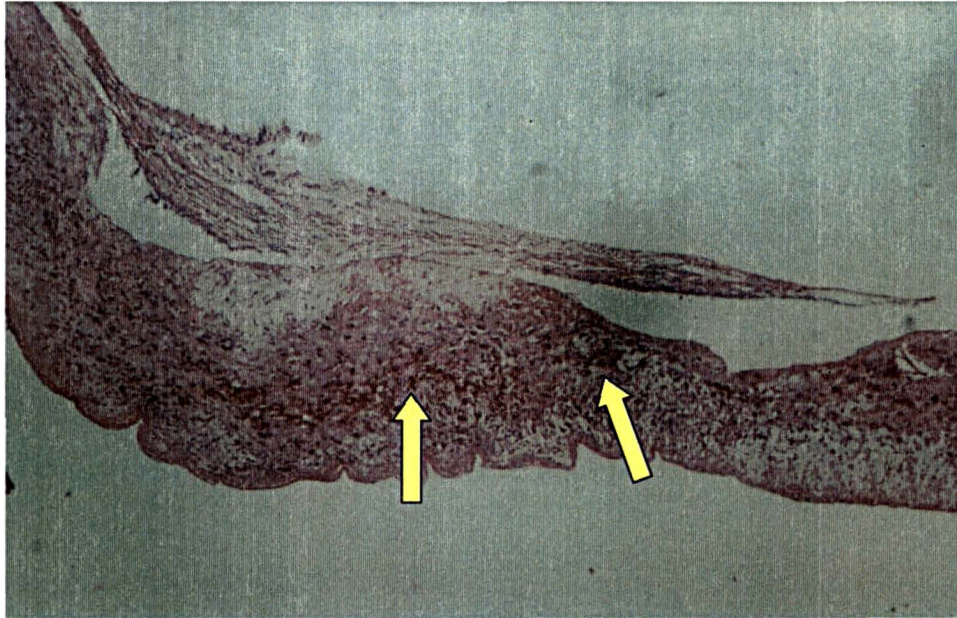


FIGURA 12 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 15 DIAS DE IMPLANTE. GDA SUBGRUPO 15 DIAS (von Kossa 100x)

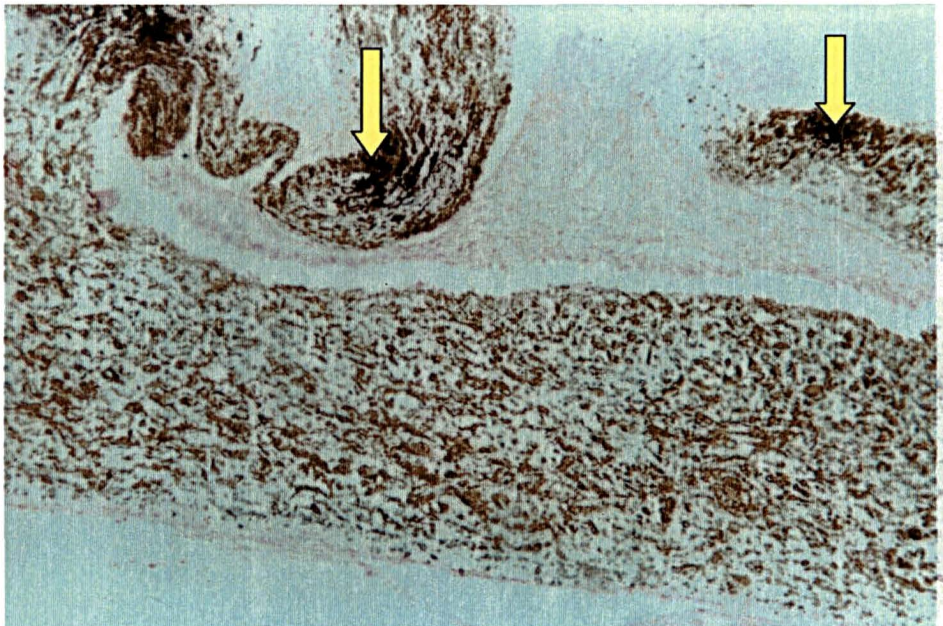
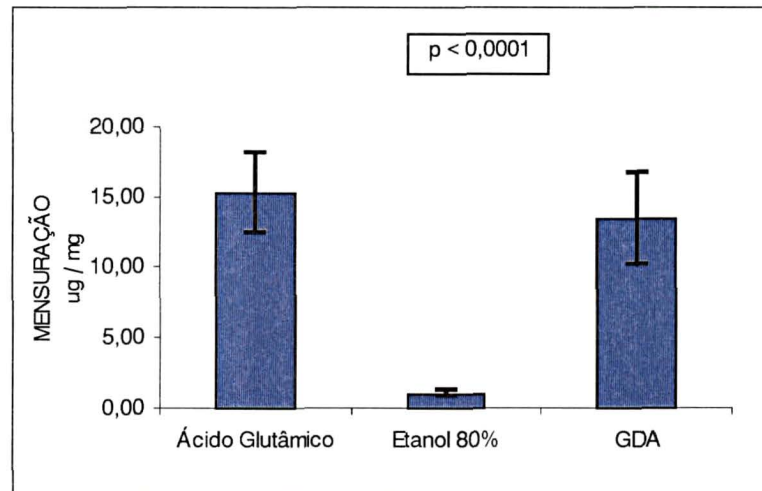


GRÁFICO 2 - MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA CÚSPIDE AÓRTICA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - 30 DIAS



FONTE: Quadro 1

FIGURA 13 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ETANOL 80%, SEM SINAIS DE CALCIFICAÇÃO APÓS 30 DIAS DE IMPLANTE. E 80% SUBGRUPO 30 DIAS (von Kossa 100x)

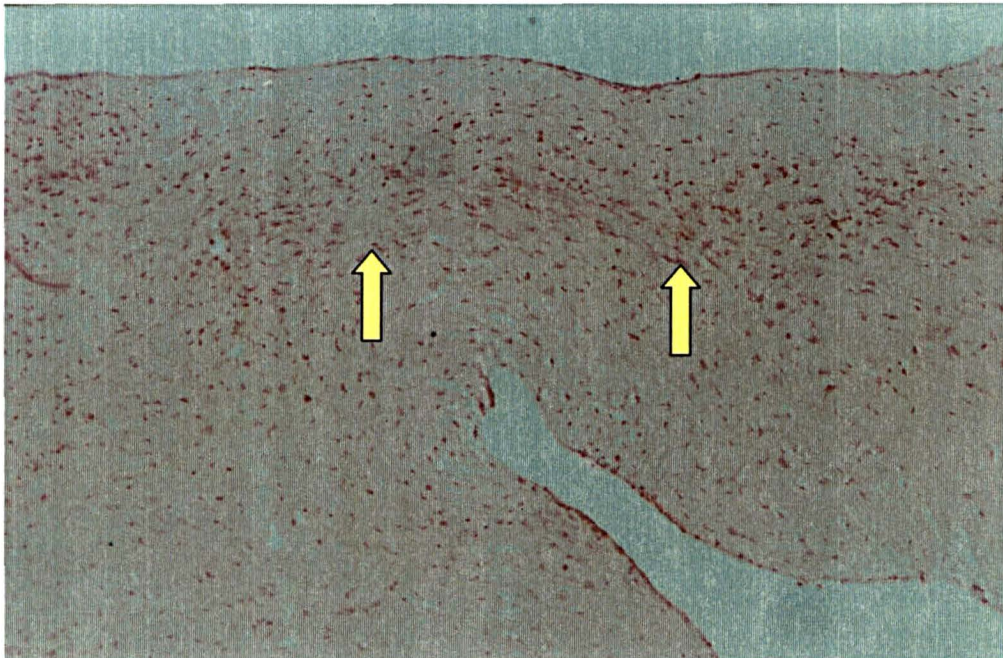


FIGURA 14 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 30 DIAS DE IMPLANTE. AG SUBGRUPO 30 DIAS (von Kossa 40x)

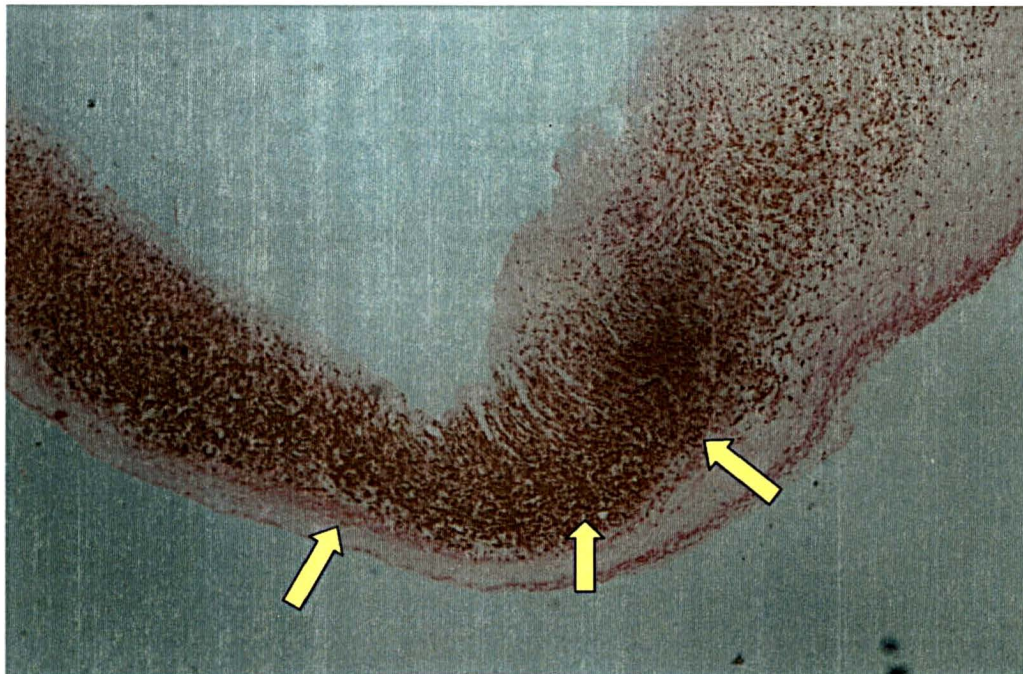
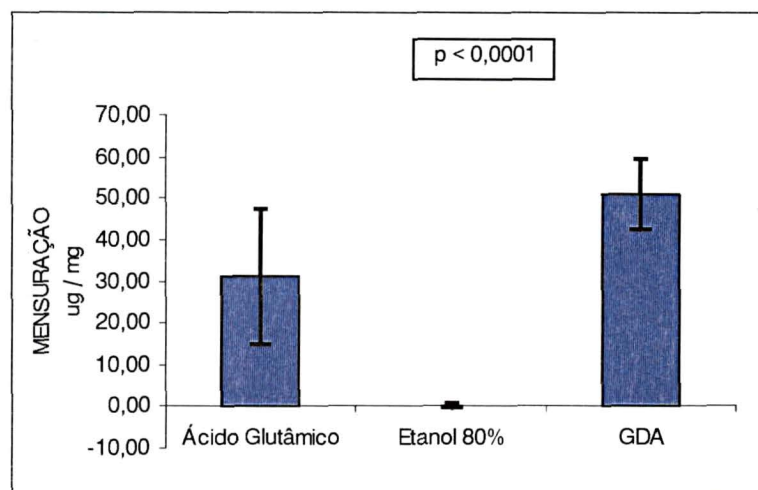


FIGURA 15 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 30 DIAS DE IMPLANTE. GDA SUBGRUPO 30 DIAS (H&E 100x)



GRÁFICO 3 - MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA CÚSPIDE AÓRTICA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - 60 DIAS



FONTE: Quadro 1

FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ETANOL 80%, SEM SINAIS DE CALCIFICAÇÃO APÓS 60 DIAS DE IMPLANTE. E 80% SUBGRUPO 60 DIAS (H&E 40x)

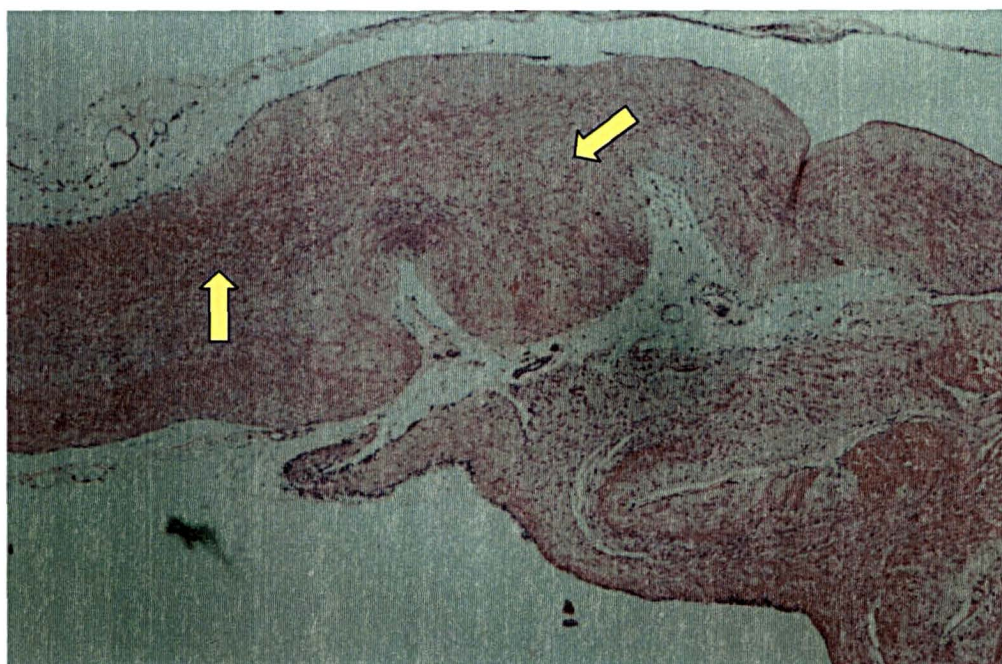


FIGURA 17 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 60 DIAS DE IMPLANTE. AG SUBGRUPO 60 DIAS (H&E 40x)

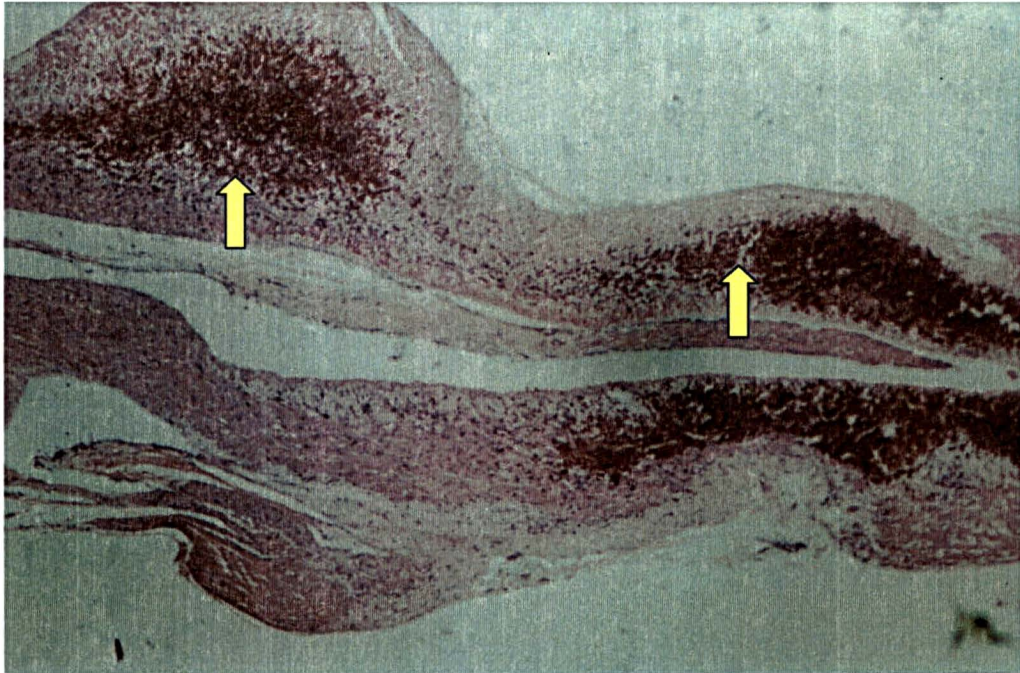


FIGURA 18 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE AÓRTICA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO, COM SINAIS DE IMPORTANTE CALCIFICAÇÃO APÓS 60 DIAS DE IMPLANTE. GDA SUBGRUPO 60 DIAS (von Kossa 40x)

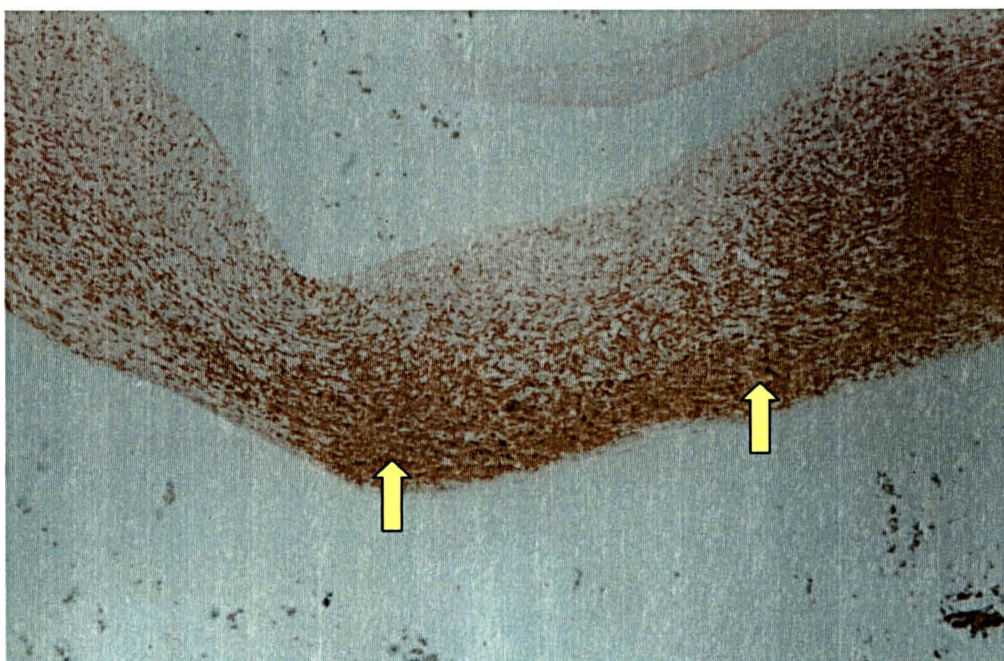
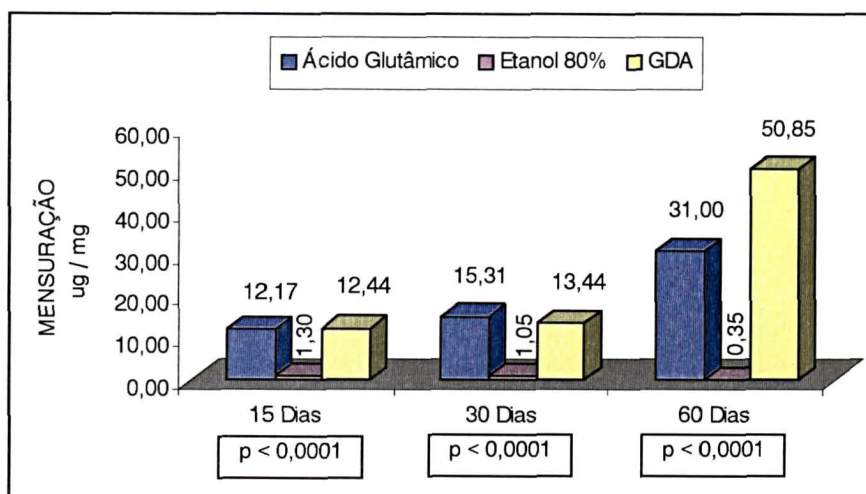


GRÁFICO 4 - MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA CÚSPIDE AÓRTICA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E NOS TEMPO DE OBSERVAÇÃO

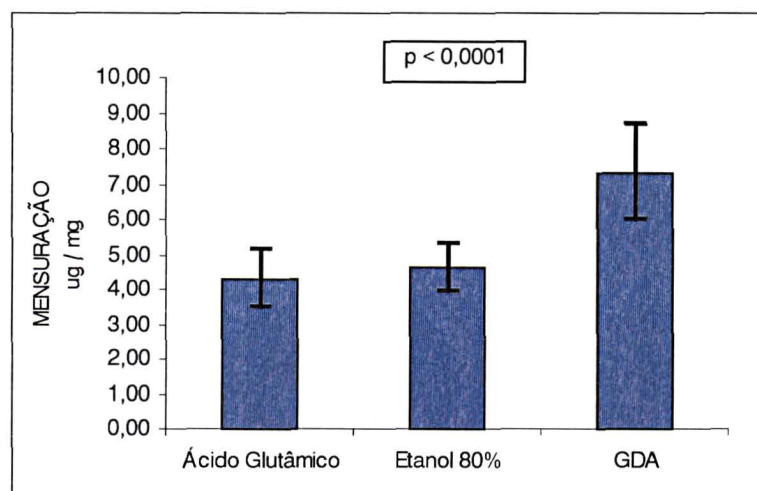


FONTE: Quadro 1

Na comparação da mensuração do cálcio, da parede de aorta, entre os métodos de preparação (grupo de estudo), em cada tempo de observação, separadamente, foi constatada significância estatística apenas para o período de 15 dias:

- GDA apresentou maior quantidade do cálcio, de modo geral ( $p < 0,0001$ ), e quando comparado ao ácido L-glutâmico ( $p = 0,003$ ) e ao etanol 80% ( $p = 0,003$ ) (Gráfico 5);

GRÁFICO 5 - MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA PAREDE DE AORTA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - 15 DIAS



FONTE: Quadro 1

FIGURA 19 – FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE LONGITUDINAL DA PAREDE AÓRTICA TRATADA COM ETANOL 80%, APRESENTANDO CALCIFICAÇÃO DIFUSA E MODERADA APÓS 15 DIAS DO IMPLANTE. E 80% SUBGRUPO 15 DIAS (von Kossa 100x)

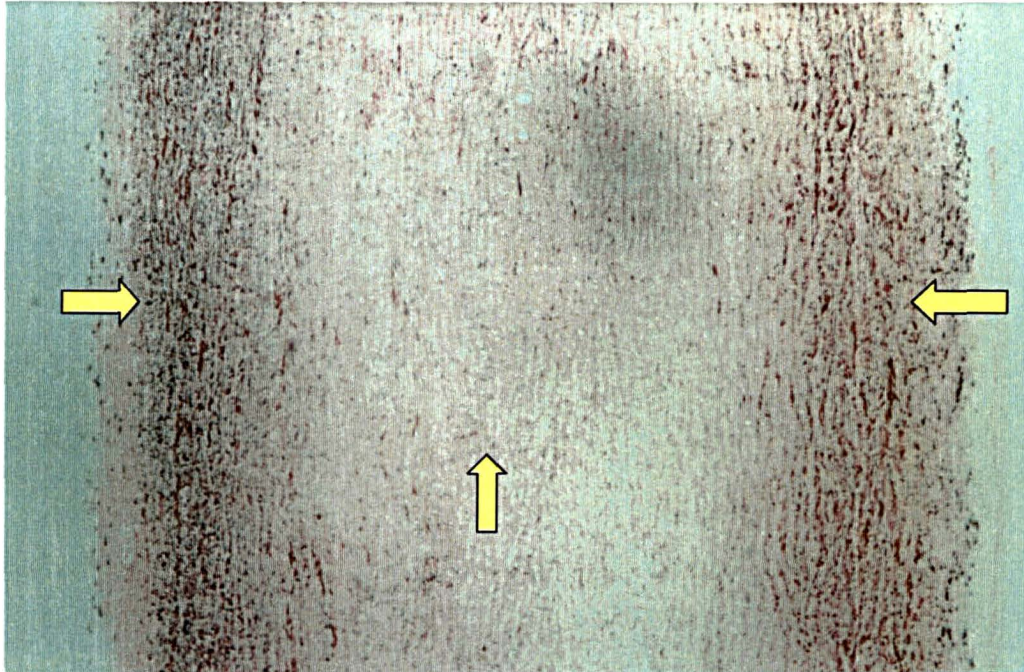
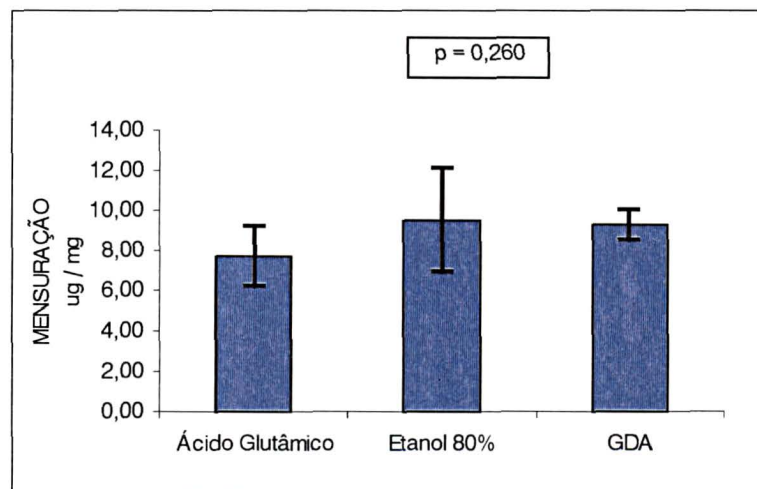


GRÁFICO 6 - MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA PAREDE DE AORTA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - 30 DIAS



FONTE: Quadro 1

FIGURA 20 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE LONGITUDINAL DE PAREDE AÓRTICA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO, APRESENTANDO CALCIFICAÇÃO DIFUSA E ACENTUADA APÓS 30 DIAS DO IMPLANTE. GDA SUBGRUPO 30 DIAS (von Kossa 100x)

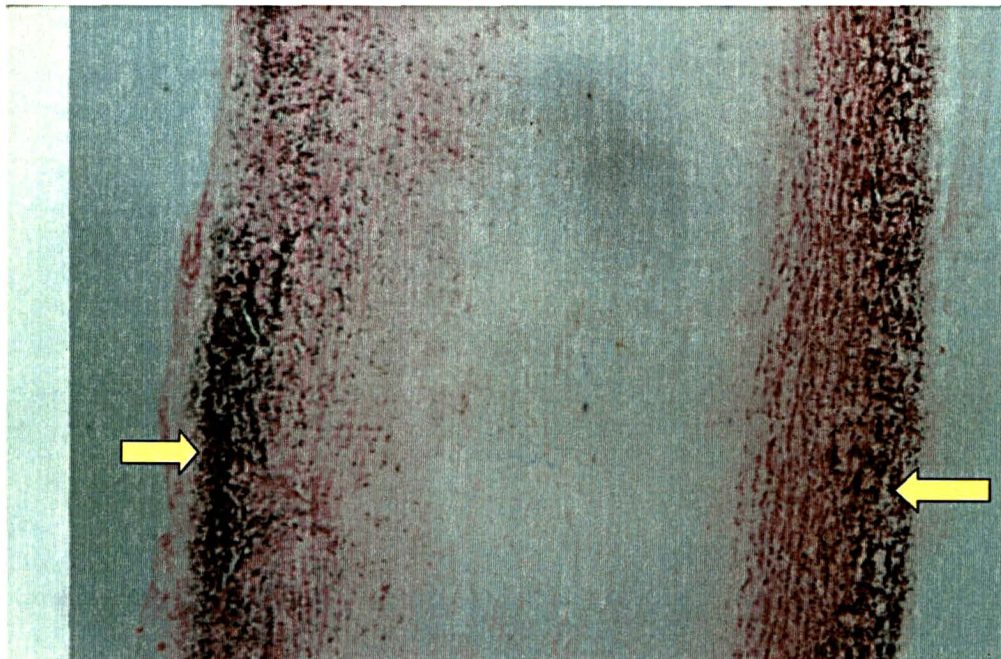
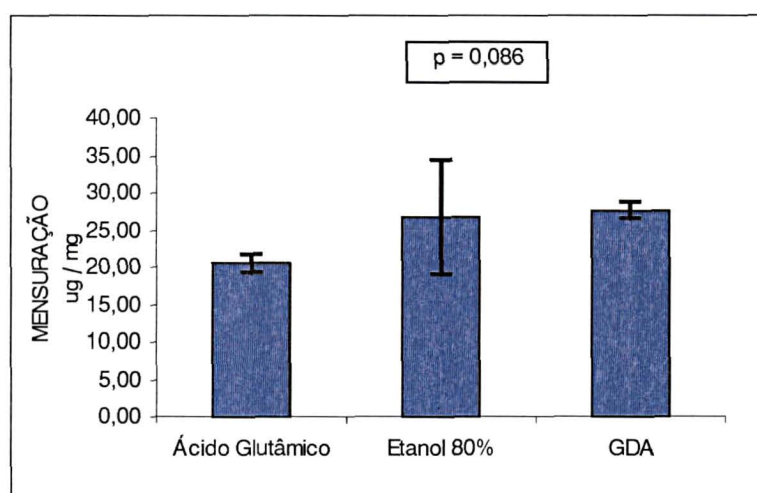


GRÁFICO 7 - MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA PAREDE DE AORTA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - 60 DIAS



FONTE: Quadro 1

Ressalta-se que aos 60 dias foi constatada diferença significativa apenas na comparação do ácido L-glutâmico com o GDA, ou seja, também maior mensuração de cálcio no GDA ( $p < 0,0001$ ).

FIGURA 21 - FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO CORTE LONGITUDINAL DA PAREDE AÓRTICA TRATADA COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO, APRESENTANDO CALCIFICAÇÃO DIFUSA E ACENTUADA, APÓS 60 DIAS DO IMPLANTE. AG SUBGRUPO 60 DIAS (von Kossa 100x)

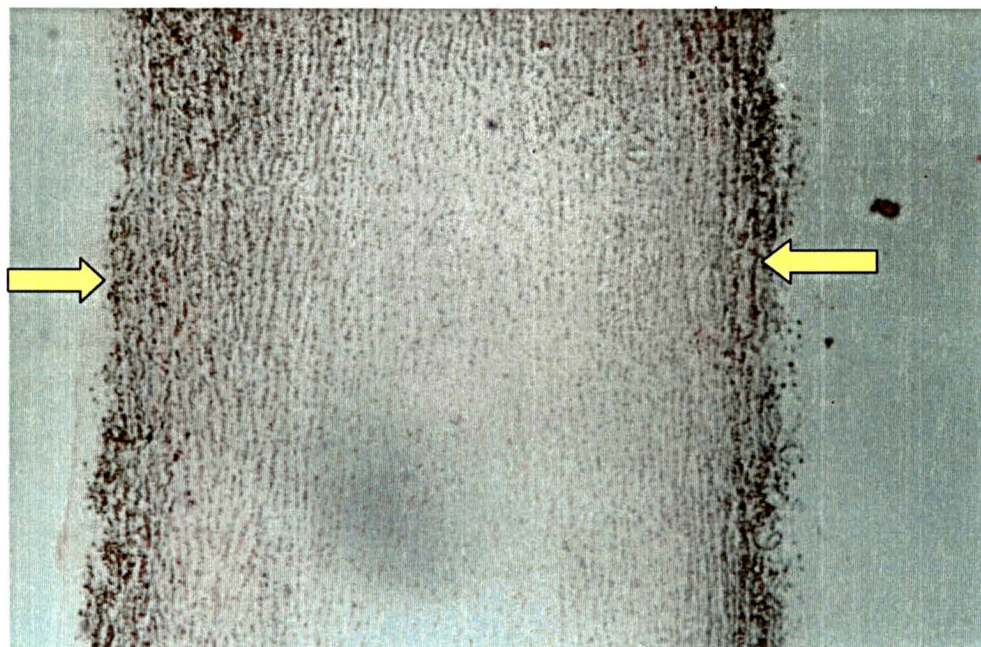
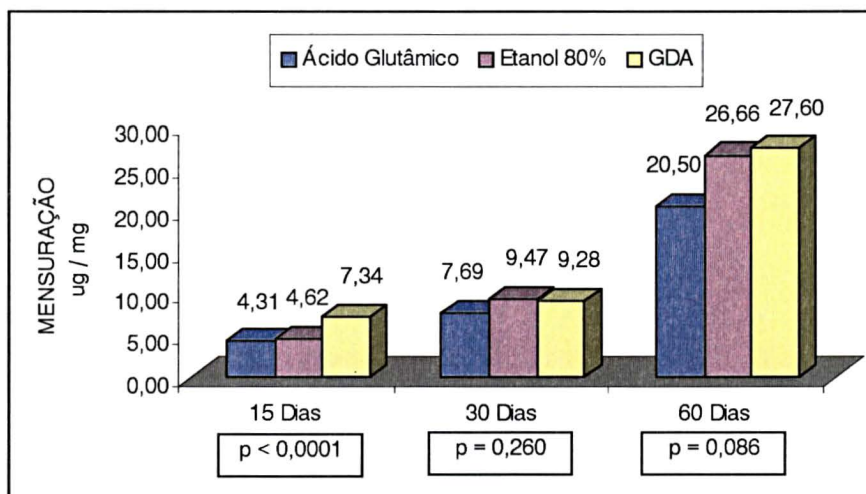


GRÁFICO 8 - MENSURAÇÃO DO CÁLCIO NA PAREDE DE AORTA, NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E NOS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO



FONTE: Quadro 1

Também foram correlacionados os valores do etanol 80%, nos diferentes tempos de observação, sendo constatada maior mensuração do cálcio em 60 dias ( $p < 0,0001$ ) (Gráfico 7). O ácido L-glutâmico e o GDA não foram analisados.



## 5 DISCUSSÃO

Desde os primeiros implantes de valvas porcinas tratadas por glutaraldeído, várias técnicas têm sido usadas para minimizar a calcificação (CARPENTIER et al., 1969; SHEN et al., 2001).

O risco de falência estrutural das biopróteses porcinas é fortemente dependente da idade do receptor. Em pacientes com idade inferior a 35 anos, há falência quase uniforme cinco anos após implantação. Já em pacientes acima de 65 anos, apenas cerca de 10% sofrem disfunção nos 10 anos seguintes ao implante (JAMIESON et al., 1995; GRUNKEMEIER et al., 1994; MILANO et al., 1998).

Com a intenção de tornar mínima a calcificação, Schoen et al., 1988, utilizaram cátions mono, di, ou trivalentes durante a fixação em glutaraldeído, mas suas ações não se mostraram satisfatórias. Hidroxi e amino-difosfonatos e cátions metálicos foram também testados, mas os altos teores necessários interferiram no crescimento ósseo (SCHOEN et al., 1988; SHEN et al., 2001).

O pré-tratamento com detergente (SDS Tween 80) pode inibir a calcificação pela remoção dos fosfolipídeos do substrato. Entretanto, os detergentes afetam a superfície da membrana e as fibras colágenas, resultando, por vezes, em marcada diminuição da durabilidade das biopróteses (HIRSCH et al., 1993a; JONES et al., 1988; VYAVAHARE et al., 1997).

Recentemente o ácido amino oléico usado como detergente demonstra prevenir a calcificação das biopróteses porcinas (CHEN et al., 1994a; CHEN et al., 1994b; HIRSCH et al., 1993b). Os resultados mostraram que o ácido amino oléico reduz significativamente a calcificação dos folhetos das biopróteses implantadas na posição aórtica em ovelhas. Entretanto, os resultados quanto à estabilidade em vivo e a possibilidade de degradação do ácido amino oléico remanescente no tecido necessitam ser resolvidos (VYAVAHARE et al., 1997; CHEN et al., 1994).

Outra alternativa estudada são bisfosfonatos, que agem bloqueando o crescimento dos cristais de hidroxiapatita no tecido bioprotético, cujo uso sistêmico mostra efeitos adversos no metabolismo do cálcio nos ossos que leva a seu enfraquecimento (LEVY et al., 1987).

Demonstrou-se que, quando os bisfosfonatos são colocados junto a folhetos de valvas porcinas implantadas no subcutâneo de ratos, sua liberação lenta e local inibe a calcificação, sem efeitos adversos observados com o uso sistêmico (LEVY et al., 1985).

Os etanohidroxibisfosfonatos e o  $\text{FeCl}_3$  mostraram efeito sinérgico na inibição da calcificação de segmentos de parede aórtica de ratos implantados em animais da mesma espécie. Entretanto, o emprego de liberação sistêmica controlada destes mesmos agentes foi menos efetivo na prevenção do depósito de cálcio em próteses aórticas porcinas (VYAVAHARE et al., 1995).

Outro agente anticalcificante, o aminopropil-hidroxibisfosfonato, mostrou ser efetivo em folhetos aórticos porcinos implantados no subcutâneo de ratos. Porém, quando biopróteses porcinas foram estudadas no sistema circulatório, o efeito anticalcificante não foi demonstrado (WEBB et al., 1989; JONES et al., 1989).

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

As cúspides aórticas porcinas foram incubadas nestes íons metálicos trivalentes, observando-se marcada ação anticalcificante em implantes, mesmo com baixas concentrações (GOLOMB et al., 1991). Estudos morfológicos com os tecidos das biopróteses pré-tratadas com alumínio e cloridrato de ferro revelaram que o  $\text{Al}^{3+}$  e o  $\text{Fe}^{3+}$  são os responsáveis pela desvitalização celular.

Mesmo havendo diferenças entre o perfil das lipoproteínas humanas e os dos ratos e ovelhas, demonstrando diversidade no metabolismo de cálcio destas espécies, nelas coexistem doenças valvares e cardiovasculares. Entretanto, os

estudos de microscopia e patologia ultra-estrutural, indicam que o material clínico e modelo animal são comparáveis (HIRSCH et al., 1993; SCHOEN et al., 1986 e 1994).

VYAVAHARE et al. (1997) estudaram os efeitos de várias concentrações de etanol e mostraram que a 80% ele inibe a calcificação de cúspides aórticas implantadas no subcutâneo de ratos ou no sistema circulatório de ovelhas, como substituto mitral. Acreditam que a extração do colesterol e fosfolipídeos seja o principal mecanismo de sua ação anticalcificante, embora haja outros fatores que podem influenciar a mineralização do tecido bioprotético.

No presente estudo visou-se identificar uma substância que seja anticalcificante eficaz, tanto para as cúspides quanto para a parede aórtica porcina. Com este fim, foram comparados os achados deste estudo com o etanol a 80% com obtidos com outras concentrações deste por VYAVAHARE et al. (1997) em cúspides aórticas porcinas. Confrontaram-se, também, estes dados com os apresentados por GRIMM et al. (1991), que obtiveram significativa ação anticalcificante com tratamento do pericárdio bovino com o ácido L-glutâmico a 0,8%.

Os dados deste trabalho com a mensuração do teor de cálcio nas cúspides aórticas tratadas com etanol a 80% e implantadas no subcutâneo de ratos, nos intervalos de 15,30 e 60 dias após o implante, demonstraram significativa inibição da calcificação. Os valores encontrados aproximam-se dos referidos por VYAVAHARE et al. (1997) e VYAVAHARE et al. (2000). Já os segmentos de parede aórtica tratados pelo etanol a 80% não demonstraram eficácia de sua ação, quando comparados os valores do teor de cálcio obtidos com o tratamento pelo glutaraldeído. O estudo histológico confirma este fato, o que vai ao encontro dos achados da literatura (VYAVAHARE et al., 1997).

O ácido L-glutâmico a 0,8% não foi capaz de inibir a calcificação das cúspides valvares porcinas, pois os valores da mensuração do teor de cálcio não diferiram dos encontrados no grupo controle.

Entretanto, os resultados observados com o segmentos de parede aórtica

indicam melhor ação anticalcificante do ácido L-glutâmico a 0,8%, comparativamente aos obtidos com o glutaraldeído e o etanol a 80%. Do mesmo modo, os estudos histológicos confirmam a superioridade de sua ação (VYAVAHARE et al., 1997; WEISSENSTEIN et al., 2000).

Neste estudo, não se pôde comparar os achados quanto à ação do ácido L-glutâmico nas cúspides e parede aórtica porcinas implantadas no subcutâneo de ratos, por não terem sido encontrados estudos semelhantes na literatura.



## 6 CONCLUSÕES

Da análise comparativa de dois métodos de prevenção da calcificação (etanol a 80% e ácido L-glutâmico a 0,8%) em cúspide e parede aórtica porcina em ratos jovens, aos 15, 30 e 60 dias de implante subcutâneo, concluiu-se que:

O etanol a 80% inibe a calcificação das cúspides nos três períodos analisados, mas não inibe a calcificação da parede aórtica.

O ácido L-glutâmico a 0,8% não inibe a calcificação das cúspides nos três períodos analisado, mas minimiza a calcificação na parede da aorta, quando comparado ao grupo controle no intervalo de 60 dias.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUPART, R.M. et al. The last generation of pericardial valves in the aortic position. **Ann. Thorac. Surg.**, v.61, p.615-620, 1996.

BARRATT-BOYES, B. G. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. **Thorax**, v.19, p.131, 1964.

BLOOMFIELD, P. et al. Twelve-year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses. **N. Engl. J. Med.**, v.324, p.573-579, 1991.

BRAILE, D.M. et al. Experiência inicial com emprego das próteses de LILLEHEI-KASTER. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 27 (supl. 1): p.14, 1974.

CARPENTIER, A. et al. Remplacement des valvules mitraes et ki cuspides per le'tirogreffes. **Ann. Clin. Thorac. Cardiovasc.**, v.7, p.33-38, 1968.

CARPENTIER, A. et al. Biological factors affecting long-term results of valvular hetero-grafts. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.58, p.467-483, 1969.

CARPENTIER, A. et al. Six-year follow-up of glutaraldehyde-preserved heterografts: with particular reference to the treatment of congenital valve malformations. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.68, p.771-782, 1974.

CARPENTIER, A. et al. Techniques for prevention of calcification of valvular bioprostheses. **Circulation**, v. 70 (suppl 1), p.165-168, 1984.

CHEN, W.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves. **Circulation**, v.90, p.323-329, 1994a.

CHEN, W.; KIM, J. D.; SCHOEN, F.J.; LEVY, R.J. Effect of 2-amino oleic acid exposure conditions on the inhibition of calcification of glutaraldehyde crosslinked porcine aortic valves. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.28, p.1485-1495, 1994b.

COSGROVE, D.M. Valve reconstruction versus valve replacement. In: Current hearth valve prostheses. In: CRAWFORD, F.A. ed. **Cardiac Surgery**. 1987. 143p.

COURTMAN, D. W. et al. Development os a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.28, p.655-666, 1994.

COURTMAN, D.W. et al. Biomechanical and ultrastructural comparision of cryopreservation and a novel cellular extraction of porcine aortic valve leaflets. **J. Biomed. Mater Res.**, v.29, p.1507-1516, 1995.

FERRANS, F. J. et al. Calcific deposits in porcine bioprostheses: structure and pathogenesis. **Am. J. Cardiol.**, v.46, p.721-734, 1980.

FERRANS, V. J. et al. Pathology of bioprosthetic cardiac valves. **Hum. Pathol.**, v.18, p.586-595, 1987.

FERRANS, V. J. et al. Abnormalities in explanted bioprosthetic cardiac valves. **Cardiovascular Pathology**, p.373-398, 1993.

GOLOMB, G. et al. The role of glutaraldehyde – induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. **Am. J. Pathol.**, v.127, p.122-130, 1987.

GOLOMB, G.; EZRA, V. Prevention of bioprosthetic heart valve tissue calcification by charge modification: effects of protamine binding by formaldehyde. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.15, p.85-98, 1991.

GOTT, J. P. et al. Calcification of porcine valves: a successful new method of antimineralization. **Ann. Thorac. Surg.**, v.53, p.207-216, 1992.

GOTT, J. P. et al. Refinement of the alpha aminooleic acid bioprosthetic valve anticalcification technique. **Ann. Thorac. Surg.**, v.64, p.50-54, 1997.

GRABENWOGER, M. et al. Decreased tissue reaction to bioprosthetic heart valve material after L-glutamic acid treatment: a morphological study. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.26, p.1231-1240, 1992.

GRIMM, M.; EYBL, E.; GRABENWOGER, M. Biocompatibility of aldehyde – fixed bovine pericardium. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.102, p.195-201, 1991.

GRUNKEMEIER, G. L. et al. Actuarial versus actual risk of porcine structural valve deterioration. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.108, p.709-718, 1994.

GRUNKEMEIER, G.L.; BODNAR, E. Comparative assessment of bioprosthesis durability in the aortic position. **J. Hearth Valve Dis.**, v.4, p.49-55, 1995.

HIRSCH, D. et al. Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate: preincubation and controlled release studies. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.27, p.1477-1484, 1993a.

HIRSCH, D. et al. Synergistic inhibition of the calcification of glutaraldehyde pretreated bovine pericardium in rat a subdermal model by FeCl<sub>3</sub> and ethanehydroxydisphosphonate: preincubation and polymeric controlled release studies. **Biomaterials**, v.14, p.705-711, 1993b.

INTERNATIONAL COMITEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinaria**. 3ed. New York: ITHACA, 1983. 216p.

IONESCU, M. I.; WOOLER, G. H.; SMITH, D. R.; GRINSHAW, V. A. Mitral valve replacement with aortic heterografts in humans. **Thorax.**, v. 22, p.305-313, 1967.

JAMIESON, W. R. et al. Carpentier-Edwards standard porcine bioprosthesis: clinical performance to seventeen years. **Ann. Thorac. Surg.**, v.60, p.999-1007, 1995.

JOHNSTON, T. P.; WEBB, C. L.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Assessment of the in-vitro transport parameters for ethanehydroxy diphosphonate through a polyurethane membrane: a potential refillable reservoir drug delivery device. **ASAIO J.**, v.38, p.M611-M616, 1992.

JOHNSTON, T.; WEBB, C.; SCHOEN, F.; LEVY, R. Site-specific delivery of ethanehydroxy diphosphonate from refillable polyurethane reservoirs to inhibit bioprosthetic tissue calcification. **J. Control. Rel.**, v.25, p.227-240, 1993.

JONES, M. et al. The effects of anticalcification treatments on bioprosthetic heart valves implanted in sheep. **Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.**, v.34, p.1027-1030, 1988.

JONES, M. et al. Anticalcification treatments of bioprosthetic heart valves: in vivo studies in sheep. **J. Cardiac. Surg.**, v.4, p.69-73, 1989.

LEE, C.H. et al. Inhibition of aortic wall calcification in bioprosthetic heart valves by ethanol pretreatment: Biochemical and biophysical mechanism. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.42, p.30-37, 1998.

LEVY, R. J. et al. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. **Am. J. Pathol.**, v.113, p.143-155, 1983.

LEVY, R. J. et al. Inhibition of calcification of bioprosthetic heart valves by local controlled-released diphosphonate. **Science**, v.228, p.190-192, 1985.

LEVY, R. J. et al. Inhibition by diphosphonate compounds of calcification of porcine bioprosthetic heart valve cusps implanted subcutaneously in rats. **Circulation**, v.71, p.349-356, 1985.

LEVY, R. J.; SCHOEN, F. J.; LUND, S. A.; SMITH, M. S. Prevention of leaflet calcification of bioprosthetic heart valves with diphosphonate injection therapy: experimental studies of optimal dosages and therapeutic durations. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.94, p.551-557, 1987.

LEVY, R. J.; SCHOEN, F. J.; FLOWERS, W.B.; STAELIN, S.T. Initiation of mineralization in bioprosthetic heart valves: Studies of alkaline phosphatase activity and its inhibition by AlCl<sub>3</sub> or FeCl<sub>3</sub> pre-incubation. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.25, p.905-935, 1991.

- MILANO, A. et al. Valve-related complications in elderly patients with biological and mechanical aortic valves. **Ann. Thorac. Surg.**, v.66, p.S82-S87, 1998.
- PELLETIER, L. et al. Porcine versus pericardial bioprotheses: a comparison of late results in 1,593 patients. **Ann. Thorac. Surg.**, v.47, p.352-361, 1989.
- PEREIRA, C.E.M.; SILVA, J.D.M.; ROMEIRO, V.R. Aspectos éticos da experimentação animal. **Acta Cirurg. Bras.**, v.13, n.2, p.123-128, 1998.
- POTKIN, B.N. et al. Bioprotheses in tricuspid and mitral valve positions for 95 months with heavier calcific deposits on the right-sided valve. **Am. J. Cardiol.**, v.61, p.947-949, 1988.
- PUIG, L. B. & VERGINELLI, G. Válvulas cardíacas de dura-máter homóloga. Nota prévia. **R. Paul. Med.**, v. 78, p.33 – 35, 1971.
- ROSS, D. Homograft replacement of the aortic valve. **Lancet** , v.2, p.487,1962.
- SCHELD, H.H.; KONERTZ, W. The pathology of bioprosthetic heart valves and allografts. **Curr. Top. Pathol.**, v.86, p.87-125, 1994.
- SCHOEN, F. J. ; LEVY, R. J. Bioprosthetic heart valve failure: pathology and pathogenesis. **Cardiol. Clin.**, v.2, p.717-739,1984.
- SCHOEN, F. J. ; HOBSON, C. E. Anatomic analysis of removed prosthetic heart valves: causes of failure of 33 mechanical valves and 58 bioprotheses, 1980 to 1983. **Hum. Pathol.**, v.16, p.549-559,1985.
- SCHOEN, F. J. et al. Onset and progression of experimental bioprosthetic heart valve calcification. **Lab. Invest.**, v.52, p.523-532, 1985.
- SCHOEN, F. J.; TSAO, J. W.; LEVY, R.J. Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprotheses: implications for the mechanisms off bioprosthetic tissue mineralization. **Am. J. Pathol.**, v.123, p.134-145,1986.
- SCHOEN, F.J.; LEVY, R.J. **Pathophysiology of bioprosthetic heart valve calcification.** In: BODNAR, E. YACOUB, M.H. ed. Biological and bioprosthetic valves. New York: 1986. 418-429 p.
- SCHOEN, F.J. ; KUJOVICH, J. L. ; WEBB, C. L. ; LEVY, R. J. Chemically determined mineral content of explanted porcine aortic valve bioprotheses: correlation with radiographic assessment of calcification and clinical data. **Circulation**, v.76, p.1061-1066, 1987.
- SCHOEN, F. J. et al. Biomaterial-associated calcification: pathology, mechanisms, and strategies for prevention. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.22, p.11-36, 1988.

SCHOEN, F. J. **Interventional and surgical cardiovascular pathology: clinical correlations and basic principles**. Philadelphia: W.B. Saunders; 1989.

SCHOEN, F. J. Pathology of bioprostheses and other tissue heart valve replacements. **Cardiovascular Pathology**, 2<sup>nd</sup> ed, p.1547-1605, 1991.

SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J.; PIEHLER, H. R. Pathological considerations in replacement cardiac valves. **Cardiovasc. Pathol.**, v.1, p.29-52, 1992.

SCHOEN, F. J. ; HIRSCH, D.; BIANCO, R. W.; LEVY, R. J. Onset and progression of calcification in porcine aortic bioprosthetic valves implanted as orthotopic mitral valve replacements in juvenile sheep. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.108, p.880-887, 1994.

SCHOEN, F. J. & LEVY, R. J. Current challenges and future research perspectives. Founder's Award, 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Biomaterials, Providence, RI, April 28-May 2, 1999. **Tissue Heart Valves** : p.439-465, 1999.

SHEN, M. et al. Effect of ethanol and ether in the prevention of calcification of bioprostheses. **Ann. Thorac. Surg.**, v.71, p.413-416, 2001.

TURINA, J. et al. Cardiac bioprostheses in the 1990s. **Circulation**, v.88, p.775-781, 1993.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de documentos científicos**. Curitiba: Ed. Da UFPR, 2000. 10v.

VYAVAHARE, N. et al. Synergism of calcium-ethanehydroxybisphosphonate (CaEHBP) and FeCl<sub>3</sub>: controlled release polymers for preventing calcification of bioprosthetic aortic. **J. Control. Rel.**, v. 34, p.34-97, 1995.

VYAVAHARE, N. et al. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation: efficacy and mechanisms. **Circulation.**, v. 95, p.479-488, 1997.

VYAVAHARE, N. et al. Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies os protein structure and water-biomaterial relationships. **J. Biomed. Mater. Res.** v.40, p.577-585, 1998.

VYAVAHARE, N. et al. Prevention of glutaraldehyde – fixed bioprosthetic heart valve calcification by alcohol pretreatment: further mechanistic studies. **J. of Heart Valve Disease**, v.9, p.561-566, 2000.

WEBB, C.L.; SCHOEN, F.J.; LEVY, R.J. Covalent binding of aminopropanehydroxydisphosphonate to glutaraldehyde residues in pericardial bioprosthetic tissue. **Exp. Mol. Pathol.**, v.50, p.291-302, 1989.

WEBB, C. L. et al. Inhibition of mineralization of glutaraldehyde-pretreated bovine pericardium by  $AlCl_3$ . Mechanisms and comparisons with  $FeCl_3$ ,  $LaCl_3$  and  $Ga(NO_3)_3$  in rat subdermal model studies. **Am. J. Pathol.**, v.138, p.971-981, 1991.

WEISSENSTEIN, C.; HUMAN, P.; BEZUIDENHOUT, D.; ZILLA, P. Glutaraldehyde detoxification in addition to enhanced amine cross-linking dramatically reduces bioprosthetic tissue calcification in the rat model. **J. Heart Valve Dis.**, v.9, p.230-240, 2000.

WILSON, G. J. et al. Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery and heart valve replacement. **Ann. Thorac. Surg.**, v.60, p.S353-S358, 1995.



## ANEXOS

QUADRO 1 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA MENSURAÇÃO DO CÁLCIO DE PAREDE DE AORTA E DA CÚSPIDE AÓRTICA, SEGUNDO OS TEMPOS DE OBSERVAÇÃO E OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO

DADOS	PAREDE DE AORTA (ug / mg)				
	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
<b>ÁCIDO GLUTÂMICO</b>					
• 15 Dias	4,31	0,85	3,27	5,14	-
• 30 Dias	7,69	1,48	5,77	9,66	-
• 60 Dias	20,50	1,22	18,93	22,28	-
<b>ETANOL 80%</b>					
• 15 Dias	4,62	0,68	3,66	5,57	-
• 30 Dias	9,47	2,59	5,65	12,64	-
• 60 Dias	23,56	<sup>(1)</sup> 7,75	10,23	29,76	26,66
<b>GDA</b>					
• 15 Dias	7,34	1,32	5,36	9,05	-
• 30 Dias	9,28	0,76	8,12	10,17	-
• 60 Dias	27,60	1,08	26,38	29,00	-
DADOS	CÚSPIDE AÓRTICA (ug / mg)				
	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
<b>ÁCIDO GLUTÂMICO</b>					
• 15 Dias	12,17	0,66	11,66	13,33	-
• 30 Dias	15,31	2,82	11,33	19,09	-
• 60 Dias	34,24	<sup>(1)</sup> 16,28	17,72	61,11	31,00
<b>ETANOL 80%</b>					
• 15 Dias	1,30	0,21	1,00	1,50	-
• 30 Dias	1,05	0,22	0,77	1,33	-
• 60 Dias	0,53	<sup>(1)</sup> 0,42	0,29	1,28	0,35
<b>GDA</b>					
• 15 Dias	12,44	2,26	8,61	14,58	-
• 30 Dias	13,44	3,34	9,72	18,83	-
• 60 Dias	50,85	8,71	42,14	62,27	-

(1) Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.

QUADRO 2 - RESULTADO DOS TESTES APLICADOS NA COMPARAÇÃO DA MENSURAÇÃO DO CÁLCIO, ENTRE OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - PAREDE DE AORTA

PAREDE DE AORTA	RESULTADO DO TESTE	TESTE APLICADO	VALOR TABELADO	SIGNIFICÂNCIA
<b>15 DIAS</b>	14,21	ANOVA	$p < 0,0001$	S
• Ácido Glutâmico x Etanol 80%	- 0,640	t de Student	$p = 0,540$	NS
• Ácido Glutâmico x GDA	- 4,312	"	$p = 0,003$	S
• Etanol 80% x GDA	- 4,092	t de Student	$p = 0,003$	S
<b>30 DIAS</b>	1,51	ANOVA	$p = 0,260$	NS
• Ácido Glutâmico x Etanol 80%	- 1,331	t de Student	$p = 0,220$	NS
• Ácido Glutâmico x GDA	- 2,139	"	$p = 0,065$	NS
• Etanol 80% x GDA	0,151	t de Student	$p = 0,884$	NS
<b>60 DIAS</b>	3,03	ANOVA	$p = 0,086$	NS
• Ácido Glutâmico x Etanol 80%	0,871	Mann-Whitney	$p = 0,409$	NS
• Ácido Glutâmico x GDA	- 9,773	t de Student	$p < 0,0001$	S
• Etanol 80% x GDA	1,155	Mann-Whitney	$p = 0,282$	NS
<b>ETANOL 80%</b>	27,961	ANOVA Repeated	$p < 0,0001$	S

QUADRO 3 - RESULTADO DOS TESTES APLICADOS NA COMPARAÇÃO DA MENSURAÇÃO DO CÁLCIO, ENTRE OS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO - **CÚSPIDE AÓRTICA**

CÚSPIDE AÓRTICA	RESULTADO DO TESTE	TESTE APLICADO	VALOR TABELADO	SIGNIFICÂNCIA
<b>15 DIAS</b>	108,27	ANOVA	p < 0,0001	S
• Ácido Glutâmico x Etanol 80%	34,973	t de Student	p < 0,0001	S
• Ácido Glutâmico x GDA	- 0,252	"	p = 0,807	NS
• Etanol 80% x GDA	- 10,967	t de Student	p < 0,0001	S
<b>30 DIAS</b>	47,00	ANOVA	p < 0,0001	S
• Ácido Glutâmico x Etanol 80%	11,273	t de Student	p < 0,0001	S
• Ácido Glutâmico x GDA	0,959	"	p = 0,366	NS
• Etanol 80% x GDA	- 8,272	t de Student	p < 0,0001	S
<b>60 DIAS</b>	28,90	ANOVA	p < 0,0001	S
• Ácido Glutâmico x Etanol 80%	2,881	Mann-Whitney	p = 0,002	S
• Ácido Glutâmico x GDA	2,012	"	p = 0,079	NS
• Etanol 80% x GDA	4,627	Mann-Whitney	p < 0,0001	S
<b>ETANOL 80%</b>	12,146	ANOVA Repeated	p = 0,004	S

## PROTOCOLO PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

**CÚSPIDE TRATADA COM :** (    ) Etanol 80%  
*Análise de* (    ) 15 dias    (    ) **Ácido Glutâmico 0,8%**  
                  (    ) 30 dias    (    ) **GDA**  
                  (    ) 60 dias

### **I ) PRESENÇA DE CALCIFICAÇÃO**

1) Quanto a Localização:

( a ) Focal    ( b ) Multifocal    ( c ) Difusa    ( d ) Ausente

2) Quanto a Intensidade :

( a ) Discreta    ( b ) Moderada    ( c ) Acentuada

### **II ) PRESENÇA DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO**

1) Quanto a Localização:

( a ) Focal    ( b ) Difuso    ( c ) Ausente

2) Quanto ao Tipo:

( a ) Agudo    ( b ) Crônico discreto    ( c ) Crônico Moderado



## HISTOLOGIA

### MENSURAÇÃO DO CÁLCIO - PAREDE DE AORTA

Nº	ÁCIDO GLUTÂMICO		
	15 Dias	30 Dias	60 Dias
1	4,83	8,18	20,00
2	3,27	6,78	20,65
3	3,51	8,06	20,65
4	4,78	9,66	22,28
5	5,14	5,77	18,93
Média	4,306	7,690	20,50 <sub>2</sub>
Desvio	0,852	1,481	1,217
Mínimo	3,27	5,77	18,93
Máximo	5,14	9,66	22,28
Mediana	4,78	8,06	20,65
% Desvio	19,8	19,3	5,9

Nº	ETANOL 80%		
	15 Dias	30 Dias	60 Dias
1	4,76	5,65	10,23
2	4,51	12,64	27,40
3	4,59	10,02	29,76
4	5,57	8,54	23,75
5	3,66	10,48	26,66
Média	4,618	9,466	23,56 <sub>0</sub>
Desvio	0,681	2,590	7,754
Mínimo	3,66	5,65	10,23
Máximo	5,57	12,64	29,76
Mediana	4,59	10,02	26,66
% Desvio	14,8	27,4	32,9

Nº	GDA		
	15 Dias	30 Dias	60 Dias
1	9,05	9,29	26,38
2	7,22	9,70	28,00
3	5,36	8,12	27,97
4	7,67	10,17	26,66
5	7,38	9,14	29,00
Média	7,336	9,284	27,60 <sub>2</sub>
Desvio	1,320	0,764	1,076
Mínimo	5,36	8,12	26,38
Máximo	9,05	10,17	29,00
Mediana	7,38	9,29	27,97
% Desvio	18,0	8,2	3,9

### MENSURAÇÃO DO CÁLCIO - CÚSPIDE AÓRTICA

Nº	ÁCIDO GLUTÂMICO		
	15 Dias	30 Dias	60 Dias
1	12,00	16,40	17,72
2	11,66	19,09	26,81
3	13,33	14,62	31,00
4	11,87	11,33	34,55
5	12,00	15,12	61,11
Média	12,17 <sub>2</sub>	15,31 <sub>2</sub>	34,23 <sub>8</sub>
Desvio	0,662	2,821	16,28 <sub>4</sub>
Mínimo	11,66	11,33	17,72
Máximo	13,33	19,09	61,11
Mediana	12,00	15,12	31,00
% Desvio	5,4	18,4	47,6

Nº	ETANOL 80%		
	15 Dias	30 Dias	60 Dias
1	1,50	1,11	1,28
2	1,40	0,88	0,35
3	1,44	1,14	0,44
4	1,00	0,77	0,31
5	1,16	1,33	0,29
Média	1,300	1,046	0,534
Desvio	0,212	0,222	0,421
Mínimo	1,00	0,77	0,29
Máximo	1,50	1,33	1,28
Mediana	1,40	1,11	0,35
% Desvio	16,3	21,2	78,8

Nº	GDA		
	15 Dias	30 Dias	60 Dias
1	12,61	13,60	52,22
2	13,06	12,66	42,22
3	8,61	12,37	55,41
4	13,33	18,83	62,27
5	14,58	9,72	42,14
Média	12,43 <sub>8</sub>	13,43 <sub>6</sub>	50,85 <sub>2</sub>
Desvio	2,261	3,342	8,710
Mínimo	8,61	9,72	42,14
Máximo	14,58	18,83	62,27
Mediana	13,06	12,66	52,22
% Desvio	18,2	24,9	17,1

## ANÁLISE HISTOLÓGICA (Calcificação) - PAREDE DE AORTA

ÁCIDO GLUTÂMICO						
Nº	15 Dias		30 Dias		60 Dias	
	Localização	Intensidade	Localização	Intensidade	Localização	Intensidade
1	Difusa	Discreta	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada
2	Difusa	Discreta	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada
3	Multifocal	Discreta	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada
4	Multifocal	Discreta	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada
5	Focal	Discreta	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada

ETANOL 80%						
Nº	15 Dias		30 Dias		60 Dias	
	Localização	Intensidade	Localização	Intensidade	Localização	Intensidade
1	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada
2	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada
3	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada
4	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada
5	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada

GDA						
Nº	15 Dias		30 Dias		60 Dias	
	Localização	Intensidade	Localização	Intensidade	Localização	Intensidade
1	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada
2	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada
3	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada
4	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada
5	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada

## ANÁLISE HISTOLÓGICA (Calcificação) - CÚSPIDE AÓRTICA

ACIDO GLUTAMICO						
Nº	15 Dias		30 Dias		60 Dias	
	Localização	Intensidade	Localização	Intensidade	Localização	Intensidade
1	Focal	Discreta	Difusa	Acentuada	Difusa	Acentuada
2	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada	Focal	Moderada
3	Difusa	Moderada	Difusa	Moderada	Multifocal	Acentuada
4	Difusa	Moderada	Multifocal	Moderada	Difusa	Acentuada
5	Ausente	Ausente	Multifocal	Moderada	Difusa	Acentuada

ETANOL 80%						
Nº	15 Dias		30 Dias		60 Dias	
	Localização	Intensidade	Localização	Intensidade	Localização	Intensidade
1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

GDA						
Nº	15 Dias		30 Dias		60 Dias	
	Localização	Intensidade	Localização	Intensidade	Localização	Intensidade
1	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada	Difusa	Acentuada
2	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada	Difusa	Acentuada
3	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada	Difusa	Acentuada
4	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada	Difusa	Acentuada
5	Difusa	Moderada	Difusa	Acentuada	Difusa	Acentuada