

Endotelização in vivo das biopróteses cardíacas: preservação convencional versus não-aldeídica

In vivo endothelialization of cardiac bioprosthesis: conventional versus non-aldehyde preservation

Vinicius José da Silva NINA, Pablo Maria Alberto POMERANTZEFF, Ivan Sérgio Joviano CASAGRANDE*, David CHUNG*, Carlos Manuel de Almeida BRANDÃO, Sérgio Antonio Barbosa do NASCIMENTO, Luiz Alberto BENVENUTI, Sérgio Almeida de OLIVEIRA

RBCCV 44205-682

Resumo

Objetivo: O revestimento endotelial in vitro das biopróteses com células do hospedeiro parece ter ação protetora contra a calcificação, trombose, inflamação e o desgaste mecânico. O objetivo deste estudo é analisar o potencial para endotelização in vivo com um processo alternativo de preservação tecidual (L-Hydro™).

Método: A preservação L-Hydro consiste na extração controlada de substâncias antigênicas pela ação do polietilenoglicol e na incorporação de um agente antiinflamatório e antitrombótico. Para testar a re-endotelização in vivo, foram implantadas em posição mitral de ovelhas jovens sete próteses porcinas L-Hydro (grupo teste) e três convencionais preservadas com glutaraldeído (GA - grupo controle). Estas próteses foram explantadas com 150 dias após avaliação ecocardiográfica e angiográfica. A avaliação histológica consistiu em microscopia de varredura e transmissão, e imuno-histoquímica (von Willebrand) para detecção da presença e viabilidade das células endoteliais,

respectivamente. Utilizou-se o teste-t não pareado para análise estatística.

Resultados: Não houve diferença hemodinâmica significativa nos dois grupos ($p > 0.05$). Entretanto, a microscopia mostrou no grupo teste um revestimento endotelial quase completo formado por células confluentes, viáveis com expressão do fator vW, as quais encontravam-se em contato direto com a matriz colagênica subjacente. No grupo controle (GA), as superfícies valvulares estavam recobertas por fibrina, macrófagos, cálcio, material trombotico e células endoteliais esparsas com expressão fraca do fator vW, e com pouco contato direto com o colágeno.

Conclusões: Estes dados indicam que o processo L-Hydro™ permite endotelização espontânea com boa adesividade celular à matriz colagênica, o que favoreceria maior durabilidade às biopróteses porcinas.

Descritores: Bioprótese. Prótese das valvas cardíacas. Glutaral.

Trabalho realizado no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil e *The International Heart Institute of Montana, Missoula, MT, USA.

Endereço para correspondência: Vinicius José da Silva Nina. Rua Sebastião Archer, 101. Olho D'Água. CEP: 65065-480. São Luís-MA. Tel: (98) 248-0320. Fax: (98) 232-8700. E-mail: rvnina@aol.com

Apresentado ao 30º Congresso Nacional de Cirurgia Cardíaca – Goiânia, GO, realizado no período de 3 a 5 de abril de 2003.

Artigo recebido em novembro de 2003
Artigo aprovado em maio de 2004

Abstract

Objective: A protective layer of endothelial cells (EC) of host origin on the entire surface of bioprosthetic heart valves has never been reported. Current commercial bioprosthetic heart valves are commonly preserved in glutaraldehyde (GA) and are cytotoxic to host cells preventing spontaneous endothelialization. The aim of this study is to demonstrate the potential for *in vivo* endothelialization of heart valves treated by the L-Hydro™ preservation process.

Method: L-Hydro™ preservation process consists of mild extraction of antigenic substances by the action of polyethyleneglycol and incorporation of an anti-inflammatory and a anti-thrombotic agent. Seven stented porcine valves treated by the L-Hydro™ process and three GA-fixed porcine valves were implanted in the mitral position of juvenile sheep. The valves were evaluated by echocardiography and angiography prior to sacrifice at five months. Recovered valves were also histologically and histo-chemically evaluated.

Results: There were no hemodynamic differences between the groups. However, scanning and transmission electron microscopy showed a nearly complete coverage of EC on the surfaces of all leaflets in the L-Hydro™ treated valves. The EC were in direct contact with the underlying collagen layer and expressed von Willebrand-related antigens (vW). The surfaces of the GA-treated valves were covered by fibrin deposition, macrophages, calcium and thrombotic material. Only sparse EC were observed and contact of the EC where the underlying tissue was incomplete.

Conclusion: These data indicate that L-Hydro™ treated porcine valve tissues are capable of inducing spontaneous endothelialization with evidence of strong cell attachment of the new endothelium to the collagen matrix.

Descriptors: Bioprosthesis. Heart valve prosthesis. Glutaral.

INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, tem-se demonstrado que a incapacidade das próteses valvulares em reconstituir um tecido cardíaco viável parece ser o fator determinante principal da trombogenicidade, inflamação e durabilidade tardia limitada [1].

Diante deste cenário, a preservação da estrutura e da função natural dos tecidos ganhou importância tornando-se um dos maiores objetivos na pesquisa e no desenvolvimento dos novos substitutos valvares [2].

Estudos anteriores demonstram que a extração celular e a remoção de debris celulares de dentro das cúspides valvares reduzem substancialmente a antigenicidade, prescindindo da fixação com glutaraldeído (GA) [3,4]. Além disso, a manutenção da integridade da matriz pode ser assegurada pela possibilidade de re-endotelização por células de hospedeiro [5-8].

Na literatura não há relatos de endotelização espontânea completa dos folhetos valvulares, após o seu implante, com a utilização dos métodos usuais de preservação tecidual.

No presente estudo foi testado o potencial para re-endotelização in vivo das próteses valvulares porcinas montadas em suporte e tratadas por um novo processo não aldeídico de preservação tecidual, cujo principal agente de estabilização tecidual é o polietilenoglicol.

MÉTODO

Preparação das próteses

As valvas porcinas foram obtidas de um abatedouro aprovado pelo Ministério da Agricultura e Vigilância Sanitária. Após serem montadas em suporte, as próteses receberam o tratamento de preservação pelo processo L-

Hydro™ (Philogenesis Inc., Monrovia, EUA), o qual consistiu em três etapas distintas descritas abaixo em linhas gerais, resguardando-se o sigilo das formulações específicas em cumprimento à regulamentação das patentes internacionais, cujo domínio é exclusivo do inventor até a sua divulgação pública.

1ª Etapa: extração dos antígenos porcinos e mascaramento dos antígenos remanescentes sob oxidação química controlada pelo uso do ácido polietilenoglicol;

2ª Etapa: incorporação ao tecido valvar de um agente antiinflamatório não-esteróide e de um agente antitrombótico;

3ª Etapa: esterilização de tecido em fase aquosa de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Concluído o processo de preservação, as próteses foram estocadas em solução de etanol a 50% até a sua utilização.

Implantes em animais

Os experimentos em animais foram realizados mediante aprovação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e seguindo-se as normas da *American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care* [9].

A amostra consistiu de 10 ovinos da raça Santa Inês de 4 a 6 meses de idade e com peso entre 25 e 35 kg.

Os animais foram divididos em 2 grupos:

1) Grupo Teste: sete animais que receberam implante de bioprótese porcina não-aldeídica (L-Hydro).

2) Grupo Controle: três animais que receberam implante de bioprótese porcina convencional preservada em GA.

As próteses tinham diâmetro de 25mm e foram implantadas em posição mitral através de toracotomia lateral esquerda no 4º espaço intercostal, utilizando-se circulação

extracorpórea (CEC) com parada anóxica hipotérmica induzida por fibrilação ventricular. O ato operatório foi concluído com a drenagem pleural e o fechamento da cavidade por planos. Os animais foram mantidos vivos por 150 dias.

Desempenho hemodinâmico

O desempenho hemodinâmico foi comparado nos dois grupos pelo ecodopplercardiograma bidimensional, utilizando-se um ecocardiógrafo ATL Ultramark 6 (Philips, Drachten, Netherlands). Pela ecocardiografia determinou-se o gradiente transvalvar médio, a área valvar, a mobilidade e competência dos folhetos e o grau de regurgitação valvar.

A avaliação hemodinâmica foi completada com uma angiografia por ocasião do sacrifício. Foi realizado um cateterismo cardíaco direito e esquerdo através da veia jugular e carótida direita utilizando-se um cateter de Swan-Ganz e um Pig-Tail, respectivamente (Baxter Healthcare Corporation, Irvine, USA). Foi obtido o registro do ventriculograma e das pressões venosa central, arterial sistêmica e pulmonar, e do débito cardíaco por termodiluição.

Avaliação radiológica

Após o explante das válvulas, foi realizada a pesquisa de focos de calcificação macroscópica nos folhetos valvulares pela técnica de mamografia, utilizando-se um mamógrafo Senographe DMR (GE, Buc, France).

Avaliação histológica e imunohistoquímica

As próteses explantadas foram fixadas em histo-choice (Amresco Inc, Solon, USA) e cortadas em fragmentos que incluíam a base, a porção média e borda livre dos folhetos, os quais foram embebidos em parafina, seccionados em espécimes de 4 micrômetros e corados com hematoxilina-eosina (HE) e von Koosa. As lâminas foram examinadas com microscópio óptico Olympus CBA (Olympus, Tokyo, Japan).

A ultra-estrutura valvar foi analisada pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão, utilizando-se um microscópio eletrônico EM 301 (Philips, Drachten, Netherlands).

A pesquisa de repopularização endotelial foi realizada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, na qual os espécimes foram desidratados com acetona até o ponto crítico de dióxido de carbono, cobertos com ouro e examinados no Stereoscam 240 (Cambridge Instruments, Cambridge, UK).

A pesquisa da atividade celular endotelial foi realizada pela coloração imuno-histoquímica para o fator VIII (Factor von Willerand Policlonal Dako, Grostrup, Denmark).

Estatística

Os dados quantitativos foram expressos como média e

erro-padrão da média. Comparações entre os grupos foram feitas com teste-t de student não-pareado. Os dados qualitativos foram descritos através de frequências absolutas e relativas, comparadas entre os grupos pelo teste exato de Fischer. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

O processamento dos dados e a análise estatística foram realizados utilizando-se o GraphPad InStat 3.0 for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego, USA).

As suposições de distribuição normal e variâncias iguais foram testadas.

RESULTADOS

Avaliação ecocardiográfica e hemodinâmica

Na ecocardiografia bidimensional, as próteses encontravam-se normofuncionantes com ausência de regurgitação detectável pelo Doppler, exceto em 1 controle no qual havia redução na mobilidade dos folhetos secundária à extensa calcificação.

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparados os dois grupos quanto aos gradientes transvalvares, área valvar, pressões pulmonar e sistêmica e o débito cardíaco (Tabela 1).

Tabela 1. Médias e erros-padrão das medidas ecocardiográficas e hemodinâmicas nos 2 grupos.

Variável	Teste	Controle	p
Gradiente pico (mmHg)	6 ± 1,30	4,3 ± 0,88	0,40
Gradiente médio (mmHg)	3 ± 1,04	2,33 ± 0,33	0,65
Área valvar (cm ²)	2,5 ± 0,34	1,66 ± 0,33	0,17
PAM (mmHg)	88,9 ± 9,75	85 ± 11,38	0,82
PAP (mmHg)	23,8 ± 2,37	41,3 ± 8,20	0,12
PCP (mmHg)	12,8 ± 1,74	34,8 ± 7,90	0,06
DC (l/min)	5 ± 0,70	5,2 ± 0,85	0,82

cm² = centímetros quadrados; DC = débito cardíaco; mmHg = milímetro de mercúrio; p = nível descritivo do teste-t de student não-pareado para variáveis diferentes; PAP = pressão arterial pulmonar; PAM = pressão arterial média; PCP = pressão capilar pulmonar

Macroscopia

As válvulas do grupo teste não mostraram evidência de endocardite, trombose, hematomas, abrasões e/ou lesões estruturais. Em apenas um caso observou-se pequeno rasgo comissural. Nos três controles havia trombos organizados na superfície atrial com extensa área de calcificação e enrijecimento dos folhetos. Não evidenciados na válvula teste.

Avaliação radiológica

Não houve calcificação detectável pela técnica mamográfica nas válvulas preservadas pelo processo L-

Hydro™. Nas três válvulas-controle (GA) havia focos de calcificação.

Microscopia óptica

A coloração pela HE mostrou uma camada de células endoteliais confluentes revestindo 70% da superfície dos folhetos das válvulas não-aldeídicas (L-Hydro), as quais encontravam-se em contato direto com a matriz de colágeno subjacente. Não foram vistas células endoteliais recobrindo as bordas livres dos folhetos (Figura 1). No grupo controle (GA), o revestimento endotelial ficou restrito apenas à base dos folhetos, e em algumas áreas não houve contato direto com o colágeno devido à interposição de fibrina, células mononucleares, cálcio e material trombótico (Figura 2). A coloração por von Kossa confirmou a calcificação neste grupo. Esta coloração foi negativa nas válvulas do grupo teste.

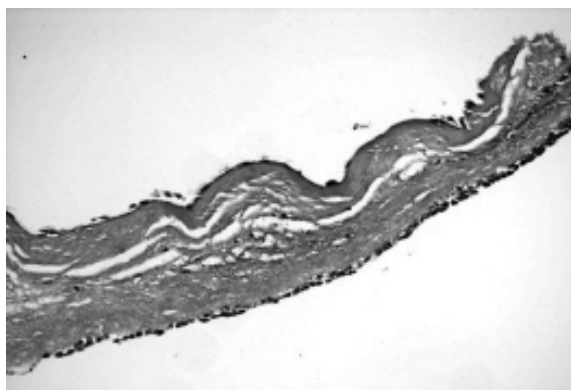


Fig. 1 – Microscopia óptica da válvula não-aldeídica (L-Hydro). Coloração por HE. A superfície valvular está recoberta por células endoteliais e fibroblastos estão incorporados na matriz valvar (magnificação da objetiva, 10x)

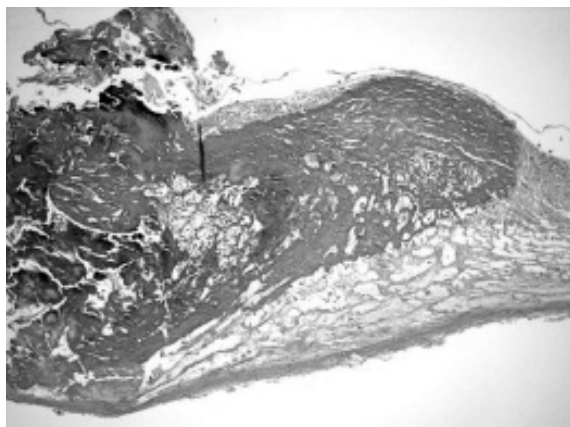


Fig. 2 – Microscopia óptica da válvula convencional (GA). Coloração por HE. Nota-se ausência de re-celularização da superfície e da matriz (magnificação da objetiva, 10x)

Microscopia de varredura

As válvulas tratadas pelo processo L-Hydro mostraram revestimento celular confluyente com a morfologia típica de endotélio (células losangulares) - Figura 3.

As válvulas tratadas pelo GA mostraram áreas extensas formadas por fibrilas de colágeno desnudo, e células endoteliais esparsas presentes somente na base dos folhetos (Figura 4).

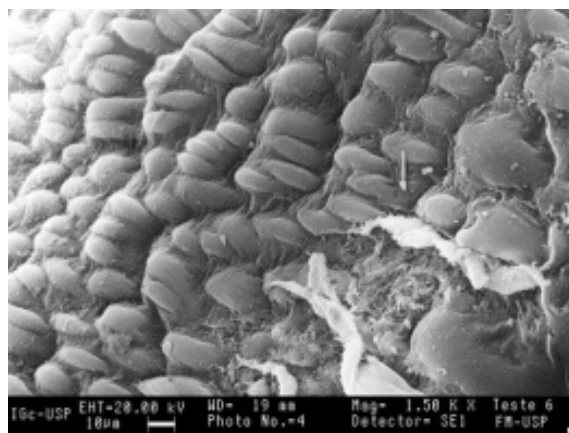


Fig. 3 – Microscopia eletrônica de varredura da válvula não-aldeídica (L-Hydro). Camada de células endoteliais confluentes (magnificação 1500 x)

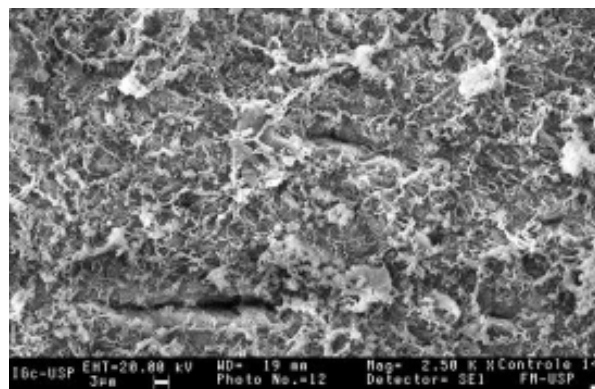


Fig. 4 – Microscopia eletrônica de varredura da válvula convencional (GA). Ausência de células endoteliais. Colágeno desnudo (magnificação 2500x)

Microscopia eletrônica de transmissão

No grupo teste (L-Hydro) observou-se recelularização do colágeno por fibroblastos viáveis, os quais não foram evidenciados no grupo controle (Figura 5).

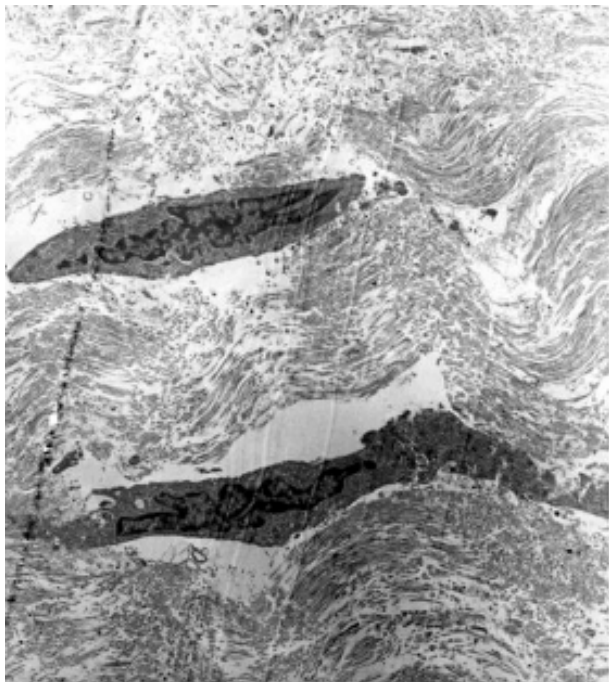


Fig. 5 – Microscopia eletrônica de transmissão da válvula não-aldeídica (L-Hydro). Fibroblastos viáveis incorporados à matriz do colágeno (magnificação 28000x)

Imuno-histoquímica

A expressão do fator VIII (vW) confirmou os achados da coloração pela HE no grupo teste (L-Hydro), demonstrando que o revestimento celular era composto por células endoteliais viáveis (Figura 6).

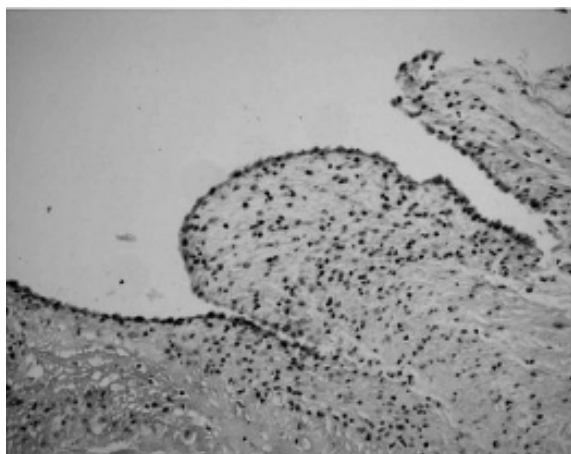


Fig. 6 – Coloração imuno-histoquímica da válvula não-aldeídica (L-Hydro). Expressão da viabilidade endotelial pelo fator VIII policlonal (magnificação da objetiva, 20x)

Houve uma expressão fraca do fator VIII no grupo controle.

Os achados histológicos após 150 dias de implante encontram-se resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Freqüências absolutas e relativas dos achados histológicos após 150 dias do implante valvular.

Variável	Categoria	Teste	Controle	p
Re-endotelização	Sim	7(100,0%)	0(0,0%)	0,008
	Não	0(0,0%)	3(100,0%)	
Trombose	Sim	0(0,0%)	3(100,0%)	0,008
	Não	7(100,0%)	0(0,0%)	
Calcificação	Sim	1(14,3%)	3(100,0%)	0,033
	Não	6(25,7%)	0(0,0%)	

p = nível descritivo do teste exato de Fisher

COMENTÁRIOS

A principal desvantagem das biopróteses heterólogas é a durabilidade limitada devido à degeneração tecidual, a qual tem sido apontada, pelo menos em parte, como o resultado de uma reação imunogênica ao tecido xenogênico, mediada pela ação citotóxica do glutaraldeído [10].

O glutaraldeído reduz o relaxamento e aumenta a dureza dos folhetos valvares, levando a um funcionamento mecânico anormal das próteses valvulares, o qual tem como consequência danos teciduais localizados que predispoem à trombogenicidade [11-13]. Atualmente, acredita-se que o desenvolvimento de uma camada de células endoteliais tenha ação protetora contra estes danos teciduais, assegurando-lhes maior resistência e durabilidade [14,15].

Entretanto, o crescimento endotelial somente é possível se os folhetos valvares forem processados utilizando-se um método atóxico de preservação tecidual, uma vez que, os aldeídos mantêm-se tóxicos às células endoteliais em concentrações tão baixas quanto três partes por milhão, impedindo que as válvulas biológicas convencionais adquiram revestimento endotelial [16].

ISHIHARA et al. [17] demonstraram que apenas 23% das válvulas biológicas explantadas no período de 12 a 60 meses apresentavam algum revestimento endotelial, porém restrito à base dos folhetos.

Esta incapacidade de repopularização endotelial dos folhetos valvulares predispoem-os à insudação por proteínas e sais o quê, ulteriormente, leva à

calcificação[18].

Estudos na literatura têm demonstrado que a recelularização da superfície e da matriz do colágeno com células endoteliais autólogas pode conferir potencial para regeneração e crescimento do tecido valvar, transformando-o numa estrutura viva[5,6,8,12,14]. Em estudo clínico preliminar recente com prótese pulmonar porcina obtida por engenharia de tecido para a reconstrução da via de saída do ventrículo direito, DOHMEN et al. [19] também sugerem o benefício potencial da endotelização valvular *in vitro* quando se utiliza uma matriz não-aldeídica.

No presente estudo, as válvulas com preservação não-aldeídica mostraram-se mais resistentes à trombose, à calcificação, à inflamação e ao desgaste mecânico. A calcificação foi mais evidente no grupo tratado pelo GA, a qual foi responsável pela redução na mobilidade dos folhetos cuja repercussão hemodinâmica foi traduzida pela elevação, embora não significativa, das pressões pulmonar média e capilar pulmonar. Este achado é consistente com o estudo de SCHOEN et al. [20], os quais utilizaram-se do mesmo modelo experimental (ovinos) com tempo de exposição semelhante (150 dias).

A re-endotelização não foi observada no grupo controle (GA), exceto por “*pannus*” na base dos folhetos, com pouco contato com a matriz do colágeno subjacente e sem expressão de viabilidade do fator VIII. Ao contrário, no grupo teste (L-Hydro) as válvulas mostraram potencial para endotelização espontânea com excelente adesividade e viabilidade celular semelhantes aos descritos para as valvas tratadas por decelularização enzimática ou por foto-oxidação [21].

A endotelização observada no presente estudo foi favorecida pela preservação L-Hydro™ cujo principal agente de estabilização tecidual é o polietilenoglicol (PEG), o qual é produzido pela polimerização catalítica heterogênea a partir de monômeros de óxido de etileno, e tem como propriedades: a solubilidade em água, cetonas, glicerol e etanol; entretanto, é menos higroscópico e resiste melhor à decomposição do que estes dois últimos compostos. A sua toxidez é bastante reduzida por ser quimicamente inerte; e a sua excreção, quando em contato com a circulação sanguínea, se faz completamente pelo rim sem ser metabolizado, o que assegura a sua aplicação clínica como veículo para dissolver fármacos pouco solúveis em água, como a reserpina e a nitrofurantoína, ou aqueles facilmente hidrolisáveis, como os barbituratos alcalinos [22].

A toxidez reduzida do PEG foi demonstrada por WICOMB et al. [23], os quais relataram que com a administração aguda em animais de doses elevadas, atingindo 16 g/kg durante 12 a 16 horas, não foram

detectados efeitos adversos, e que a administração crônica foi igualmente inócua.

O PEG mostrou-se eficaz em vários estudos experimentais *in vitro* quando adicionado à solução de preservação miocárdica, garantindo a viabilidade funcional do órgão por tempo mais prolongado (até 24 horas) do que aquele preconizado como uso das soluções cardioplégicas convencionais como a de “Saint Thomas” e da “University of Wisconsin” que é de quatro a seis horas. Esta capacidade de preservação mais prolongada deve-se à ação osmótica do PEG que estabiliza a membrana tornando-a menos permeável ao soluto extracelular e, conseqüentemente, prevenindo o edema celular [24].

É também atribuída ao PEG a propriedade imunossupressora na qual está fundamentada a preservação L-Hydro™ utilizada neste estudo. Tem sido demonstrado que antígenos que se combinam com o PEG manifestam redução da antigenicidade; como foi relatado no estudo de COLLINS et al.[25], no qual observou-se uma redução de 30% na incidência de rejeição no grupo de receptores de transplante cardíaco nos quais os órgãos dos doadores foram preservados com uma solução contendo PEG a 5%. Em estudo subsequente realizado por TOKUNAGA et al.[26] foi demonstrado o aumento estatisticamente significativo na sobrevivência (11,9 *versus* 9,6 dias) com transplante hepático de ratos cujos órgãos foram previamente irrigados com solução de PEG de alto peso molecular (20.000 daltons). Para aqueles autores, esta ação imunossupressora decorre da ligação do PEG com os lipídios da membrana celular dos antígenos, formando complexos reversíveis, os quais alteram ou mascaram a superfície celular destes antígenos de maneira análoga àquela descrita para a combinação química específica com os alérgenos; ou seja, interfere com a ativação dos macrófagos e, conseqüentemente, com a ativação das células T_{Helper} induzindo ao estado de tolerância aos antígenos do doador, cuja imunogenicidade torna-se reduzida. De modo semelhante, na preservação L-Hydro™ os antígenos porcinos são extraídos e os remanescentes são mascarados mediante a oxidação química controlada com o uso do PEG.

O presente estudo, assim como outros que utilizam o mesmo modelo animal, na avaliação de novas tecnologias para fixação/estabilização de tecidos, têm como limitação a impossibilidade de reproduzir o efeito da doença cardíaca e o perfil de coagulação comparável ao dos seres humanos [7,12,19]. Entretanto, a endotelização como mecanismo para minimizar ou retardar a degeneração estrutural se mostrou como uma possibilidade real, desde que o tecido valvar possa ser

preservado por um agente com as características do PEG, tornando-o propício à recelularização por células do hospedeiro em virtude da sua baixa toxicidade, da sua capacidade de atenuar os xeno-antígenos porcinos e de manter preservada a arquitetura histológica valvar. Estas propriedades podem garantir maior desempenho e durabilidade às próteses biológicas. Contudo, somente um ensaio clínico com seguimento tardio poderá validar as premissas deste estudo.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que:

1. O processo L-Hydro (não-aldeídico) permite a endotelização espontânea com evidência de uma boa adesividade do novo endotélio à matriz do colágeno;
2. A possibilidade de melhora no desempenho e na durabilidade das biopróteses valvulares cardíacas mediante a re-endotelização com células do hospedeiro é bastante promissora porque previniria a trombogenicidade e a degeneração estrutural.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2002/08298-4).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation* 2000;102(19 suppl. III):III50-5.
2. Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM et al. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation* 2000;102(19 suppl. III):III22-9.
3. Vesely I, Noseworthy R, Pringle G. The hybrid xenograft/autograft bioprosthetic heart valve: in vivo evaluation of tissue extraction. *Ann Thorac Surg* 1995;60(2 suppl)S359-64.
4. Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, Black KS, O'Brien MF. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1962-9.
5. Bengtsson L, Radegran K, Haegerstrand A. In vitro endothelialization of commercially available heart valve bioprostheses with cultured adult human cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993;7:393-8.
6. Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, Walsh SP, Dawson PE, Ollerenshaw JD et al. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptative remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001;13(4 suppl. 1):87-92.
7. Dohmen PM, Ozaki S, Yperman J, Flameng W, Konertz W. Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001;13(4 suppl. 1):93-8.
8. Zavazava N, Simon A, Sievers HH, Bernhard A, Muller-Ruchholtz W. Porcine valves are reendothelialized by human recipient endothelium in vivo. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:702-6.
9. Bayne K. Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available. American Physiological Society. *Physiologist* 1996;39:208-11.
10. Eybl E, Griesmacher A, Grimm M, Wolner E. Toxic effects of aldehydes released from fixed pericardium on bovine aortic endothelial cells. *J Biomed Mater Res* 1989;23:1355-65.
11. Grabenwöger M, Grimm M, Eybl E, Kadletz M, Havel M, Köstler P et al. New aspects of the degeneration of bioprosthetic heart valves after long-term implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:14-21.
12. Schoen FJ, Levy RJ. Pathology of substitute heart valves: new concepts and developments. *J Card Surg* 1994;9(2 suppl.):222-7.
13. Ferrans VJ, Spray TL, Billingham ME, Roberts WC. Structural changes in glutaraldehyde-treated porcine heterografts used as substitute cardiac valves. Transmission and scanning electron microscopic observations in 12 patients *Am J Cardiol* 1978;41:1159-84.
14. Eybl E, Grimm M, Grabenwöger M, Böck P, Müller MM, Wolner E. Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve materials. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:763-9.
15. Simon A, Wilhelmi M, Steinhoff G, Harringer W, Brücke P, Haverich A. Cardiac valve endothelial cells: relevance in the long-term function of biologic valve prostheses. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:609-16.
16. Grimm M, Eybl E, Grabenwöger M, Griesmacher A, Losert U, Bock P et al. Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium: an in vitro and in vivo approach toward improvement of bioprosthetic heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991;102:195-201.

-
17. Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Robert W. Occurrence and significance of endothelial cells in implanted porcine bioprosthetic valves. *Am J Cardiol* 1981;48:443-54.
 18. Fischlein T, Lehner G, Lante W, Fittkau M, Murphy JG, Weinhold CH et al. Endothelialization of cardiac valve bioprostheses. *Int J Artif Organs* 1994;17:345-52.
 19. Dohmen PM, Dusche S, Kern H, Konertz W. First Clinical implantation of a tissue engineered heart valve using a glutaraldehyde-free xenogenic scaffold. *LA Arch Cardiovasc Sci* 2003;4:26-30.
 20. Schoen FJ, Hirsch D, Bianco RW, Levy RJ. Onset and progression of calcification in porcine aortic bioprosthetic valves implanted as orthotopic mitral valve replacements in juvenile sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:880-7.
 21. Bengtsson LA, Phillips R, Haegerstrand AN. In vitro endothelialization of photooxidatively stabilized xenogenic pericardium. *Ann Thorac Surg* 1995;60:S365-8.
 22. Presta LN, Alves AC, Morgado R. Polietilenoglicóis. In: *Tecnologia farmacêutica*. 4ed. Porto: Fundação Calauste Gulbenkian; 1995. p.646-7.
 23. Wicomb WN, Perey R, Portnoy V, Collins GM. The role of reduced glutathione in heart preservation using a polyethylene glycol solution, Cardiosol. *Transplantation* 1992;54:181-2.
 24. Bhayana JN, Tan ZT, Bergsland J, Balu D, Singh JK, Hoover EL. Beneficial effects of fluosol-polyethylene glycol cardioplegia on cold, preserved rabbit heart. *Ann Thorac Surg* 1997;63:459-64.
 25. Collins GM, Wicomb WN, Levin BS, Verma S, Avery J, Hill JD. Heart preservation solution containing polyethyleneglycol: an immunosuppressive effect? *Lancet* 1991;338:890-1.
 26. Tokunaga Y, Wicomb WN, Garcia-Kennedy R, Esquivel CO, Collins GM. The immunosuppressive effect of polyethylene glycol in a flush solution for rat liver transplantation. *Transplantation* 1992;54:756-8.