



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**TRATAMENTOS ANTICALCIFICANTES DO PERICÁRDIO  
BOVINO FIXADO COM GLUTARALDEÍDO EMPREGADO  
NA CONFECÇÃO DE VÁLVULAS CARDÍACAS**  
Comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos

**JOSÉ AUGUSTO BAUCIA**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais.

Orientador:  
Prof. Dr. Ricardo Mendes Leal Neto

Co-Orientador  
Prof. Dr. José Roberto Rogero

São Paulo  
2005

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

**TRATAMENTOS ANTICALCIFICANTES DO PERICÁRDIO BOVINO  
FIXADO COM GLUTARALDEÍDO EMPREGADO NA CONFEÇÃO  
DE VÁLVULAS CARDÍACAS**

**Comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos**

**JOSÉ AUGUSTO BAUCIA**



**Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências  
na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais**

**Orientador:**  
**Prof. Dr. Ricardo Mendes Leal Neto**

**Co-Orientador:**  
**Prof. Dr. Jose Roberto Rogero**

**SÃO PAULO**

**2005**

**DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais,**

Alfredo Baucia  
Hélida Baucia (*in memorian*)

**Aos meus filhos queridos,**

Patrícia Helena Baucia  
José Augusto Baucia Junior  
Eduardo Augusto Baucia

**À companheira de todos os momentos,**

Carmem Aparecida Cruz Reyes

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Nanci do Nascimento pela orientação e inestimável colaboração na realização dos implantes experimentais.

Ao Dr. Hélio Nagatomi pela colaboração na realização das dosagens de  $\text{Ca}^{2+}$ .

À Dra. Adir Janete Godoy pela colaboração no preparo das amostras para a espectrofotometria.

Ao Dr. Patrick Jack Spencer pela colaboração na determinação da atividade enzimática da fosfatase alcalina.

E em particular aos meus orientadores, Dr. Ricardo Mendes Leal Neto e Dr. Jose Roberto Rogero, acima de tudo amigos verdadeiros, que ajudaram a transformar uma série de dados em uma tese e permitiram que um objetivo, por vezes distante, fosse alcançado.

**TRATAMENTOS ANTICALCIFICANTES DO PERICÁRDIO BOVINO  
FIXADO COM GLUTARALDEÍDO EMPREGADO NA CONFECÇÃO  
DE VÁLVULAS CARDÍACAS**

**Comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos**

**José Augusto Baucia**

**RESUMO**

O pericárdio bovino tratado com glutaraldeído é um dos tecidos mais utilizados na confecção de válvulas cardíacas, porém a calcificação tardia pós-implante é a causa predominante de falência e continua sendo o grande desafio nos nossos dias. O estudo da calcificação e de meios para controlá-la ou postergá-la tem sido o foco de muitas pesquisas nas últimas duas décadas, entretanto um estudo comparativo quantitativo das dosagens de  $\text{Ca}^{2+}$  obtidas por diferentes autores é inadequado porque as técnicas de fixação não seguem um padrão único. O presente estudo vem contribuir nesse sentido, avaliando os agentes anticalcificantes mais promissores investigados na literatura e um outro possível candidato, a radiação gama. A metodologia empregada permitiu a análise comparativa, em termos quantitativos, dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  pós-implante, bem como do comportamento mecânico do tecido tratado. A partir dessa análise, foi possível selecionar os agentes que proporcionaram os menores índices de calcificação e que preservaram as características mecânicas do tecido. Foi então avaliado um possível efeito sinérgico entre esses agentes através de tratamentos seqüenciais. As baixas dosagens de  $\text{Ca}^{2+}$  pós-implante nos tratamentos seqüenciais confirmaram o efeito sinérgico e as amostras apresentaram um comportamento mecânico adequado para a confecção de válvulas cardíacas.

**ANTI-CALCIFYING TREATMENTS OF GLUTARALDEHYDE FIXED BOVINE  
PERICARDIUM USED IN THE MANUFACTURING OF CARDIAC VALVES**  
**Comparisons and evaluation of possible synergic effects**

**José Augusto Baucia**

**ABSTRACT**

Glutaraldehyde fixed bovine pericardium is one of the most used tissues for heart valves manufacturing. However, late post-implant calcification is the main cause of its failure and preventing its prevention is still a challenge. Attempts to control or mitigate calcification have been the focus of wide research in the last two decades. However, a comparative quantitative study of the  $\text{Ca}^{2+}$  levels obtained by several authors is inadequate because the fixing techniques don't follow the same standard procedure. The present study intends to contribute to this purpose, evaluating the most promising anti-calcifying agents investigated in literature and also of another potential candidate – gamma radiation. The methodology used allowed the comparative quantitative analysis of post-implanted  $\text{Ca}^{2+}$  levels, as well as the mechanical behavior of the tissues. Based on these results, agents which provided lower calcification levels and preserved the mechanical characteristics of the tissue were selected. Then, a possible synergic effect of these agents was evaluated through sequential treatments. Low post-implant  $\text{Ca}^{2+}$  dosages in sequential treatments confirmed the synergic effect and samples showed an adequate mechanical behavior for cardiac valve manufacturing.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
<b>3 MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Tratamento do pericárdio bovino.....	32
3.2 Despolimerização parcial da heparina (grupo 8E).....	35
3.3 Determinação da radiosensibilidade da enzima fosfatase alcalina .....	35
3.4 Avaliação do pericárdio bovino .....	36
3.4.1 Microscopia óptica.....	36
3.4.2 Ensaio de tração.....	36
3.4.3 Determinação da temperatura de encolhimento.....	37
3.4.4 Controle da esterilidade .....	37
3.5 Determinação quantitativa de $Ca^{2+}$ .....	38
3.6 Implante em ratos.....	38
3.7 Análise estatística.....	39
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
4.1 Radiosensibilidade da enzima fosfatase alcalina .....	40
4.2 Microscopia óptica.....	40
4.3 Teste de encolhimento .....	48
4.4 Análise mineral.....	48
4.4.1 Radiação gama .....	48
4.4.2 Temperatura .....	50
4.4.3 Alumínio.....	50
4.4.4 Éter dietílico.....	51
4.4.5 Etanol.....	52
4.4.6 Quitosana .....	53
4.4.7 Heparina .....	54
4.4.9 $NaBH_4$ .....	55
4.5 Comportamento mecânico .....	55

4.6 Seleção dos agentes anticalcificantes empregados nos tratamentos seqüenciais .....	61
4.7 Tratamentos Seqüenciais.....	62
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
TABELA 1 – Técnicas de fixação com o glutaraldeído empregadas por diferentes autores.....	20
TABELA 2 – Dosagem de $Ca^{2+}$ das amostras pré e pós-implante obtida em função dos diversos tratamentos empregados.....	49
TABELA 3 – Porcentagem de alongamento na tensão máxima obtida em função dos diversos tratamentos empregados.....	56
TABELA 4 – Dosagem de $Ca^{2+}$ das amostras pré e pós-implante obtida nos tratamentos seqüenciais.....	64
TABELA 5 – Porcentagem de alongamento na tensão máxima obtida nos tratamentos seqüenciais.....	64

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
FIGURA 1 - Formas apresentadas pelo glutaraldeído em soluções aquosas. ....	14
FIGURA 2 - Representação esquemática da reação do glutaraldeído em sua forma monomérica com grupos aminas do colágeno.....	15
FIGURA 3 - Representação esquemática das ligações inter e intramoleculares em uma fibra colágena pela polimerização do glutaraldeído. ....	16
FIGURA 4 – Ligação cruzada entre grupos carboxila promovida pelo $Al^{3+}$ .....	24
FIGURA 5 – Reação da quitosana com resíduos ácidos. ....	26
FIGURA 6 – Reação da heparina despolimerizada com a quitosana. ....	28
FIGURA 7 – Reação da heparina despolimerizada com o 1-6-diaminohexano....	29
FIGURA 8 – Fluxograma da metodologia empregada.....	31
FIGURA 9 – Atividade hidrolítica da enzima fosfatase alcalina frente à várias doses de radiação gama.....	40
FIGURA 10 – Micrografias das amostras explantadas de pericárdio bovino obtidas em função dos diversos tratamentos empregados.....	47
FIGURA 11 – Temperatura de encolhimento das amostras obtida em função dos diversos tratamentos empregados. ....	48
FIGURA 12 – Dosagem de $Ca^{2+}$ das amostras explantadas obtida em função dos diversos tratamentos empregados. ....	50
FIGURA 13 – Tensão máxima obtida em função dos diversos tratamentos empregados. ....	56
FIGURA 14 – Curvas de tensão x deformação obtidas em função dos diversos tratamentos empregados.....	58
FIGURA 15 – Micrografias das amostras explantadas de pericárdio bovino submetidas aos tratamentos seqüenciais.....	63
FIGURA 16 – Curvas de tensão x deformação obtidas nos tratamentos seqüenciais. ....	64

## 1 INTRODUÇÃO

Os tecidos biológicos empregados atualmente na confecção de válvulas cardíacas compreendem a válvula aórtica porcina e o pericárdio bovino, ambos ricos em tecido conectivo, cujo principal componente é o colágeno. No pericárdio bovino o tecido apresenta-se disposto em três camadas compactas e alinhadas em diferentes direções: a serosa, a fibrosa e o tecido conectivo epipericárdico, todas contendo grande quantidade de colágeno tipo I (aproximadamente 90%)<sup>1</sup>.

Colágeno é um termo genérico que engloba uma família de proteínas extracelulares, que são essencialmente polímeros de aminoácidos; consiste de três cadeias de polipeptídios, arranjadas em configuração de tripla hélice, apresentando grupos carboxila e amina terminais que não participam das hélices<sup>2</sup>. Duas dessas três cadeias são idênticas e designadas cadeias  $\alpha_1$ , e a terceira, designada cadeia  $\alpha_2$ , é um produto distinto, embora a seqüência de aminoácidos nos dois tipos de cadeias seja muito similar<sup>3</sup>. No seu estado natural a configuração em tripla hélice é mantida por ligações químicas diretas, pontes de hidrogênio e ligações hidrofílicas. Nos tecidos biológicos a elastina e as glicoproteínas, que são mucopolissacarídeos unidos covalentemente às proteínas, encontram-se associados ao colágeno.

Os tecidos colágenos apresentam rápida degeneração e necessitam ser estabilizados no sentido de prolongar a estrutura e integridade mecânica original e remover ou neutralizar as suas propriedades antigênicas, para que possam ser empregados em biomateriais. Esta estabilização consiste, basicamente, na criação de ligações suplementares nas moléculas de colágeno, que reforcem o tecido, sem alterar substancialmente as características originais, necessárias ao seu emprego em biomateriais.

O processo de estabilização envolve um agente químico ou um processo físico que promova, de forma irreversível e estável, ligações químicas, intra e intermoleculares, preferencialmente entre os grupos funcionais dos resíduos dos aminoácidos que compõem a cadeia peptídica<sup>3-7</sup>. Esses

aminoácidos contêm grupos aminas ( $\text{NH}_2$ ), ácidos ( $\text{COOH}$ ) e hidroxilas ( $\text{OH}$ ) pendentes que, junto com as ligações aminas dos polímeros, constituem os locais de possível reação química <sup>2</sup>.

Vários agentes químicos foram testados, em condições variadas de temperatura, concentração e pH, em sua habilidade para estabilizar tecidos colágenos <sup>1, 3, 8 - 12</sup>, dentre os quais o glutaraldeído destacou-se como o mais efetivo em impedir a degeneração estrutural, macro e microscópica, recebeu aceitação generalizada e é o agente mais empregado comercialmente para a estabilização do pericárdio bovino. Subseqüentemente, testes biomecânicos, de desnaturação térmica e digestão enzimática indicaram que certos tecidos animais estabilizados com o glutaraldeído (entre os quais o pericárdio bovino) eram adequados para a confecção de válvulas cardíacas. A partir do sucesso de sua aplicação por Carpentier <sup>13</sup>, no final dos anos 60, muitas variações foram introduzidas para otimizar sua eficiência <sup>4, 14</sup>.

Embora o tratamento com o glutaraldeído forneça um tecido biológico adequado à confecção de válvulas cardíacas, por produzir um material relativamente inerte e biologicamente compatível, ele não é o tratamento ideal, pois podem ocorrer alterações no tecido implantado, como a infiltração fibrótica, a degeneração, a rejeição imunológica, a sensibilização, a toxicidade do glutaraldeído não reativo, a trombose e em particular a calcificação tardia pós-implante, causa predominante de falência das válvulas cardíacas,

As tentativas para controlar ou mitigar a calcificação em tecidos biológicos fixados pelo glutaraldeído, tem apresentado muitos possíveis candidatos, efetivos em interromper ou retardar uma ou mais etapas no processo de calcificação em pequenos animais de experimentação. Analisando-se a literatura, entretanto, verifica-se que os dados experimentais relatados por diferentes autores não permitem uma correlação, pois o processamento do pericárdio bovino não segue um único padrão, variando de acordo com o pesquisador.

Observa-se também uma dissociação entre os processos desenvolvidos experimentalmente para o controle da calcificação e a viabilidade do seu emprego comercial, tanto em relação à adaptação dos processos como na preservação das características físico-químicas e biológicas iniciais do tecido.

aminoácidos contêm grupos aminas ( $\text{NH}_2$ ), ácidos ( $\text{COOH}$ ) e hidroxilas ( $\text{OH}$ ) pendentes que, junto com as ligações aminas dos polímeros, constituem os locais de possível reação química <sup>2</sup>.

Vários agentes químicos foram testados, em condições variadas de temperatura, concentração e pH, em sua habilidade para estabilizar tecidos colágenos <sup>1, 3, 8 - 12</sup>, dentre os quais o glutaraldeído destacou-se como o mais efetivo em impedir a degeneração estrutural, macro e microscópica, recebeu aceitação generalizada e é o agente mais empregado comercialmente para a estabilização do pericárdio bovino. Subseqüentemente, testes biomecânicos, de desnaturação térmica e digestão enzimática indicaram que certos tecidos animais estabilizados com o glutaraldeído (entre os quais o pericárdio bovino) eram adequados para a confecção de válvulas cardíacas. A partir do sucesso de sua aplicação por Carpentier <sup>13</sup>, no final dos anos 60, muitas variações foram introduzidas para otimizar sua eficiência <sup>4, 14</sup>.

Embora o tratamento com o glutaraldeído forneça um tecido biológico adequado à confecção de válvulas cardíacas, por produzir um material relativamente inerte e biologicamente compatível, ele não é o tratamento ideal, pois podem ocorrer alterações no tecido implantado, como a infiltração fibrótica, a degeneração, a rejeição imunológica, a sensibilização, a toxicidade do glutaraldeído não reativo, a trombose e em particular a calcificação tardia pós-implante, causa predominante de falência das válvulas cardíacas,

As tentativas para controlar ou mitigar a calcificação em tecidos biológicos fixados pelo glutaraldeído, tem apresentado muitos possíveis candidatos, efetivos em interromper ou retardar uma ou mais etapas no processo de calcificação em pequenos animais de experimentação. Analisando-se a literatura, entretanto, verifica-se que os dados experimentais relatados por diferentes autores não permitem uma correlação, pois o processamento do pericárdio bovino não segue um único padrão, variando de acordo com o pesquisador.

Observa-se também uma dissociação entre os processos desenvolvidos experimentalmente para o controle da calcificação e a viabilidade do seu emprego comercial, tanto em relação à adaptação dos processos como na preservação das características físico-químicas e biológicas iniciais do tecido.

O presente estudo vem contribuir nesse sentido, avaliando os agentes anticalcificantes mais promissores investigados na literatura e um outro possível candidato, a radiação gama.

Do exposto preliminarmente o objetivo da presente investigação foi propor e avaliar um possível efeito sinérgico dos agentes anticalcificantes que proporcionaram os menores índices de calcificação e que preservaram as características mecânicas do tecido, fundamentais para a confecção de válvulas cardíacas, através de um tratamento seqüencial. Por seqüencial entenda-se a exposição sucessiva do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído aos agentes anticalcificantes selecionados.

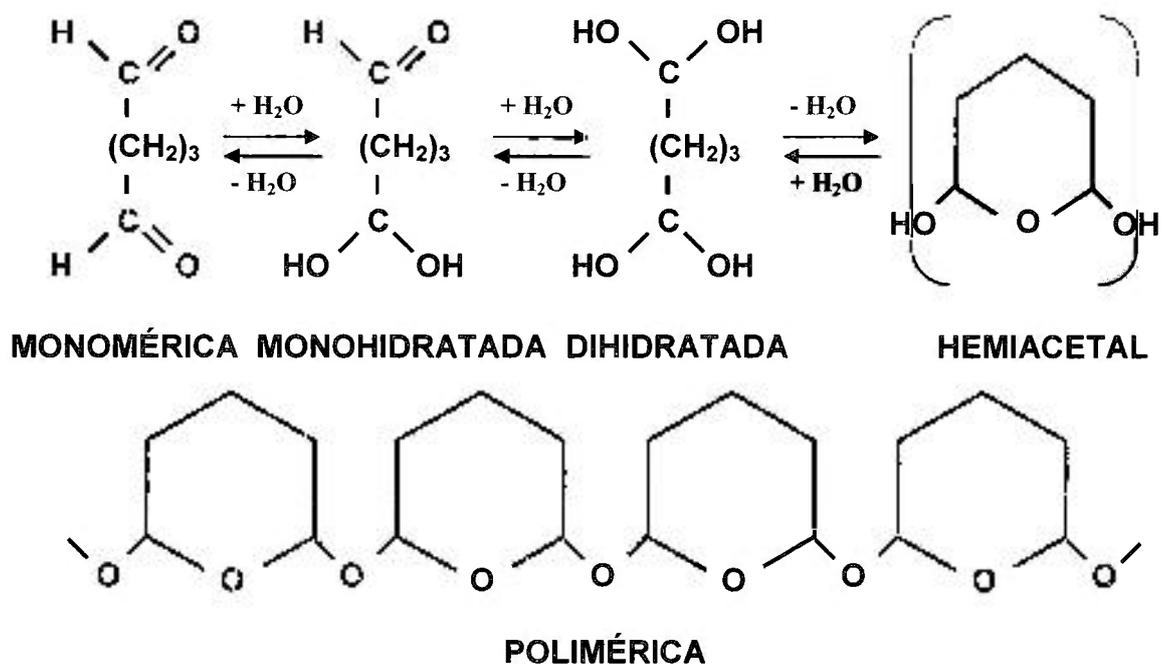
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Os métodos empregados para a estabilização dos tecidos colágenos podem ser físicos ou químicos. Os métodos físicos compreendem a desidratação, o aquecimento, a exposição a raios ultravioleta e gama. Embora não introduzam agentes químicos tóxicos no tecido, tais métodos têm se mostrado insuficientes em proporcionar a quantidade de ligações necessárias para uma estabilização adequada<sup>8,9</sup>.

Nos métodos químicos empregam-se compostos bifuncionais que interagem com o colágeno em dois sítios diferentes. Os grupos funcionais desses compostos podem reagir com as terminações  $\epsilon$ -aminas dos resíduos dos aminoácidos lisina e hidroxilisina – localizadas, em sua maioria, similarmente ao longo dos dois tipos de cadeias e, portanto, muito próximas uma das outras – ou com a terminação carboxila dos ácidos aspártico e glutâmico para formar ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno. A eficiência e a extensão destas reações dependem da penetração do reagente na espessura do tecido, cuja magnitude é função de parâmetros como a concentração da solução, o pH, o tempo e a temperatura de exposição.

De modo geral, quanto maior o número de ligações exógenas criadas, maior a durabilidade do tecido<sup>2,4</sup>. O tratamento deve idealmente proporcionar ligações suficientes entre as moléculas do colágeno para que o tecido, quando implantado, resista até o final da vida do receptor com suas características iniciais, como sua propriedade mecânica de alongação, permitindo uma performance semelhante ao seu estado natural.

O glutaraldeído é uma molécula alifática de cinco carbonos com um grupo aldeído em cada extremidade da cadeia, o que a torna bifuncional. É facilmente encontrado, a um custo não elevado, e forma soluções aquosas que conseguem efetivamente promover ligações cruzadas no tecido em períodos relativamente curtos. Quando em solução aquosa apresenta tendência a se polimerizar, apresentando-se raramente em sua forma monomérica<sup>2</sup> (Fig. 1).

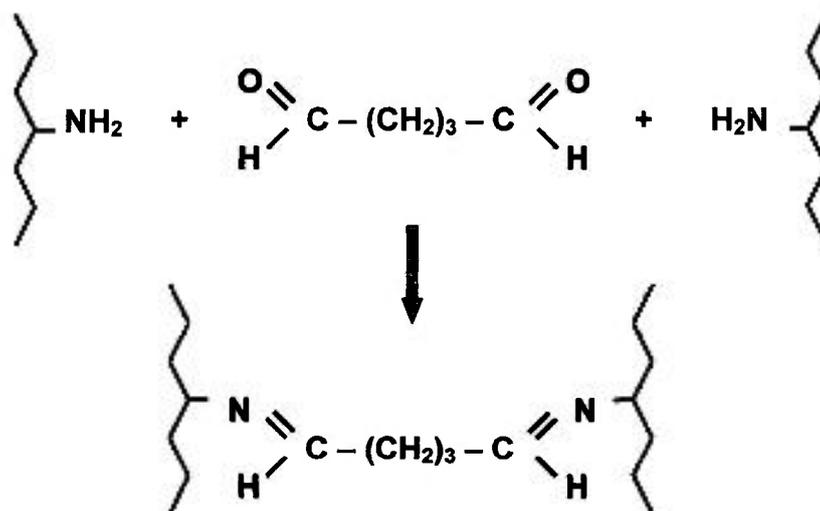


**FIGURA 1- Formas apresentadas pelo glutaraldeído em soluções aquosas.**

O glutaraldeído é capaz de reagir com grupos aminos no colágeno formando ligações químicas e sendo bifuncional pode ligar-se a duas moléculas de colágeno diferentes, criando ligações cruzadas (Fig. 2), unindo peptídeos separados por distâncias significativas com a formação de longos e complicados polímeros<sup>3,5</sup>. Estima-se que seja necessária uma cadeia polimérica composta por mais de cinco moléculas para preencher o espaço entre dois grupos aminos na molécula de colágeno<sup>10</sup>.

A quantidade de glutaraldeído incorporado ao tecido depende fortemente do pH. Em soluções ácidas a quantidade incorporada corresponde a aproximadamente 1/5 dos níveis encontrados em incubações fisiológicas ou básicas. Este fato pode ser explicado pela taxa de reação, que é determinada pela concentração disponível de R – NH<sub>2</sub> com um par de elétrons não compartilhado. Se o par de elétrons não compartilhado do nitrogênio do R – NH<sub>2</sub> é protonado (o que ocorre em soluções ácidas), ele não pode atacar o carbono do grupo carboxila do aldeído. Por outro lado, a protonação do grupo carboxila pode favorecer sua reatividade por meio de agentes nucleofílicos. A combinação favorável dos reagentes ocorre com a carboxila protonada e com o par de

elétrons não compartilhados do nitrogênio do grupo amina, em  $\text{pH} > 7,0$  <sup>6</sup>. Adicionalmente, quando o glutaraldeído reage com uma solução de aminoácidos ou proteínas, a solução torna-se lentamente mais ácida. Assim, a manutenção de um  $\text{pH} 7,4$ , com o emprego de solução tampão, pode favorecer esta reação.



**FIGURA 2 - Representação esquemática da reação do glutaraldeído em sua forma monomérica com grupos aminos do colágeno.**

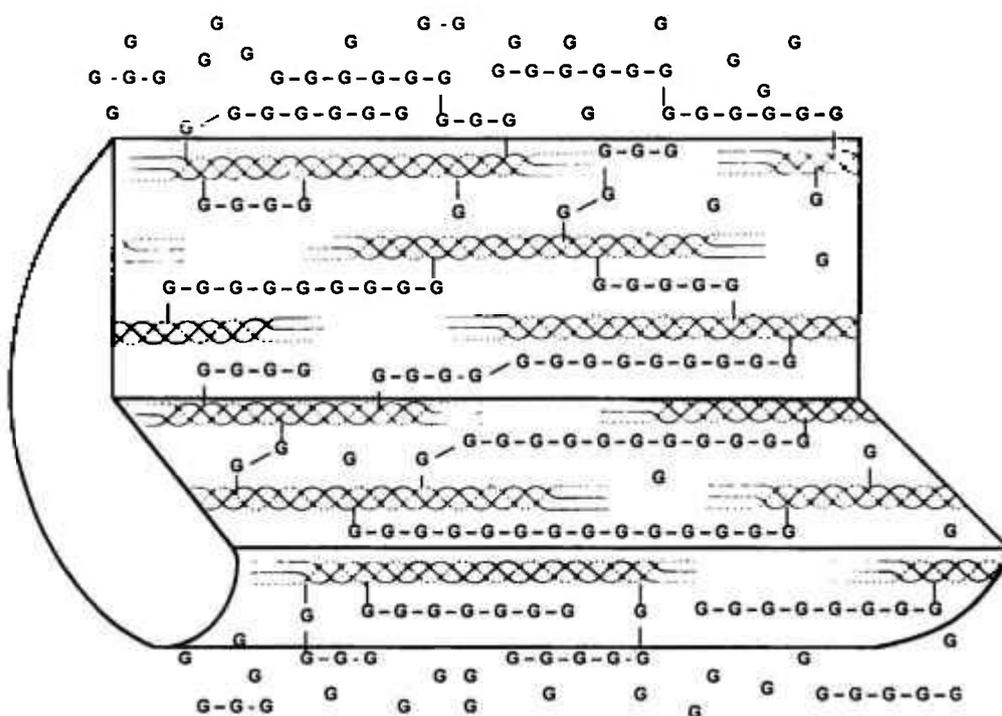
A concentração do glutaraldeído e o tempo de fixação constituem fatores determinantes do tipo de ligações cruzadas formadas. Baixas concentrações favorecem a formação de ligações intramoleculares, ao passo que altas concentrações favorecem a formação de polímeros de alto peso molecular, que são hábeis em gerar uma rede intermolecular de ligações cruzadas <sup>15</sup>.

Caso a formação desses polímeros de alto peso molecular seja rápida, eles podem criar uma barreira química artificial na superfície das fibras colágenas, dificultando o acesso de novas moléculas ao interstício de grande número de fibras; ocorreria a formação de um obstáculo estérico, onde novas moléculas integrar-se-iam preferencialmente aos polímeros na superfície, depletando o glutaraldeído livre da solução, o que resultaria em uma fixação não uniforme das proteínas do tecido <sup>4</sup> (Fig. 3).

Como a polimerização ocorre mais rapidamente em temperaturas mais elevadas, com a exposição à luz, e em soluções com  $\text{pH}$  elevado e maior tempo de preparo <sup>10</sup>, uma maior concentração das formas monoméricas ocorre com a

manutenção da solução a 4°C, ao abrigo da luz, em pH fisiológico e com trocas sucessivas da solução.

Através de estudos de difusão para avaliar a permeabilidade dos tecidos colágenos ao glutaraldeído, demonstrou-se, entretanto, que embora exista uma tendência para o transporte mais rápido através do tecido fresco, a difusão ocorre tanto através do tecido fresco como do fixado. Assim, embora o tecido fixado seja menos permeável que o tecido fresco, ele é poroso o suficiente para permitir a livre passagem de moléculas com o peso molecular do glutaraldeído, qualquer que seja o pH <sup>6</sup>.



**FIGURA 3 - Representação esquemática das ligações inter e intramoleculares em uma fibra colágena pela polimerização do glutaraldeído.**

Empregando-se uma relação de cerca e 0,4 peso/peso (glutaraldeído/tecido) a quantidade de glutaraldeído incorporada atinge um platô de aproximadamente 300 nM/mg em pH fisiológico e a quantidade incorporada permanece constante mesmo após incubações de sete dias. Embora altas

incorporações de glutaraldeído (superiores a 400 nM/mg) possam ser obtidas com o tratamento em soluções com pH elevado, a extensão das ligações cruzadas é idêntica à obtida com uma menor incorporação em pH 7,4<sup>6</sup>. Este excesso de glutaraldeído incorporado ocorre provavelmente na forma polimérica, pois o mesmo polimeriza-se rapidamente em soluções básicas. Este fato pode ser observado macroscopicamente, pois o pericárdio bovino adquire uma coloração amarela-âmbar, mais escura do que o tratado em pH fisiológico e retorna à coloração branca após a sua redução com o borohidreto de sódio.

O grau de resistência do tecido fixado depende da extensão das ligações cruzadas e pode ser avaliado pela resistência do tecido à digestão enzimática<sup>4, 7</sup> e pela determinação da temperatura de desnaturação, que é a temperatura requerida para liberar as pontes de hidrogênio da tripla hélice do colágeno e modificar aleatoriamente sua configuração<sup>10</sup>. A baixa incorporação de glutaraldeído resulta na formação de poucas ligações cruzadas e o tecido torna-se susceptível a digestão pela colagenase, ao passo que a alta incorporação (280 – 420 nM/mg) introduz uniformemente altos níveis de ligações cruzadas e confere resistência à ação proteolítica, tornando o tecido tratado cerca de 10 vezes mais resistente do que o tecido fresco. A estabilidade térmica do pericárdio bovino, com desnaturação em temperaturas superiores a 82°C, também tem sido empregada como indicador do tipo de ligações cruzadas obtidas durante as modificações químicas<sup>16</sup>.

O glutaraldeído é tóxico para os tecidos do hospedeiro, fato que se torna evidente quando o excesso deste reagente não é removido adequadamente<sup>17</sup>. Esse excesso pode ser liberado do tecido, por um certo período, após seu implante e as moléculas de aldeído livres na superfície do tecido sofrem um processo de oxidação com formação de ácidos que podem se complexar com o cálcio do plasma hospedeiro. Essa reação tóxica no local de implante pode ser avaliada e os efeitos residuais podem ser detectados em tecidos animais até seis meses após o implante.

Desde os primórdios da cirurgia cardíaca os tecidos colágenos vem sendo empregados no reparo de defeitos cardíacos. As primeiras tentativas foram realizadas com o pericárdio fresco, que se mostrou insatisfatório em termos de resposta imunológica do organismo. No início dos anos 60 do século passado o

formaldeído foi empregado como agente fixador de tecidos colágenos, mas as válvulas confeccionadas com esses tecidos apresentaram falência precoce após o implante. A introdução do glutaraldeído por Carpentier <sup>13</sup>, embora não tenha eliminado totalmente as reações imunológicas, as minimizaram de modo significativo, permitindo resultados tardios pós-implante que justificaram os seus empregos em larga escala.

A calcificação tardia pós-implante dos tecidos biológicos tratados com glutaraldeído permanece sendo a causa predominante de falência das válvulas cardíacas e a sua minimização continua sendo o grande desafio nos nossos dias.

A calcificação é muito mais prevalente em pessoas jovens e animais de experimentação do que em paciente mais velhos. Estima-se ser a principal causa de falência das válvulas cardíacas, responsável por 20 a 25% das reoperações em receptores adultos, no período de sete a 10 anos pós-implante <sup>18</sup>, e em porcentagem substancialmente maior em crianças <sup>19</sup>.

A incorporação de um nível crítico de glutaraldeído, requerido para induzir o maior número possível de ligações cruzadas e conferir estabilidade ao material, torna o tecido implantado susceptível a mineralização, ao passo que a incorporação duas a três vezes superior a este nível crítico não reforça os níveis de calcificação <sup>6</sup>.

A calcificação é um processo multifatorial, no qual concorrem fatores do hospedeiro, do implante e biomecânicos <sup>20, 21</sup>. O desenvolvimento de métodos terapêuticos preventivos para o controle da calcificação depende do conhecimento dos sítios primários onde o seu depósito se inicia. O mecanismo através do qual o glutaraldeído facilita a calcificação do tecido implantado não está totalmente elucidado. Sabe-se, entretanto, que com a incorporação da quantidade requerida para conferir estabilidade ao material ocorre uma ruptura na regulação do cálcio tissular devido à paralisia do metabolismo energético e perda da integridade estrutural das membranas.

Por meio de estudos ultra-estruturais demonstrou-se que o depósito inicial de cálcio está associado às células desvitalizadas, sendo as organelas citoplasmáticas (particularmente as mitocôndrias) e a membrana plasmática das células intersticiais os sítios iniciais de mineralização. O envolvimento das fibras colágenas extracelulares ocorre numa etapa posterior <sup>21</sup>.

Estes primeiros eventos na mineralização das células do tecido conectivo resultam da desvitalização induzida pelo glutaraldeído. Células intactas e vivas têm baixa concentração intracelular de cálcio livre (da ordem de  $10^{-7}$  M) ao passo que no meio extracelular a concentração é muito mais alta (da ordem de  $10^{-3}$  M), resultando em um gradiente de 10.000 vezes através da membrana plasmática. No meio intracelular, as maiores concentrações relativas de cálcio estão ligadas às organelas, sendo que as mitocôndrias e as membranas plasmáticas também contêm considerável quantidade de fósforo, a maioria na forma de fosfolipídios <sup>22</sup>.

Nas células saudáveis o cálcio intracelular é mantido baixo pelos processos metabólicos que requerem energia para bombear o  $\text{Ca}^{2+}$  para fora da célula. Assim, a entrada do cálcio dentro das células é passiva, mas o cálcio intracelular é geralmente mantido baixo por meio de processos metabólicos que requerem energia, como o que ocorre na ligação  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática, que requer a energia da hidrólise do ATP para bombear o  $\text{Ca}^{2+}$  fora da célula. Com a desvitalização das células, o cálcio provavelmente entra de forma desimpedida e os mecanismos para a sua remoção não estão mais ativos. Este influxo de cálcio pode reagir com o fósforo compartimentado e depositar-se como hidroxiapatita -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$  – de baixa cristalinidade. Tais cristais são altamente insolúveis em pH fisiológico e, uma vez formados, servem como substrato para a precipitação de novos cristais, resultando em depósitos de cálcio macroscópicos <sup>20, 23</sup>.

Ao contrário do observado em relação às fibras colágenas, o envolvimento da elastina, uma proteína estrutural da matriz extracelular e principal componente das fibras elásticas no tecido conectivo, é pouco citado na literatura. Devido ao pequeno número de resíduos de lisina livres, a elastina é pouco reativa ao glutaraldeído. Preparados de elastina purificada calcificam intensamente quando implantados subcutaneamente em ratos, a despeito de tratados ou não com o glutaraldeído, sugerindo um mecanismo independente de calcificação <sup>24</sup>.

O estudo da calcificação e de meios para controlá-la ou postergá-la tem sido o foco de muitas pesquisas nas duas últimas décadas <sup>1, 12, 16, 20 - 67</sup>, entretanto um estudo comparativo quantitativo das dosagens de  $\text{Ca}^{2+}$  obtidas por diferentes autores é infrutífero porque as técnicas de fixação não seguem um

padrão único. A Tabela 1 exemplifica essa discrepância comparando a concentração de glutaraldeído, o tempo de fixação e a temperatura empregada por diferentes autores.

**TABELA 1 – Técnicas de fixação com o glutaraldeído empregadas por diferentes autores.**

<b>AUTOR</b>	<b>Concentração Glutaraldeído (%)</b>	<b>Tempo fixação</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Rossi et al. <sup>36</sup>	2,5	2 h	ambiente
	0,5	3 h	ambiente
	0,5	15 d	4 - 8
Lee et al. <sup>64</sup>	0,625	10 d	4
Hirsch et al. <sup>32</sup>	0,6	24 h	4
	0,2	2-4 semanas	
Webb et al. <sup>50</sup>	0,6	24 h	2
	0,2	7 d	
Chandy et al. <sup>68</sup>	0,6	24 h	4
	0,2	2 semanas	
Tann et al. <sup>69</sup>	0,45	2 semanas	4
Gatti et al. <sup>70</sup>	0,5	indeterminado	não informado
Chanda et al. <sup>23</sup>	0,1-0,25 - aumento gradual	8 semanas	4 - 10
Chanda et al. <sup>28</sup>	0,1-0,25 - aumento gradual	1 mês	37
Carpentier et al. <sup>71</sup>	0,6	15 dias	4
van Noort et al. <sup>72</sup>	0,5	7 dias	não informado
Bernacca et al. <sup>16</sup>	0,25	5 dias	ambiente
Xi et al. <sup>12</sup>	0,5	96 h	4
	0,2	indeterminado	
Jorge-Herrero et al. <sup>1</sup>	0,2	12 min	não informado

Uma possível tentativa para prevenir a calcificação pode ser a de evitar o uso do glutaraldeído e substituí-lo por novos métodos de fixação, alguns dos quais têm se mostrados promissores. Entretanto a maioria dos resultados é preliminar e um maior desenvolvimento será necessário antes da sua aplicação clínica. Por outro lado, as importantes vantagens do glutaraldeído, como ser solúvel em água, reagir em pH fisiológico e proporcionar produtos estáveis com a sua reação, são fatores fortemente favoráveis à continuidade de seu uso. Outros

possíveis métodos na prevenção podem ser o tratamento do tecido com agentes anticalcificantes ou sua liberação diretamente no tecido por intermédio de um sistema controlado <sup>40, 42, 43</sup>.

A maioria das estratégias empregadas visa:

1. A retirada dos fosfolipídios do tecido, sendo os agentes mais empregados o duodecil sulfato de sódio (SDS) <sup>44</sup>, o éter dietílico <sup>36</sup>, o etanol <sup>45, 49</sup> e o clorofórmio/metanol <sup>1, 45</sup>.

Devido a sua elevada eletronegatividade e sua presença em todas as estruturas membranosas, os fosfolipídios tem sido geralmente implicados na inicialização ou formação dos depósitos de hidroxapatita, provavelmente atraindo eletrostaticamente o cálcio sérico <sup>1</sup>.

A fixação dos tecidos biológicos pelo glutaraldeído resulta da reação do aldeído com os grupos amins das proteínas resultando na criação de ligações cruzadas. Os lipídeos, por não possuírem grupos amins, não são passíveis de serem estabilizados pelo glutaraldeído, podendo, portanto, ser removidos do tecido fixado <sup>30</sup>.

O emprego do éter dietílico acidificado como agente anticalcificante justifica-se pela sua capacidade em remover parcialmente os fosfolipídios do tecido <sup>36</sup>.

O etanol é um eficiente extrator de fosfolipídios, particularmente do colesterol, altera a condução normal de íons através das membranas celulares, afeta significativamente a nucleação do fosfato de cálcio e a sua transformação de fase devido a sua interação com a água, cujo conteúdo diminui permanentemente no tecido <sup>46</sup> e esterifica os grupos carboxilas livres <sup>16</sup>. Além disto o tratamento com o etanol resulta em alterações conformacionais das moléculas de colágeno, em particular na região amida I na espectroscopia pelo infravermelho, que apresenta uma alteração marcante e irreversível, a despeito da estabilização prévia com o glutaraldeído <sup>45</sup>.

2. A inativação da enzima fosfatase alcalina, sendo os agentes mais empregados os difosfonatos <sup>32, 35, 44, 50 - 55</sup> e cátions trivalentes, como o  $Fe^{3+}$  <sup>34, 38, 56 - 59</sup> e o  $Al^{3+}$  <sup>24, 34, 38, 50, 58, 60, 61</sup>.

A não viabilidade dos tecidos tratados com o glutaraldeído foi generalizadamente associada à perda de todas as suas atividades metabólicas normais. Isto se provou ser um conceito incorreto e muitos

estudos vieram demonstrar que o tratamento com glutaraldeído não inibe todas as atividades enzimáticas dos tecidos. Simionescu et al.<sup>73</sup> demonstraram que enzimas proteolíticas estão ativas no pericárdio bovino após a fixação e Maranto et al.<sup>74</sup> demonstraram, pela primeira vez, a retenção da atividade hidrolítica da fosfatase alcalina, no tecido fixado. Embora a extração da enzima ativa no tecido fixado apresente dificuldades técnicas, estudos histoquímicos revelaram a sua presença nas células desvitalizadas a despeito de incubação prolongada<sup>34</sup>. Atividade similar foi observada em preparações obtidas de válvulas explantadas por ruptura do tecido, demonstrando que enzimas catalíticas permanecem ativas após longos períodos de implante<sup>73</sup>.

Como a mineralização fisiológica e patológica em outros tecidos e nas válvulas cardíacas iniciam-se largamente nas estruturas membranosas derivadas das células, e como a fosfatase alcalina tem uma importante função na nucleação mineral dos ossos, é admissível supor que ela contribua na mineralização das válvulas. Acredita-se que ela facilite a mineralização por vários possíveis mecanismos, incluindo aumento na concentração local de fosfatos nos sítios potenciais de calcificação e degradação dos inibidores endógenos da calcificação como os pirofosfatos e fosfocitratos<sup>75</sup>.

Há uma forte correlação entre a distribuição da atividade da fosfatase alcalina e os sítios iniciais e predominantes de acúmulo mineral observados em explantes clínicos e em modelos experimentais. As células do tecido conectivo intersticial e a camada de células endoteliais dos pequenos vasos sanguíneos, freqüentemente as primeiras a se mineralizarem, reagem fortemente a fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina foi encontrada, por microscopia eletrônica, ao longo das membranas de vesículas, mitocôndrias e outras estruturas celulares, onde o depósito mineral inicia-se. As fibras colágenas, que parecem mineralizarem-se posteriormente, não são reativas<sup>74, 76</sup>.

Outra observação relevante é a de que os implantes subcutâneos apresentam picos nos níveis da fosfatase alcalina após 72 horas de implante, coincidindo com o desencadeamento da calcificação, indicando que ela desempenhe um papel importante no processo inicial da calcificação. A atividade enzimática

diminui enquanto o depósito mineral aumenta, parecendo normalizar após 21 dias do implante <sup>77</sup>.

Uma vez demonstrada a retenção da atividade da fosfatase alcalina após o tratamento químico, necessita ser demonstrado o quanto esta enzima contribui para a calcificação das válvulas cardíacas. Estando a fosfatase alcalina envolvida na mineralização do tecido, várias estratégias podem ser consideradas para retardá-la ou preveni-la.

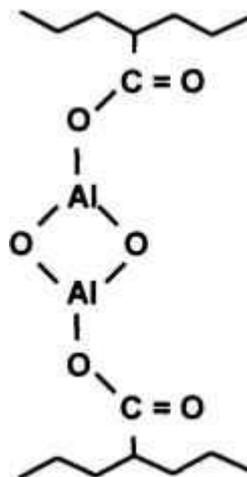
A justificativa na utilização de cátions trivalentes como agente anticalcificante baseia-se em várias observações:

Estes cátions possuem um elevado potencial de ligação iônica, forte o suficiente para competir com o  $\text{Ca}^{2+}$  na ligação com grupos fosfatos carregados negativamente, assim como com outros resíduos nas fibras colágenas <sup>26</sup>. O  $\text{Al}^{3+}$  atua ligando-se às células desvitalizadas pelo glutaraldeído e aos locais da membrana ricos em fósforo, podendo prevenir assim a cristalização da hidroxiapatita nestes sítios. Além disto, a inibição pode ocorrer por outros mecanismos; demonstrou-se, *in vitro*, que os íons  $\text{Al}^{3+}$  podem ser absorvidos nos cristais de hidroxiapatita e inibir severamente tanto a sua formação como sua dissolução <sup>60</sup>. Embora outros cátions trivalentes, como o  $\text{Fe}^{3+}$ , possam interferir com o crescimento dos cristais de hidroxiapatita, seja competindo com o  $\text{Ca}^{2+}$  por seus sítios, seja por sua absorção pelo cristal, demonstrou-se que quanto menor o seu peso molecular maior os efeitos inibitórios observados, fato este que explica ser o  $\text{Al}^{3+}$  considerado o cátion mais efetivo na inibição do processo de calcificação <sup>78</sup>.

Por outro lado, os sítios ativos da enzima fosfatase alcalina são ativados por cátions bivalentes como  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Cátions trivalentes, como o  $\text{Al}^{3+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ , provavelmente competem com os mesmos nestes sítios de ligação metálica inibindo a atividade da fosfohidrolase <sup>34</sup>. A correlação entre a inibição da calcificação com a redução da atividade da fosfatase alcalina no tecido tratado com  $\text{AlCl}_3$  e  $\text{FeCl}_3$  foi estabelecida por Levy et al. <sup>34</sup> em implantes subcutâneos em ratos por 21 dias.

Um outro mecanismo, sugerido por Qing <sup>79</sup>, baseia-se no fato que quando o glutaraldeído reage com grupos amina, as carboxilas ficam em excesso relativo, tornam o pericárdio carregado negativamente e atraem íons cálcio.

Cátions trivalentes, como o  $\text{Al}^{3+}$ , podem formar complexos com a água e ligar-se aos grupos carboxila criando ligações cruzadas entre os mesmos (Fig. 4).



**FIGURA 4 – Ligação cruzada entre grupos carboxila promovida pelo  $\text{Al}^{3+}$ .**

O  $\text{Al}^{3+}$  liga-se de forma irreversível a elastina, alterando sua configuração espacial de modo a torná-la resistente à calcificação. Vyavahare et al. <sup>24</sup> avaliaram o efeito anticalcificante de uma solução de  $\text{AlCl}_3$  0,1M por duas horas em um preparado de elastina purificada tratada com glutaraldeído e implantada subcutaneamente em ratos por 21 dias. A dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  nas amostras explantadas com o emprego do  $\text{AlCl}_3$  foi de  $1,66 \pm 0,56 \mu\text{g}/\text{mg}$  contra  $89,06 \pm 17,93 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo controle.

Webb et. al. <sup>61</sup> mensuraram a incorporação do  $\text{Al}^{3+}$  no pericárdio bovino variando a concentração (0,1M, 0,01M e 0,001M) e o tempo de reação (1 hora e 3 dias) do  $\text{AlCl}_3$ , estabelecendo como ideal a concentração de 0,1M por uma hora.

No mesmo trabalho foi realizado um estudo comparativo entre os cátions  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  e  $\text{Ga}^{3+}$ , com implantes subcutâneos do tecido tratado em ratos por 21 dias, obtendo-se inibição da calcificação apenas com o  $\text{Al}^{3+}$  ( $5,5 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ ) e em menor extensão com o  $\text{Fe}^{3+}$  ( $13,6 \pm 4,6 \mu\text{g}/\text{mg}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ ) quando comparados com o grupo controle ( $63,3 \pm 5,7 \mu\text{g}/\text{mg}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ ).

A incorporação do  $\text{Al}^{3+}$  ao tecido depende do pH da solução. A dissolução do  $\text{AlCl}_3$  só ocorre em meio muito ácido (pH  $\sim$  3,0); em pH mais elevado ocorre a

precipitação do alumínio, perdendo-se quase totalmente sua capacidade de penetração no tecido <sup>80</sup>.

A estabilidade do Al<sup>3+</sup> incorporado ao tecido também foi avaliada por Webb et al. <sup>61</sup>, observando-se uma redução de 9.033 ± 680 µg/mg para 2.700 ± 156 µg/mg após 21 dias do implante subcutâneo em ratos, mantendo-se sem variações significativas por até 120 dias.

Os efeitos anticalcificantes dos difosfonatos foram investigados inicialmente através de injeções endovenosas sistêmicas nos animais de experimentação, entretanto os efeitos adversos, incluindo elevação moderada dos níveis de cálcio sanguíneo e severos distúrbios de crescimento, limitaram os seus uso. Posteriormente foi avaliada a liberação local, diretamente sobre o tecido, através de bombas de infusão, reduzindo em cerca de 100 vezes a quantidade necessária para inibição da calcificação. E finalmente através da sua incorporação diretamente no tecido com o emprego do aminopropanohidroxidifosfonato.

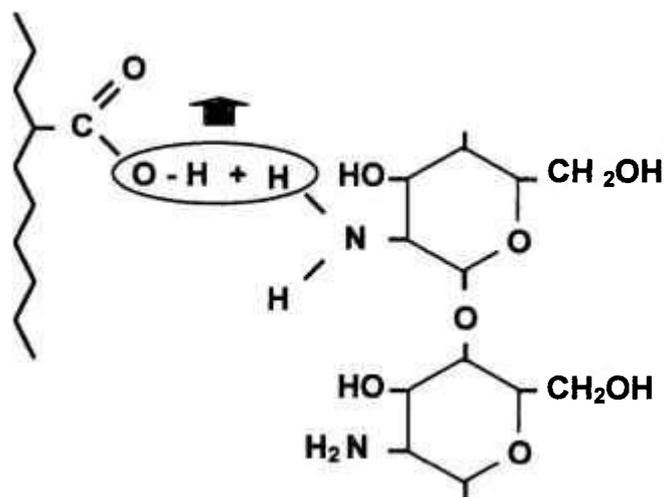
3. A neutralização dos grupos aldeído não reativos, sendo os agentes mais empregados os compostos aminados, como a quitosana <sup>33, 62</sup>, o ácido aminooleico <sup>56, 66, 67</sup> e agentes redutores, como o borohidreto de sódio <sup>4, 6</sup>.

O glutaraldeído é tóxico para os tecidos do hospedeiro, fato este que se torna evidente quando o excesso deste reagente não é removido adequadamente. O glutaraldeído residual pode ser liberado do tecido por um certo período após seu implante e as moléculas de aldeído livres na superfície do tecido sofrem um processo de oxidação com formação de ácidos que podem se complexar com o cálcio do plasma hospedeiro <sup>33, 81</sup>.

Tecidos implantados sem retirada do excesso de glutaraldeído apresentam aguda e severa reação inflamatória, que consiste no aparecimento de macrófagos e neutrófilos em grande quantidade ao redor e no material de implante. Esta infiltração de macrófagos promove a separação das bandas do colágeno fixado e parece iniciar sua destruição <sup>17</sup>. Estando os grupos aldeídos livres, na superfície do tecido, envolvidos no processo de calcificação, a sua neutralização com compostos aminados, como a quitosana, pode ser útil na prevenção.

A quitosana é produzida da quitina, extraída de carapaças de caranguejos e lagostas, que são restos da indústria de processamento destes crustáceos, pelo tratamento com álcalis. Uma grande variedade de substâncias, com diferentes propriedades podem ser obtidas da quitina. No tratamento da quitina com bases, os grupos acetamidas são hidrolizados para fornecer grupos aminas livres. Esta hidrólise é geralmente levada a efeito com hidróxido de sódio e hidróxido de potássio em temperaturas elevadas usando flocos ou pós de quitina <sup>82</sup>.

Devido ao grande número de aminas terminais, uma molécula de quitosana [ $\alpha(1-4)$ 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -D-glucano] (peso molecular 2.200 a 86.000) pode combinar-se com um grande número de moléculas de aldeído livres na superfície do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído e simultaneamente pode ligar-se com outras moléculas de quitosana com a ajuda do aldeído residual, lentamente liberado do tecido <sup>27</sup> (Fig. 5).



**FIGURA 5 – Reação da quitosana com resíduos ácidos.**

Assim, a quitosana quando comparada com outros compostos aminados, apresenta maior capacidade em recobrir toda a superfície do tecido sem deixar nenhum sítio ativo para reações futuras com o cálcio plasmático do hospedeiro após o implante, protegendo o tecido da sua impregnação nos estágios iniciais do implante.

O ácido aminooleico deriva do ácido oléico pela adição de um grupo amina na posição  $\alpha$  da molécula. Esta amina liga-se covalentemente aos grupos

aldeídos livres da molécula de glutaraldeído no tecido fixado. Nas primeiras vinte e quatro horas do implante ocorre uma rápida liberação do ácido aminooleico do tecido, processo que continua até trinta dias após o implante, estabilizando-se em cerca de 40% da incorporação inicial <sup>67</sup>.

O emprego do NaBH<sub>4</sub>, um potente agente redutor, baseia-se em duas de suas propriedades:

A primeira diz respeito a sua capacidade de reagir com os grupos aldeídos livres na superfície do tecido, transformando-os em grupos hidroxilas, mais estáveis. Os grupos aldeídos livres quando oxidados formam ácidos que podem se complexar com o cálcio do plasma hospedeiro <sup>33, 81</sup>.

A segunda relaciona-se às reações químicas entre os grupos aldeídos livres e os grupos aminas da molécula de heparina despolimerizada. Esta reação ocorre via formação de bases de Schiff, instáveis, que podem ser convertidas pelo NaBH<sub>4</sub> em aminas secundárias que são mais estáveis <sup>64</sup>.

4. A incorporação de macromoléculas que apresentem um efeito estérico, preenchendo os espaços vazios entre as moléculas de colágeno e reduzindo os nichos físicos disponíveis para o crescimento do cristal de hidroxiapatita, sendo os agentes mais empregados a protamina <sup>58</sup> e a heparina <sup>28, 63, 64, 65</sup>.

O mecanismo anticalcificante das macromoléculas em tecidos tratados com o glutaraldeído permanece não elucidado. É postulado que a ligação de macromoléculas com o colágeno preencha os espaços intertropocolágenos, tornando desta maneira o tecido impermeável ao cálcio plasmático do hospedeiro <sup>28</sup>.

A heparina, um anticoagulante natural responsável pela manutenção da fluidez do sangue, apresenta uma alta carga negativa, devido à presença de grupos sulfonados, e pode interagir com os íons Ca<sup>2+</sup>, impedindo-os de formarem cristais de hidroxiapatita <sup>77</sup>.

As macromoléculas precisam ser parcialmente despolimerizadas para serem incorporadas ao tecido. No caso da heparina isto pode ser realizado através da sua clivagem desaminativa com ácido nítrico, que converte os resíduos de 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosila a resíduos de 2,5-anidro-D-manose, com concomitante liberação da aglicona. Os fragmentos terminais da heparina resultantes são unidades de 2,5-anidro-D-manose, que possuem função

aldeído e não estão envolvidas na formação de hemiacetal intramolecular, sendo conseqüentemente mais reativas que os resíduos terminais da heparina sem modificação <sup>28</sup>.

Embora a heparina parcialmente despolimerizada possa ser incorporada ao tecido, através da reação dos grupos amins com os aldeídos livres das moléculas de glutaraldeído que não formaram ligações cruzadas <sup>64</sup>, emprega-se, preferencialmente, um substrato intermediário de ligação que contenha grupos amins, de modo que a reação ocorra entre estes grupos amins e as carboxilas da heparina, formando bases fracas de Schiff. Essas bases podem ser convertidas a amins secundárias, formando uma ligação química mais estável, pela sua redução com o  $\text{NaBH}_4$  <sup>28</sup>.

Nem todos os compostos aminados, empregados como substratos intermediários, reduzem igualmente a calcificação <sup>23</sup>. Os mais empregados, de acordo com a literatura, são a quitosana e o 1-6-diaminohexano (Fig. 6 e 7).

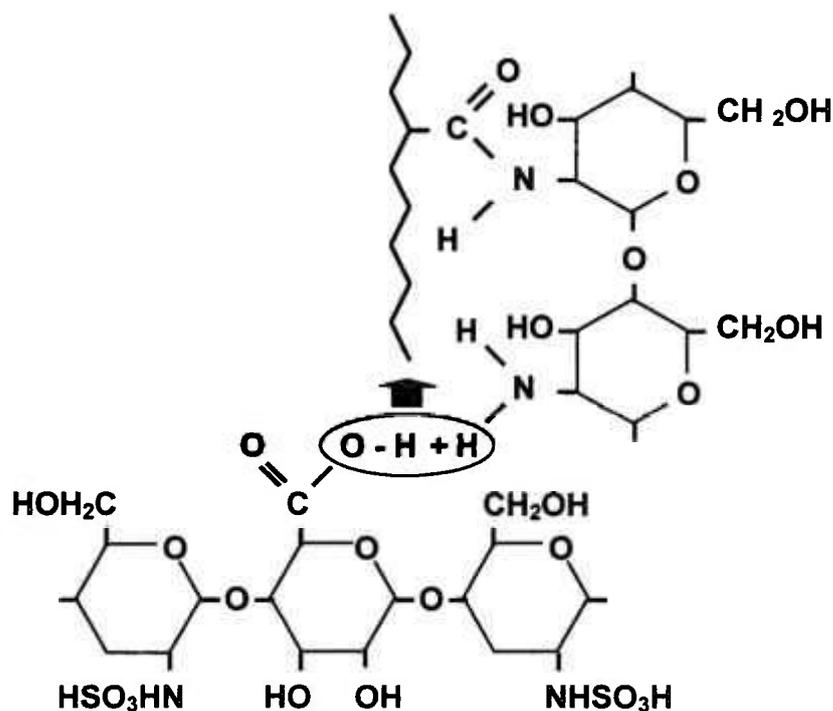
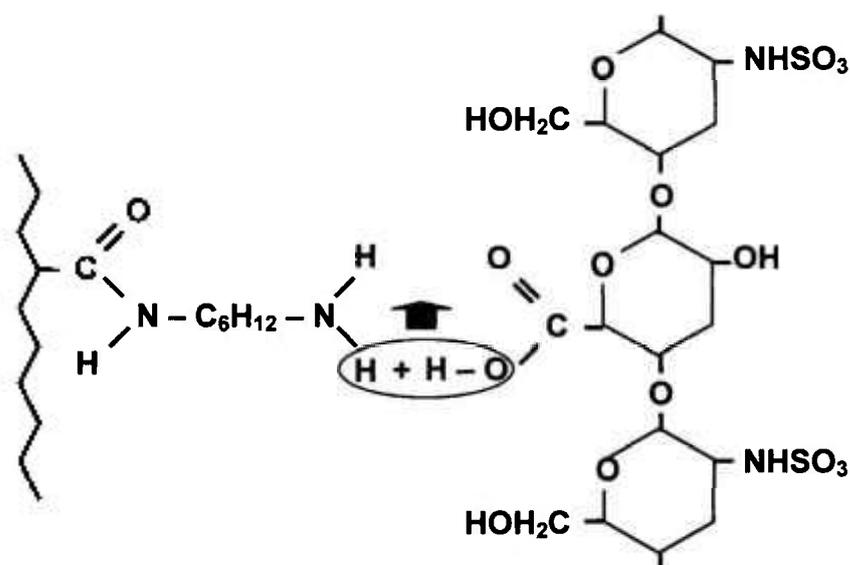


FIGURA 6 – Reação da heparina despolimerizada com a quitosana.



**FIGURA 7 – Reação da heparina despolimerizada com o 1-6-diaminohexano.**

5. O tratamento térmico a 50°C <sup>71</sup>, mais recente.

O efeito anticalcificante do tratamento pelo calor pode ser atribuído a alterações estruturais, extração de lipídios, aumento da resistência à hidrólise e modificações do tipo e concentração das proteínas adsorvidas no tecido <sup>25</sup>.

Carpentier et al. <sup>26</sup> ao empregarem o aquecimento, no intuito de aumentar a incorporação de íons  $Fe^{3+}$  no pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, obtiveram não somente a minimização da calcificação no grupo tratado com  $Fe(NO_3)_3$  como também no grupo submetido à temperatura de 50 °C isoladamente.

Os mesmos autores, em estudo posterior <sup>71</sup>, definiram a temperatura em 50 °C, e a duração em dois meses como sendo a mais efetiva, sem que modificações significativas nas características físicas do tecido fossem observadas. Temperaturas mais elevadas produziram um espessamento do tecido e duração acima de dois meses não aumentaram os efeitos anticalcificantes.

Não existem relatos na literatura sobre os efeitos da radiação gama na calcificação do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, embora Schultz-Hector et al. <sup>83</sup> tenham demonstrado de que a radiação gama leva a uma

diminuição da atividade da fosfatase alcalina endotelial em tecidos vivos do miocárdio de ratos na dose única de 20 Gy (taxa de dose de 2 Gy/min).

A justificativa teórica proposta para o seu emprego como agente anticalcificante seria a da inativação da enzima fosfatase alcalina no tecido.

Como a estabilidade na conformação espacial primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas é fundamental na manutenção de sua atividade, e a radiação gama pode induzir mudanças na conformação espacial das proteínas levando a modificações nas propriedades enzimáticas<sup>84, 85</sup>, é admissível supor que a fosfatase alcalina possa ser inativada com o seu emprego.

Quando enzimas são irradiadas em soluções aquosas diluídas, a inativação deve-se quase exclusivamente a ação dos radicais livres formados<sup>85</sup>. Kopp et al.<sup>86</sup> avaliaram a inibição da desidrogenase alcoólica com doses de radiação gama variando entre 0,025 e 0,6 Mrads obtendo redução de 91% da sua atividade inicial na dose de 500 krads.

Por outro lado, os efeitos deletérios da radiação gama na estrutura do colágeno em meio aquoso foram estudados por Grant et al.<sup>9</sup> observando pequenas evidências de danos estruturais sobre o colágeno nativo com o emprego de doses de até  $10 \times 10^4 \text{ JKg}^{-1}$ . Quando o colágeno foi tratado com o glutaraldeído houve uma marcante proteção contra os efeitos destrutivos da radiação gama e fibrilas bem definidas e evidentes estriações cruzadas foram observadas por microscopia eletrônica em doses de até  $25 \times 10^4 \text{ JKg}^{-1}$ .

### 3 MÉTODOS

A estratégia metodológica empregada na presente investigação consistiu de duas etapas:

A primeira foi a avaliação dos efeitos anticalcificantes de diversos agentes no pericárdio bovino, que pelo fato de ser submetido à mesma técnica de fixação com o glutaraldeído, permitiu uma análise comparativa, em termos quantitativos, dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  pós-implante, bem como do seu comportamento mecânico.

A segunda foi a avaliação de um possível efeito sinérgico entre os agentes anticalcificantes que apresentassem mecanismos de ação diferentes, através de tratamentos seqüenciais. Esses agentes foram selecionados de acordo com os resultados obtidos na primeira etapa.

Um fluxograma da metodologia empregada é apresentado na Figura 8.

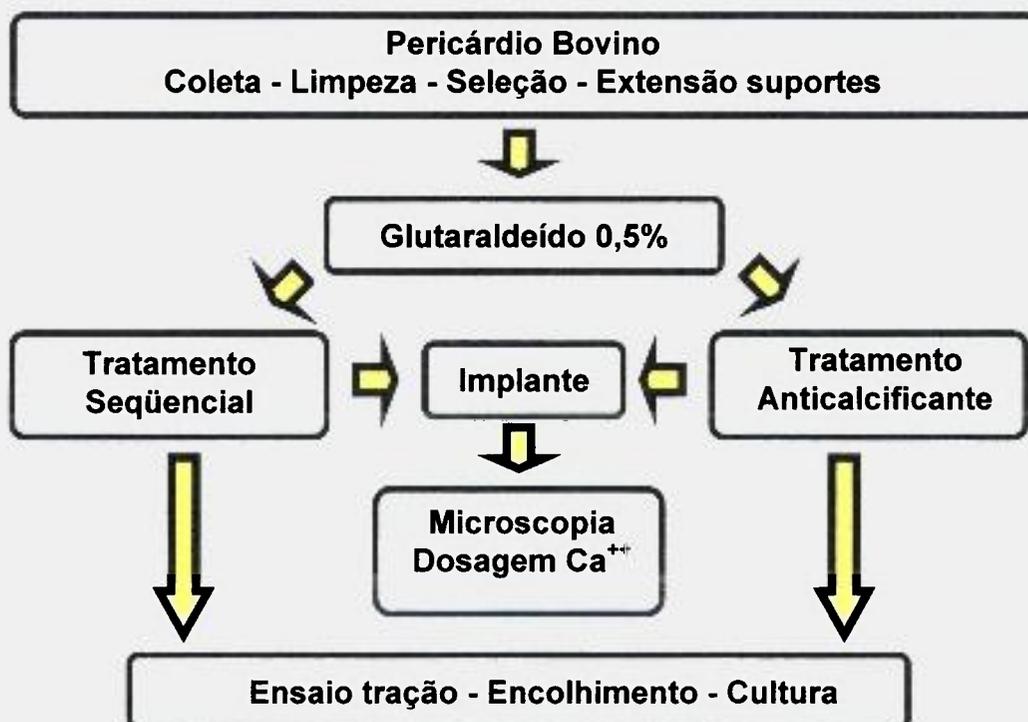


FIGURA 8 – Fluxograma da metodologia empregada.

### 3.1 Tratamento do pericárdio bovino

O pericárdio bovino foi coletado em frigorífico, submetido à fiscalização do Departamento de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura e Departamento de Vigilância Sanitária da Secretaria de Saúde Estadual, imediatamente após o abate do animal. Após uma limpeza inicial, com retirada do tecido gorduroso peri-pericárdico, foram selecionados e transportados em solução salina de NaCl 0,9% e MgSO<sub>4</sub> 0,1%, pH 7,4, a 4°C.

No laboratório o pericárdio foi submetido, assepticamente, a uma nova limpeza, selecionando-se 44 unidades com espessura e homogeneidades similares, que foram estendidas em suportes ovais plásticos medindo 15,0 x 12,0 cm.

Os suportes plásticos contendo os pericárdios bovinos foram submetidos à ação fixadora do glutaraldeído em solução aquosa a 0,5%, a 4°C, pH 7,4, com emprego de tampão fosfato, mantidos ao abrigo da luz durante 10 dias e com trocas da solução após 24 e 72 horas. Completados os 10 dias necessários para fixação, os pericárdios bovinos foram retirados dos suportes e lavados em solução de NaCl 0,9% sob agitação contínua, à temperatura ambiente, por 24 horas, com quatro trocas sucessivas, para a retirada do glutaraldeído não reagente.

Os pericárdios bovinos foram divididos em 22 grupos de acordo com o tratamento subsequente:

- Grupo 1D - Nenhum tratamento, constituiu o grupo controle;
- Grupo 1E - Radiação gama na dose contínua total de 50 Gy;
- Grupo 2D - Radiação gama na dose contínua total de 100 Gy;
- Grupo 2E - Radiação gama na dose contínua total de 200 Gy;
- Grupo 3D - Radiação gama na dose contínua total de 500 Gy;
- Grupo 3E - Radiação gama na dose contínua total de 1000 Gy;
- Grupo 4D - Radiação gama na dose contínua total de 2000 Gy;
- Grupo 4E - Radiação gama na dose contínua total de 5000 Gy;
- Grupo 5D - Radiação gama na dose contínua total de 10000 Gy;
- Grupo 5E - Tratamento térmico com temperatura constante de 50°C, em Banho-Maria, por dois meses;

- Grupo 6D - Solução de EDTA 0,1M, pH 9,0, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, por 24 horas;
- Grupo 6E - Solução de  $\text{AlCl}_3$  0,1M, pH 3,0, à temperatura ambiente, por 24 horas;
- Grupo 7D - Solução de EDTA 0,1M, pH 9,0, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, por 24 horas e solução de  $\text{AlCl}_3$  0,1M, pH 3,0, à temperatura ambiente, por 24 horas;
- Grupo 7E - Éter dietílico 70%, pH 3,0, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, por quatro horas, com quatro trocas sucessivas;
- Grupo 8D - Solução de quitosana 0,125%, pH 6,0, a 4°C, por 72 horas;
- Grupo 8E - Solução de quitosana 0,125%, pH 6,0, a 4°C, por 72 horas, solução de heparina parcialmente despolimerizada 0,1%, pH 7,4, a 4°C, por sete dias e solução de  $\text{NaBH}_4$  0,1M, pH 8,8, à temperatura ambiente por 24 horas;
- Grupo 9D - Solução de 1-6-diaminohexano 5%, pH 7,4, à temperatura ambiente, por 72 horas, solução de heparina parcialmente despolimerizada 0,1%, pH 7,4, à temperatura ambiente por sete dias e solução de  $\text{NaBH}_4$  0,1M, pH 8,8, à temperatura ambiente, por 24 horas;
- Grupo 9E - Etanol 80%, pH 7,4, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, por quatro horas, com quatro trocas sucessivas;
- Grupo 10D - Solução de  $\text{NaBH}_4$  0,1M, pH 8,8, à temperatura ambiente, por 24 horas.
- Grupo 10E - Solução de formaldeído 4%, pH 5,0 à temperatura ambiente;
- Grupo 11D - Tratamento seqüencial intermediário, definido de acordo com os resultados obtidos com os tratamentos individuais descritos, consistindo de Temperatura constante de 50°C, em banho Maria, por dois meses; Éter dietílico 70%, pH 3,0, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, por quatro horas, com quatro trocas sucessivas; e Solução de  $\text{NaBH}_4$  0,1M, pH 8,8, à temperatura ambiente, por 24 horas.
- Grupo 11E - Tratamento seqüencial final, definido de acordo com os resultados obtidos com os tratamentos individuais descritos, consistindo de Temperatura constante de 50°C, em banho Maria, por dois meses; Éter dietílico 70%, pH 3,0, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, por

quatro horas, com quatro trocas sucessivas; Solução de quitosana 0,125%, pH 6,0, a 4°C, por 72 horas, solução de heparina parcialmente despolimerizada 0,1%, pH 7,4, a 4°C, por sete dias e solução de NaBH<sub>4</sub> 0,1M, pH 8,8, à temperatura ambiente por 24 horas.

Para eliminar os resíduos dos compostos químicos ao final de cada tratamento e entre tratamentos seqüenciais, os pericárdios foram lavados em solução de NaCl 0,9%, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, por 24 horas, com quatro trocas sucessivas. Os pericárdios foram mantidos em solução de NaCl 0,9%, com exceção do grupo 10E que foi mantido em solução de formaldeído 4%.

O formaldeído foi incluído nesta investigação porque as válvulas cardíacas de pericárdio bovino são conservadas em formaldeído 4% após sua estabilização com o glutaraldeído. A finalidade foi de avaliar se a conservação em formaldeído teria alguma influência na calcificação do tecido implantado.

A finalidade principal do emprego do NaBH<sub>4</sub> nesta investigação foi a da conversão das bases de Schiff - formadas com a reação entre os grupos aldeídos e os grupos aminas da molécula de heparina - em aminas secundárias, mais estáveis. Entretanto a sua capacidade de reduzir os grupos aldeídos livres na superfície do tecido em álcoois, menos propensos a se complexarem com o cálcio do plasma hospedeiro justifica sua investigação isolada como agente anticalcificante.

Alguns agentes anticalcificantes descritos na literatura (duodecil sulfato de sódio, mistura clorofórmio/metanol, difosfonatos, ácido aminooleico e protamina) não foram investigados neste estudo. Os motivos foram:

O emprego do duodecil sulfato de sódio (SDS), mesmo em baixas concentrações, leva a uma destruição do tecido não fixado, causando extrema fragmentação do colágeno e diminuição significativa da estabilidade térmica. Embora a fixação com o glutaraldeído proporcione certa proteção contra os seus efeitos deletérios, focos de degeneração do colágeno ainda podem ser observados por microscopia eletrônica<sup>87</sup>.

A mistura clorofórmio/metanol, embora efetiva na completa remoção dos fosfolípidios do tecido, promove uma inibição incompleta da calcificação, inferior à obtida com o emprego do etanol <sup>45</sup>.

A incorporação do aminopropanohidroxidifosfonato ao tecido é realizada através de ligações químicas instáveis, sendo lentamente liberado do tecido implantado e promovendo uma intensa reação inflamatória local <sup>32</sup>.

O ácido aminooleico é produzido no laboratório da Medtronic Heart Valve Division, que o emprega na fabricação de biopróteses cardíacas. O processo é patenteado e amostras não foram disponibilizadas para testes.

A investigação da protamina foi preterida para a heparina devido a esta última apresentar propriedades antitrombogênicas, extremamente interessantes para o "revestimento" do tecido biológico.

### **3.2 Despolimerização parcial da heparina (grupo 8E)**

O procedimento empregado para a despolimerização parcial da heparina foi o da utilização de 31.500 UI de heparina e 10 mg de NaNO<sub>2</sub> (Sigma) em 1 L de solução salina de NaCl 0,9%; o pH foi inicialmente ajustado em 2,0, com a adição de HCl 1M, levado a reagir por uma hora a 2 °C e ajustado subsequente em 7,4, com a adição de NaOH 1M. A solução foi mantida à temperatura ambiente.

### **3.3 Determinação da radiosensibilidade da enzima fosfatase alcalina**

As dificuldades técnicas na extração da fosfatase alcalina em tecidos fixados são de tal monta que Schoen et al. <sup>75</sup> chegaram a afirmar que embora a fosfatase alcalina com atividade hidrolítica possa ser extraída de forma reprodutível no pericárdio bovino fresco, ela não pode ser detectada quimicamente após fixação com o glutaraldeído por 24 horas.

Tendo em vista essa dificuldade técnica, optou-se por avaliar a radiosensibilidade da fosfatase alcalina *in vitro*, em uma solução aquosa da enzima pura com atividade conhecida e a atividade remanescente mensurada frente a várias doses de radiação gama. Esta solução foi fracionada em nove alíquotas, acondicionadas em recipientes de vidro e submetidas à radiação gama em gama-

câmara (fonte:  $\text{Co}^{60}$ , atividade de  $22413,1 \times 10^{10}$  Bq e taxa de dose de 5010 Gy/h) nas seguintes doses contínuas:

Alíquota 1: 0 Gy;

Alíquota 2: 50 Gy;

Alíquota 3: 100 Gy;

Alíquota 4: 200 Gy;

Alíquota 5: 500 Gy;

Alíquota 6: 1000 Gy.

Alíquota 7: 2000 Gy.

Alíquota 8: 5000 Gy.

Alíquota 9: 10000 Gy.

A atividade resultante da fosfatase alcalina em cada alíquota foi determinada com o emprego do produto comercial Labtest e leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

### **3.4 Avaliação do pericárdio bovino**

A avaliação da integridade bioquímica, estrutural e funcional do pericárdio fixado pré-implante, foi realizada empregando-se os seguintes procedimentos laboratoriais:

#### **3.4.1 Microscopia óptica**

Uma amostra de cada grupo, foi seccionada, corada pela Hematoxilina-Eosina e pelo método de von Kossa e examinada em microscópio óptico Nikon por transmissão de luz.

#### **3.4.2 Ensaio de tração**

Cinco amostras de cada grupo foram submetidas ao ensaio de tração, em máquina de ensaio INSTRON 4400R para determinação do alongamento e tensão.

As amostras foram cortadas em tiras de 3,0 x 0,4 cm, presas às pinças do aparelho e mantidas imersas em solução salina de NaCl 0,9%, à temperatura constante de 37 °C. Uma força inicial de aproximadamente 0,5 g foi aplicada e o

ensaio foi realizado com velocidade de deslocamento constante de 10 mm/min até o rompimento da amostra.

Foram registradas curvas de força x deslocamento. Para o cálculo da tensão de tração considerou-se a área inicial (largura x espessura) das amostras e o alongamento foi determinado pelo deslocamento das pinças do aparelho. Para determinar a espessura, as amostras foram colocadas entre duas lamínulas de vidro e a medição foi feita com paquímetro digital.

O alongamento foi medido até o ponto equivalente à tensão máxima suportada pelo tecido e a resistência mecânica definida como sendo o valor de tensão máxima suportada.

A curva selecionada para análise como representativa de cada grupo foi a que mais se aproximou do valor médio das tensões máximas. Tensões máximas acima de 17,6 N/mm<sup>2</sup> são consideradas adequadas<sup>36</sup>.

### **3.4.3 Determinação da temperatura de encolhimento**

A temperatura de encolhimento abrupto das amostras, que é temperatura requerida para liberar as pontes de H da tripla hélice e modificar aleatoriamente a configuração do colágeno, foi o método empregado para a determinação do grau de estabilização do tecido após a fixação. Temperaturas acima de 82°C asseguram fixação adequada do tecido.

Cinco amostras de cada grupo, cortadas em tiras de 3,0 x 1,0 cm e imersas em Banho-Maria com solução salina de NaCl 0,9%, foram dispostas de modo a apresentarem uma de suas extremidades fixa no fundo do aparelho e a outra submetida a uma tração de 0,5 g. A temperatura do Banho-Maria foi elevada progressivamente, na razão de 4 °C/min, até ocorrer o encolhimento abrupto da amostra.

### **3.4.4 Controle da esterilidade**

A esterilidade das amostras foi assegurada por meio de culturas em estufa a 25 ° C, por 14 dias, empregando-se como meios de cultura o Tioglicolato e o Sabouraud.

### 3.5 Determinação quantitativa de $\text{Ca}^{2+}$

Cinco amostras de cada grupo foram desidratadas em estufa a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  e mineralizadas em forno de Mufla a  $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ , utilizando-se cadinhos de porcelana. As amostras mineralizadas foram dissolvidas em  $\text{HNO}_3$  2,5 M e enviadas para a determinação quantitativa do  $\text{Ca}^{2+}$  pela espectroscopia de absorção atômica com espectrômetro Perkin Elmer, modelo Analyst 100, no comprimento de onda de 422,7 nm. A curva de calibração foi obtida usando-se solução padrão Perkin Elmer de 1,000 mg/L, com adição de cloreto de lantânio a 1%. A quantidade total de  $\text{Ca}^{2+}$  foi expressa em  $\mu\text{g}$  por mg de tecido seco.

### 3.6 Implante em ratos

Sessenta e seis ratos Wistar, fêmeas, com idade média de 30 dias, foram utilizados no experimento. As normas estabelecidas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) foram respeitados.

Os implantes foram realizados no biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, de onde os animais procederam. Os ratos foram anestesiados com Éter dietílico 70%, tricotomizados e divididos em 11 lotes contendo seis animais cada. Amostras do pericárdio bovino de cada grupo, medindo 2,0 x 1,5 cm, foram implantadas em duas lojas subcutâneas dissecadas na região dorsal dos ratos (à direita e à esquerda) de acordo com o esquema:

- Lote 1 - Implante de uma amostra do grupo 1D à direita e uma amostra do grupo 1E à esquerda em cada animal;
- Lote 2 - Implante de uma amostra do grupo 2D à direita e uma amostra do grupo 2E à esquerda em cada animal;
- Lote 3 - Implante de uma amostra do grupo 3D à direita e uma amostra do grupo 3E à esquerda em cada animal;
- Lote 4 - Implante de uma amostra do grupo 4D à direita e uma amostra do grupo 4E à esquerda em cada animal;
- Lote 5 - Implante de uma amostra do grupo 5D à direita e uma amostra do grupo 5E à esquerda em cada animal;

- Lote 6 - Implante de uma amostra do grupo 6D à direita e uma amostra do grupo 6E à esquerda em cada animal;
- Lote 7 - Implante de uma amostra do grupo 7D à direita e uma amostra do grupo 7E à esquerda em cada animal;
- Lote 8 - Implante de uma amostra do grupo 8D à direita e uma amostra do grupo 8E à esquerda em cada animal;
- Lote 9 - Implante de uma amostra do grupo 9D à direita e uma amostra do grupo 9E à esquerda em cada animal;
- Lote 10 - Implante de uma amostra do grupo 10D à direita e uma amostra do grupo 10E à esquerda em cada animal;
- Lote 11 - Implante de uma amostra do grupo 11D à direita e uma amostra do grupo 11E à esquerda em cada animal;

Decorridos quatro meses do implante, os animais foram sacrificados e as amostras explantadas dissecadas, retirando-se o tecido do hospedeiro e lavadas em solução salina de NaCl 0,9%.

Das seis amostras de cada grupo implantadas, cinco foram desidratadas, mineralizadas e dissolvidas em HNO<sub>3</sub>, de acordo com a técnica descrita, e encaminhadas para determinação quantitativa de Ca<sup>2+</sup> e a restante foi preparada para avaliação por microscopia óptica.

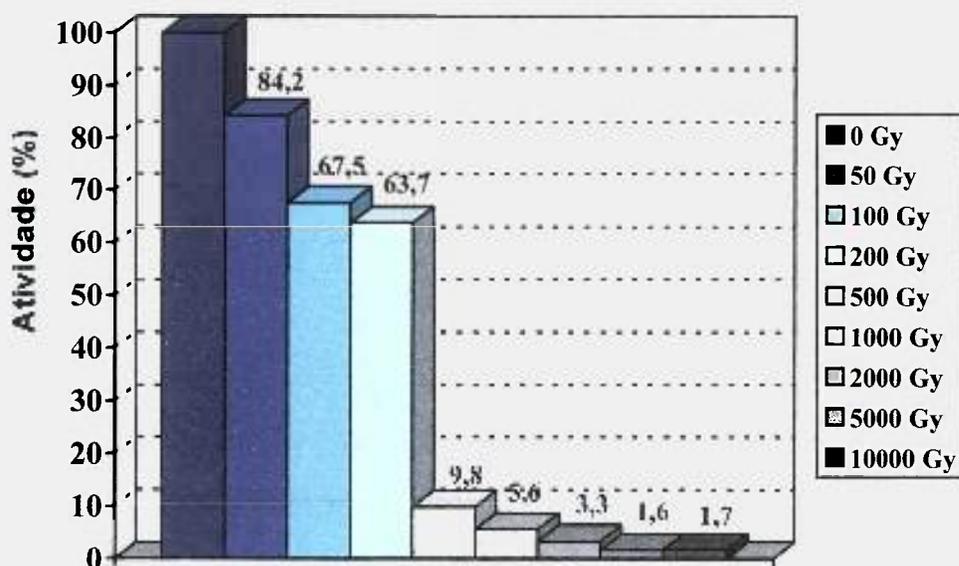
### **3.7 Análise estatística**

Na análise estatística foi empregado o teste *t* de Student. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Radiosensibilidade da enzima fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina em solução aquosa mostrou-se altamente radiosensível. A inibição da atividade enzimática foi crescente com o incremento da dose de radiação gama empregada, obtendo-se uma redução superior a 98% da sua atividade inicial com dose igual ou superior a 5000 Gy (Fig. 9).



**FIGURA 9 – Atividade hidrolítica da enzima fosfatase alcalina frente à várias doses de radiação gama.**

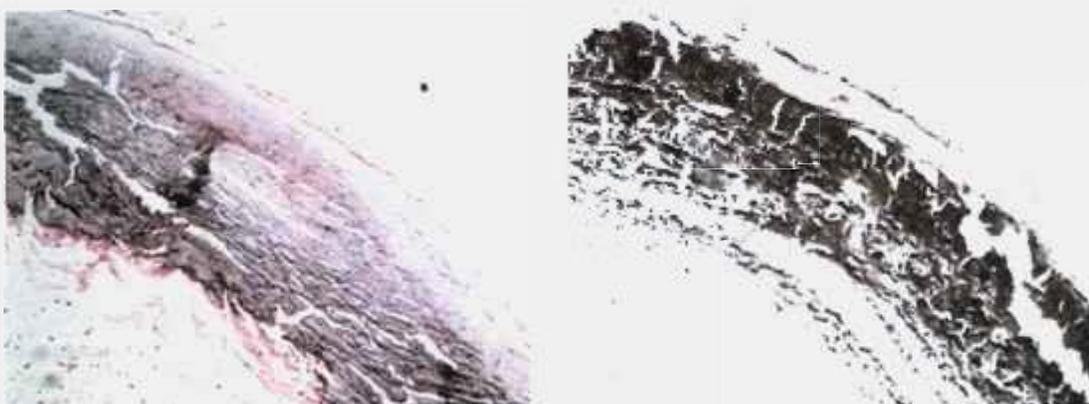
Embora o comportamento enzimático da fosfatase alcalina frente à radiação gama não tenha sido investigado anteriormente, os resultados obtidos eram esperados, visto que a inibição da atividade de outras enzimas com a radiação gama encontra-se descrita na literatura<sup>86</sup>.

### 4.2 Microscopia óptica

A integridade estrutural do colágeno fixado nas amostras pré-implante não foi alterada com os tratamentos anticalcificantes, observando-se a preservação de uma estrutura colágena homogênea.

Nas amostras explantadas a calcificação variou de acordo com o tratamento anticalcificante empregado (Fig. 10). Observou-se desde uma intensa mineralização (por exemplo: 10000 Gy - grupo 5D) a uma ausência de calcificação (por exemplo: éter etílico - grupo 7E). A variabilidade do depósito mineral ocorreu não só entre os diferentes grupos como, em menor escala, entre animais do mesmo grupo e mesmo em regiões diferentes na mesma amostra.

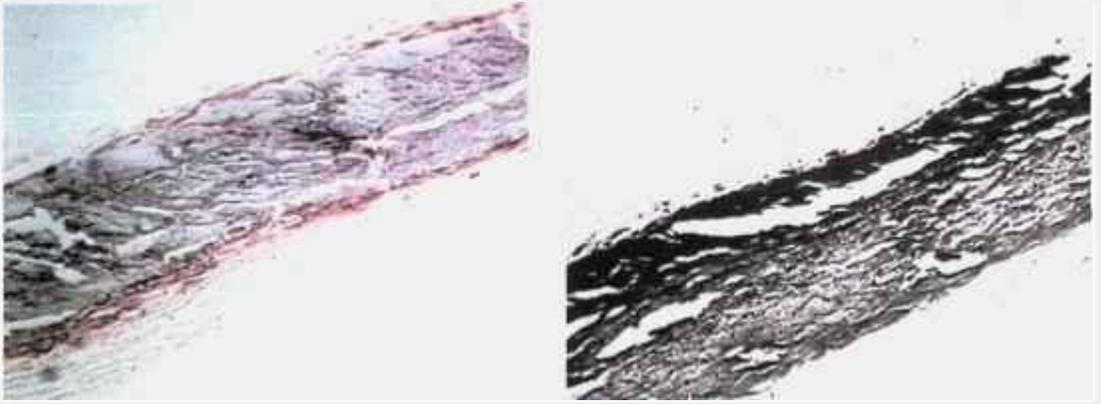
Esta constatação reflete o observado na prática médica, onde uma porcentagem de válvulas cardíacas apresenta intensa calcificação anos após o implante, enquanto outras apresentam calcificações focais e mesmo ausência de depósitos de cálcio identificáveis por microscopia óptica. A análise dos resultados, entretanto, não fica prejudicada por esta variabilidade, pois ela se reflete no desvio padrão da média empregada na análise estatística.



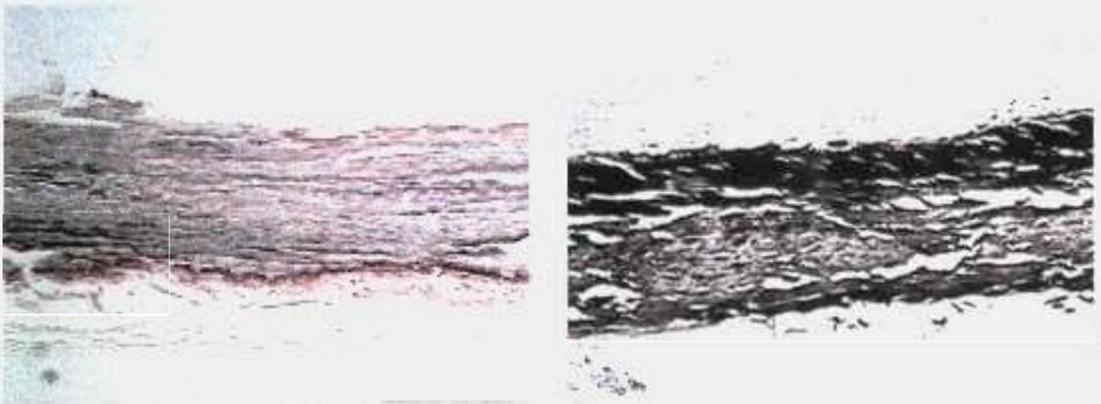
**Controle (grupo 1D)**



**50 Gy (grupo 1E)**



**100 Gy (grupo 2D)**



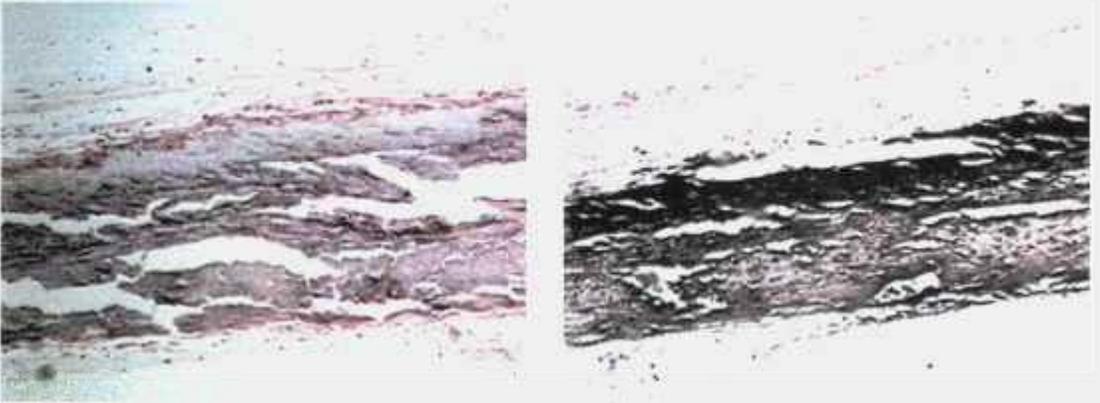
**200 Gy (grupo 2E)**



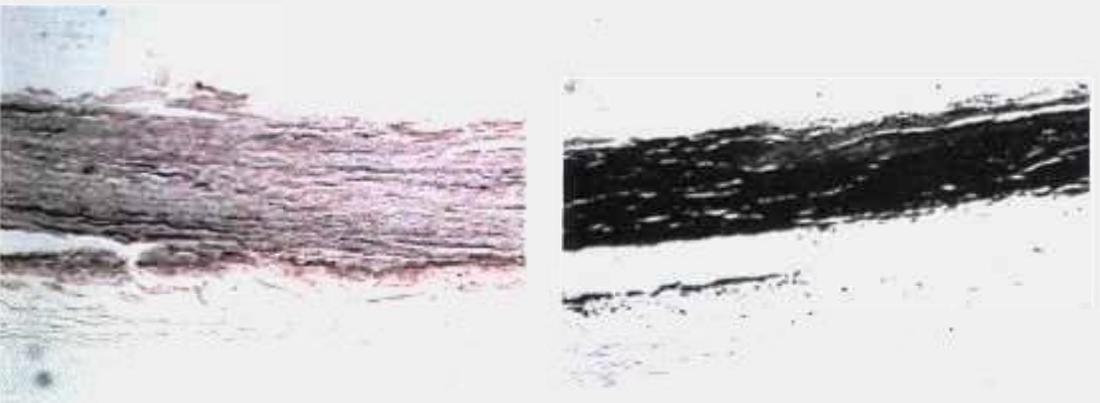
**500 Gy (grupo 3D)**



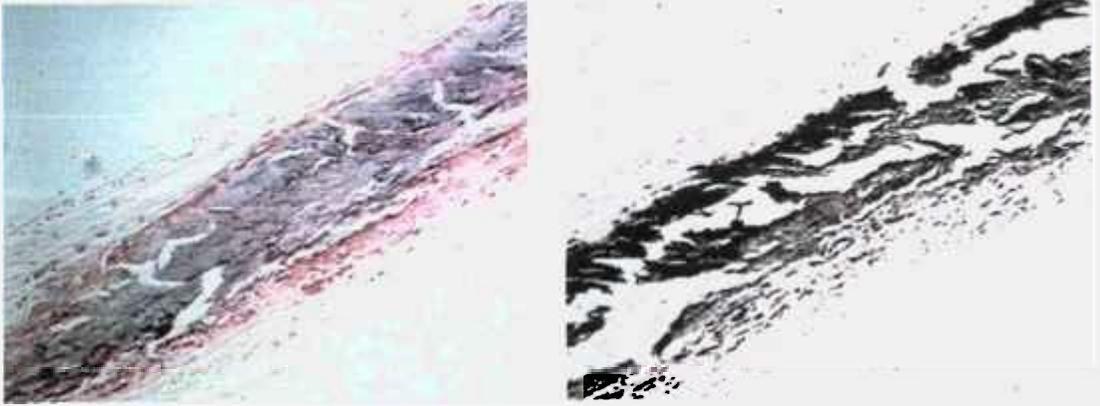
**1000 Gy (grupo 3E)**



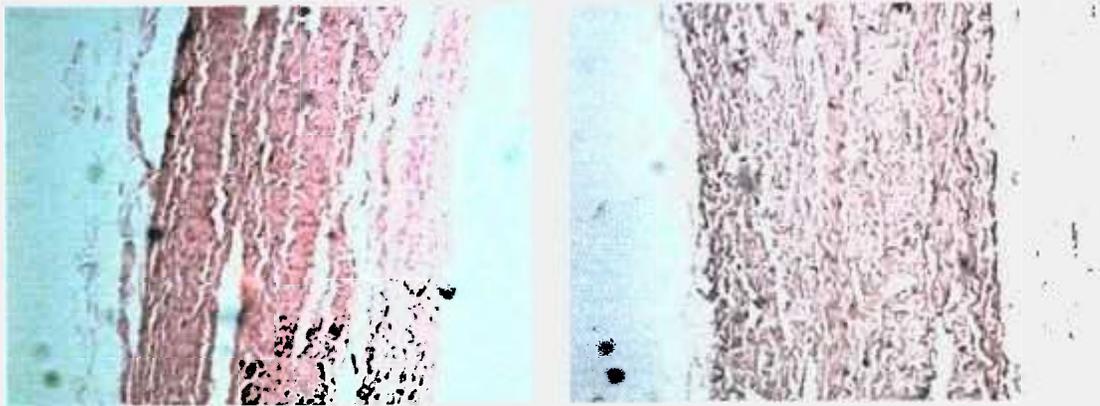
**2000 Gy (grupo 4D)**



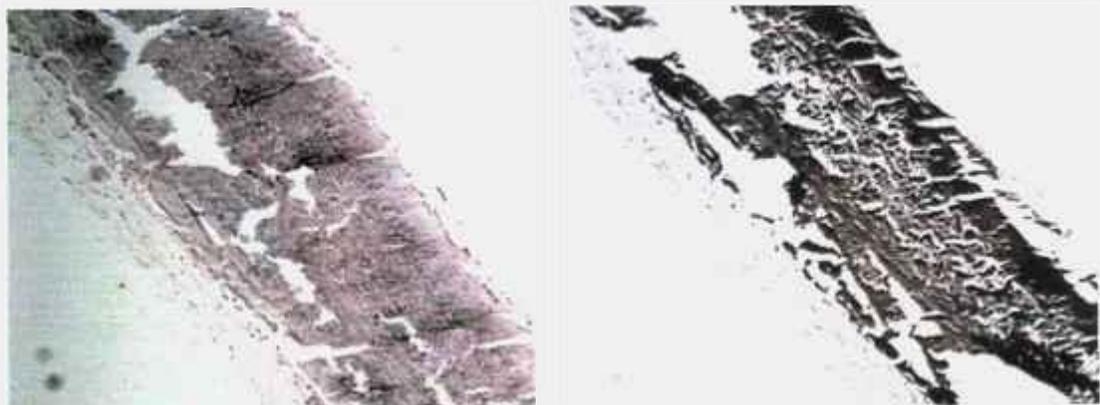
**5000 Gy (grupo 4E)**



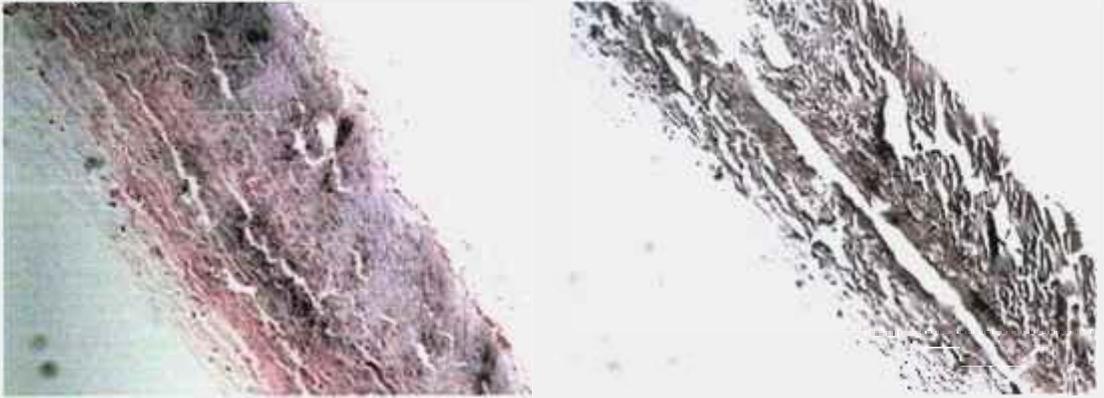
**10000 Gy (grupo 5D)**



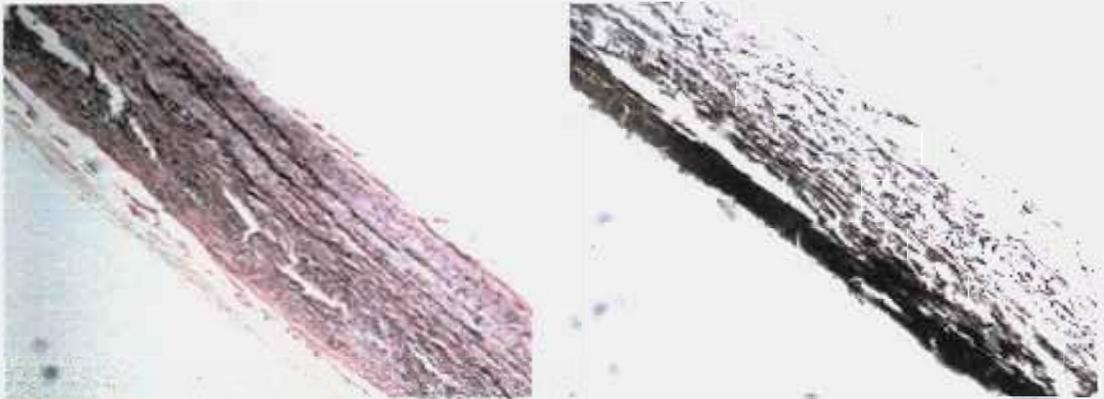
**Temperatura 50°C (grupo 5E)**



**EDTA (grupo 6D)**



**AlCl<sub>3</sub> (grupo 6E)**



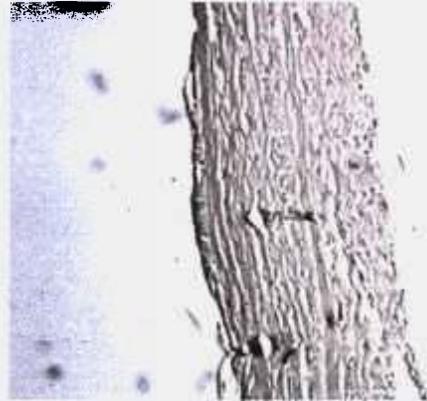
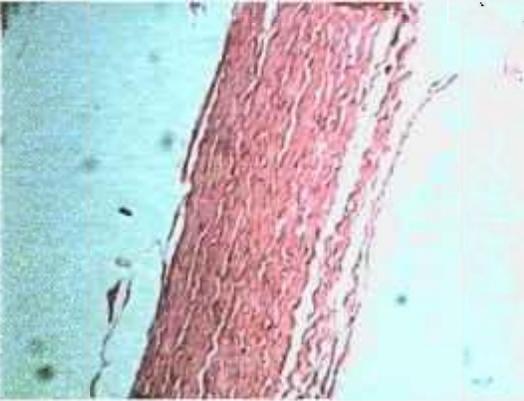
**EDTA + AlCl<sub>3</sub> grupo 7D)**



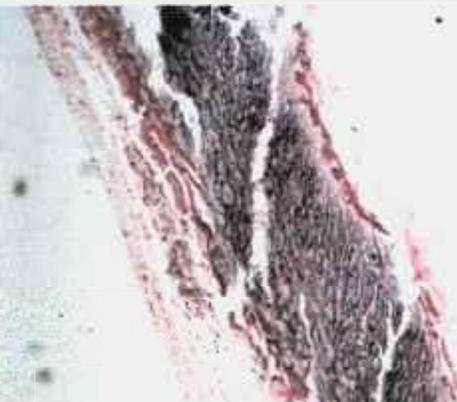
**Éter dietílico (grupo 7E)**



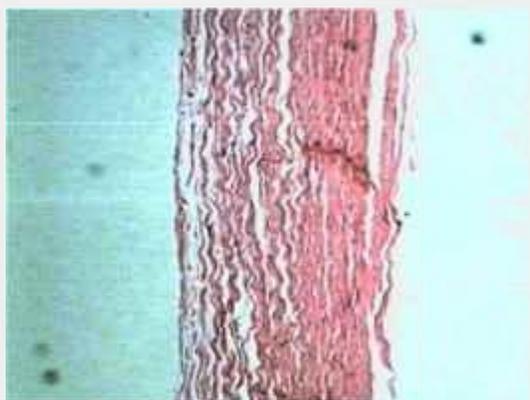
**Quitosana (grupo 8D)**



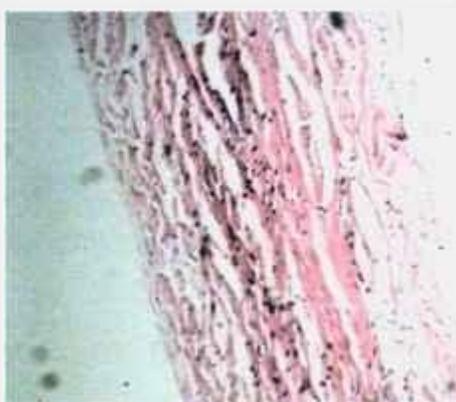
**Quitosana + heparina (grupo 8E)**



**1-6-diaminohexano + heparina (grupo 9D)**



**Etanol (grupo 9E)**



**NaBH<sub>4</sub> (grupo 10D)**

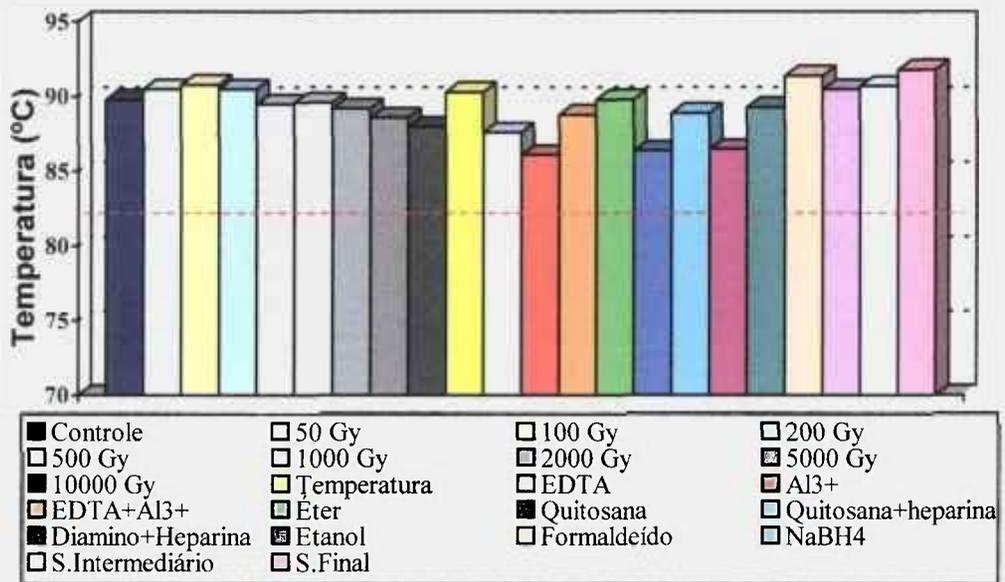


**Formaldeído (grupo 10E)**

**FIGURA 10 –** Micrografias das amostras explantadas de pericárdio bovino obtidas em função dos diversos tratamentos empregados. Colorações: Hematoxilia-eosina à esquerda (regiões com cálcio coram-se em roxo) e Von Kossa à direita (regiões com cálcio coram-se em preto). Aumento 80x.

### 4.3 Teste de encolhimento

Todas as amostras apresentaram valores de temperatura superiores a 82 °C, independente do tratamento empregado, indicando fixação adequada do tecido (Fig. 11).



**FIGURA 11 – Temperatura de encolhimento das amostras obtida em função dos diversos tratamentos empregados.**

### 4.4 Análise mineral

Os resultados quantitativos de  $\text{Ca}^{2+}$  obtidos nas amostras dos diversos grupos, pré e pós-implante, estão sumariados na Tabela 2 e na Figura 12.

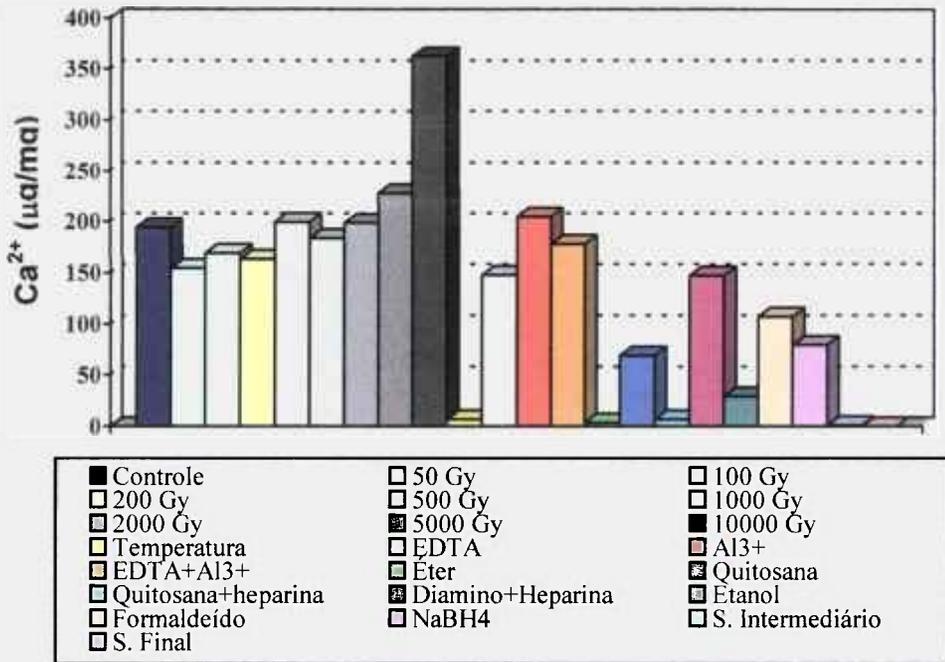
#### 4.4.1 Radiação gama

Apesar da acentuada radiosensibilidade da enzima fosfatase alcalina, com redução na sua atividade inicial superior a 98% na dose de 5000 Gy, não houve uma correspondente redução da calcificação no tecido irradiado, ao contrário, doses mais elevadas de radiação apresentaram os maiores valores de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $362,61 \pm 20,27 \mu\text{g}/\text{mg}$  na dose de 10000 Gy x  $194,45 \pm 19,50 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo controle).

Assim, embora os dados obtidos em uma solução aquosa da enzima pura não possam ser transportados para o tecido fixado, pode-se concluir que a radiação gama não se apresentou como um agente anticalcificante.

**TABELA 2 – Dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  das amostras pré e pós-implante obtida em função dos diversos tratamentos empregados**

TRATAMENTOS	Pré-Implante		Pós-Implante	
	$\text{Ca}^{2+}$ ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$\sigma$ ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$\text{Ca}^{2+}$ ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$\sigma$ ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
Controle	0,66	0,02	194,45	19,50
50 Gy	0,77	0,04	154,64	34,36
100 Gy	0,64	0,04	169,37	30,77
200 Gy	0,75	0,02	163,64	27,55
500 Gy	0,73	0,02	199,89	81,97
1000 Gy	0,95	0,02	184,02	44,10
2000 Gy	0,66	0,03	198,95	49,95
5000 Gy	0,69	0,04	227,95	54,24
10000 Gy	0,78	0,02	362,62	20,27
Temperatura	0,57	0,02	6,87	2,35
EDTA	0,13	0,02	147,77	42,22
$\text{Al}^{3+}$	0,18	0,04	205,12	59,95
EDTA+ $\text{Al}^{3+}$	0,10	0,04	178,24	74,17
Éter	1,11	0,04	3,69	1,26
Quitosana	1,40	0,01	68,89	57,01
Quitosana + heparina	1,89	0,07	6,81	3,17
Diaminohexano + heparina	1,47	0,02	147,41	39,42
Etanol	2,61	0,08	29,12	9,11
Formaldeído	0,68	0,03	107,34	49,88
$\text{NaBH}_4$	0,83	0,04	79,43	52,43



**FIGURA 12 – Dosagem de Ca<sup>2+</sup> das amostras explantadas obtida em função dos diversos tratamentos empregados.**

#### 4.4.2 Temperatura

O tratamento térmico a 50°C foi efetivo na inibição da calcificação das amostras implantadas. A dosagem de Ca<sup>2+</sup> foi de  $6,87 \pm 2,35 \mu\text{g/mg}$  x  $194,45 \pm 19,50 \mu\text{g/mg}$  no grupo controle, valor este muito próximo ao observado por Carpentier et al.<sup>71</sup> em amostras submetidas ao tratamento térmico e explantadas após três meses do implante subcutâneo em ratos ( $6,7 \pm 2,3 \mu\text{g/mg}$  x  $245,4 \pm 4 \mu\text{g/mg}$  no grupo controle).

#### 4.4.3 Alumínio

Os resultados obtidos com o emprego do AlCl<sub>3</sub> não reproduziram o efeito anticalcificante relatado na literatura:

Webb et al.<sup>60</sup> empregaram uma solução 0,1M de AlCl<sub>3</sub> por 24 horas a 25 °C no pericárdio bovino tratado inicialmente com glutaraldeído 0,6% por 24 horas e seqüencialmente com glutaraldeído 0,2%, tamponados com HEPES 0,05M (pH 7,4), implantado subcutaneamente em ratos por 21 dias, obtendo níveis de Ca<sup>2+</sup> de  $3,77 \pm 0,51 \mu\text{g/mg}$  x  $44,24 \pm 14,7 \mu\text{g/mg}$  no grupo controle.

O mesmo autor, em estudo posterior<sup>61</sup>, avaliou a calcificação após 60 dias do implante subcutâneo em ratos, obtendo níveis de Ca<sup>2+</sup> de  $5,1 \pm 0,9 \mu\text{g/mg}$

x  $110 \pm 9,3 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo controle.

A eficácia em longo prazo na inibição da calcificação pelo  $\text{AlCl}_3$  também foi estudada por Webb et al. <sup>61</sup> em implantes subcutâneos em ratos por 120 dias obtendo níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $21,8 \pm 12,6 \mu\text{g}/\text{mg}$  contra  $329,0 \pm 20,3 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo controle.

Hirsch et al. <sup>32</sup> empregaram uma solução 0,1M de  $\text{AlCl}_3$  por 24 horas a  $25^\circ\text{C}$  no pericárdio bovino tratado inicialmente com glutaraldeído 0,6% por 24 horas e seqüencialmente com glutaraldeído 0,2%, tamponados com HEPES 0,05M (pH 7,4), implantado subcutaneamente em ratos por 21 dias, obtendo níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $9,3 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$  contra  $90,0 \pm 5,9 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo controle.

A dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  obtida nas amostras implantadas, nesta investigação, foi semelhante à do grupo controle ( $205,12 \pm 59,95 \mu\text{g}/\text{mg}$  x  $194,45 \pm 19,50 \mu\text{g}/\text{mg}$ , respectivamente).

No intuito de aumentar a incorporação do  $\text{Al}^{3+}$  foi empregado o EDTA, um agente quelante reconhecidamente efetivo no seqüestro de metais pesados e particularmente do  $\text{Ca}^{2+}$ . Embora tenha sido observada redução nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  com o uso do EDTA +  $\text{AlCl}_3$ , nas amostras pré-implante ( $0,10 \mu\text{g}/\text{mg}$  x  $0,04 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), não houve redução significativa no conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas amostras implantadas ( $178,24 \pm 74,17 \mu\text{g}/\text{mg}$  x  $194,45 \pm 19,50 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo controle).

Assim, a inibição da atividade da fosfatase alcalina intrínseca pelos ions  $\text{Al}^{3+}$ , não se mostrou suficiente para a inibição do processo de calcificação pós-implante, sugerindo que o sucesso na eliminação de sua atividade deve ser seguido da inibição ou prevenção do reacúmulo da fosfatase alcalina extrínseca absorvida, originária do plasma ou do processo inflamatório do hospedeiro.

#### 4.4.4 Éter dietílico

O tratamento com éter etílico foi efetivo na inibição da calcificação das amostras implantadas. A dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  foi de  $3,69 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 1,26 \mu\text{g}/\text{mg}$  x  $194,45 \pm 19,50 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo controle.

Rossi et al. <sup>36</sup> estudaram os efeitos do éter sulfúrico acidificado na calcificação do pericárdio bovino, tratado inicialmente com glutaraldeído 2,5% por duas horas e seqüencialmente com glutaraldeído 0,5%, tamponado com fosfato 0,13M (pH 7,4), após implante subcutâneo em ratos por até 28 dias. Houve uma

atenuação significativa da calcificação, por microscopia óptica, nas amostras tratadas com éter sulfúrico. O depósito de cálcio após 28 dias do implante foi semelhante ao observado no grupo controle após sete dias do implante.

Os resultados observados por microscopia óptica na presente investigação foram superiores aos obtidos por Rossi et. al.<sup>36</sup>, com ausência de depósitos de cálcio após quatro meses do implante. Como a metodologia empregada no tratamento com o éter foi similar nos dois estudos, o único fator que poderia explicar essa diferença no comportamento anticalcificante seria o emprego inicial de uma solução de glutaraldeído 2,5% na fixação do tecido por aqueles autores.

#### 4.4.5 Etanol

As amostras tratadas com etanol apresentaram redução na calcificação pós-implante. A dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  foi de  $29,12 \pm 9,11 \mu\text{g}/\text{mg}$ , porém inferior a obtida com o emprego do éter dietílico ( $3,69 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 1,26 \mu\text{g}/\text{mg}$ ).

Os primeiros relatos na literatura sobre o emprego do álcool como agente anticalcificante dão conta de sua aplicação em válvulas aórticas porcinas:

Jorge-Herrero et al.<sup>88</sup> empregaram uma mistura de 1:5 (v/v) de clorofórmio-metanol em válvulas aórticas porcinas tratadas com glutaraldeído 0,625% por 24 horas e implantadas subcutaneamente em ratos por até 60 dias. A dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  obtida foi de  $1,4 \pm 2,7 \mu\text{g}/\text{mg}$  nas amostras tratadas com clorofórmio-metanol x  $108,06 \pm 55,41 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo controle.

Nimni, M. E.<sup>89</sup> estudaram os efeitos anticalcificantes do etanol 70% por trinta minutos em válvulas aórticas porcinas fixadas com glutaraldeído 0,2% em soro bovino fetal a 4 °C por duas semanas, implantadas subcutaneamente em ratos por seis semanas. O grupo tratado com etanol 70% apresentou redução de aproximadamente 90% da dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  no grupo controle.

Vyavahare et al.<sup>45</sup> empregaram concentrações de 20, 40, 60 e 80% de etanol em válvulas aórticas porcinas tratadas com glutaraldeído 0,6% por 24 horas e posteriormente com glutaraldeído 0,2% durante um mês à temperatura ambiente. O tratamento com etanol 80% revelou-se o mais efetivo na inibição da calcificação em implante subcutâneo em ratos por até 60 dias. A dosagem de

$\text{Ca}^{2+}$  foi de  $1,87 \pm 0,29 \mu\text{g}/\text{mg}$ , comparável às amostras pré-implante, enquanto o grupo controle apresentou dosagem de  $236,00 \pm 6,10 \mu\text{g}/\text{mg}$ .

A demonstração de que o tratamento com etanol era igualmente efetivo na prevenção da calcificação do pericárdio bovino foi realizada posteriormente, também por Vyavahare et al. <sup>89</sup>, que obtiveram níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $2,95 \pm 0,78 \mu\text{g}/\text{mg}$  x  $121,16 \pm 7,49 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo controle, e mais recentemente por Pathak et al <sup>91</sup>, que obtiveram níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $0,82 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{mg}$  x  $83 \pm 70 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo controle, ambos os estudos com implantes de 60 dias.

A presente investigação confirmou os efeitos anticalcificantes do etanol no pericárdio bovino tratado com glutaraldeído em um período de implante superior ao estudado por Vyavahare et al. <sup>89</sup> (4 meses x 2 meses, respectivamente).

#### 4.4.6 Quitosana

A dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  obtidos nas amostras tratadas com quitosana foi significativamente menor que a do grupo controle ( $68,89 \pm 57,01 \mu\text{g}/\text{mg}$  x  $194,45 \pm 19,50 \mu\text{g}/\text{mg}$ , respectivamente).

Chanda et al. <sup>31</sup> empregaram a quitosana 4% por três dias a  $4^\circ\text{C}$  no tratamento do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído 0,25% por cerca de dois meses. As dosagens de  $\text{Ca}^{2+}$  obtidas, após implante subcutâneo em ratos por até três meses, foi de  $1,10 \pm 0,27 \text{mg}/\text{g}$  x  $200,8 \pm 17,5 \text{mg}/\text{g}$  no grupo controle.

Em publicação do mesmo grupo, Kuribayashi et al. <sup>33</sup> realizaram o implante de enxerto valvulado aórtico monocúspide porcino tratado com glutaraldeído 0,25%, por cerca de dois meses e quitosana 0,125% por três dias a  $4^\circ\text{C}$ , no sistema circulatório de cães por cinco meses. A dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  obtida foi de  $1,3 \pm 0,29 \text{mg}/\text{g}$  x  $40,6 \pm 24,9 \text{mg}/\text{g}$  nas amostras tratadas apenas com glutaraldeído 0,625%.

A presente investigação, embora tenha confirmado os efeitos anticalcificantes da quitosana relatados anteriormente, ainda constatou níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , após quatro meses do implante, suficientes para a formação dos cristais de hidroxiapatita, identificados por microscopia óptica. Assim, o emprego da quitosana como único agente anticalcificante no pericárdio bovino não se revelou um tratamento adequado para a confecção de válvulas cardíacas.

#### 4.4.7 Heparina

O comportamento anticalcificante da heparina dependeu do substrato de ligação intermediário utilizado. Com o emprego da quitosana a dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  foi de  $6,81 \pm 3,17 \mu\text{g}/\text{mg}$  e com o 1-6-diaminohexano de  $147,31 \pm 39,42 \mu\text{g}/\text{mg}$ .

Essa diferença no comportamento anticalcificante deve-se ao fato que nem todos os compostos aminados reduzem igualmente a calcificação<sup>23</sup>. A menor dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  obtida com o emprego da quitosana, deve-se, provavelmente a uma maior incorporação da heparina no tecido. Cada molécula de quitosana permite a ligação de múltiplas moléculas de heparina, o que aumenta o efeito estérico, enquanto cada molécula de 1-6-diaminohexano permite a ligação de apenas uma molécula de heparina.

Lee et al.<sup>64</sup> avaliaram a calcificação do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído 0,625% em soro bovino fetal por 10 dias a 4 °C com a incorporação da heparina sem o emprego de um substrato intermediário de ligação. A calcificação das amostras com a incorporação da heparina em implantes subcutâneos em ratos por dois meses foi reduzida a aproximadamente 5% da observada no grupo controle.

Chanda et al.<sup>28</sup> utilizaram a heparina no pericárdio porcino tratado com concentrações crescentes de glutaraldeído (0,1 a 0,25%) a 37°C por um mês. O substrato de ligação empregado foi a quitosana 0,1% e a gentamicina 0,015% aplicados ao tecido por uma semana à temperatura ambiente. O período de reação da heparina 0,1% com o tecido foi de uma semana à temperatura ambiente. Os resultados obtidos após o implante subcutâneo em ratos por cinco meses foram de uma redução do conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  no grupo submetido à heparina ( $0,652 \pm 0,240 \text{ mg}/\text{g}$ ) quando comparado ao grupo controle ( $228,32 \pm 37,39 \text{ mg}/\text{g}$ ).

A presente investigação confirmou os efeitos anticalcificantes da heparina quando a quitosana foi empregada como substrato de ligação. Uma constatação importante na análise dos resultados diz respeito a potencialização do efeito anticalcificante exercida pela incorporação da heparina ao pericárdio bovino tratado com a quitosana. Houve redução significativa nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  do

tecido tratado com quitosana com a adição da heparina ( $68,89 \pm 57,01 \mu\text{g}/\text{mg}$  x  $6,81 \pm 3,17 \mu\text{g}/\text{mg}$ , respectivamente).

#### 4.4.8 Formaldeído

A dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  com o uso do formaldeído foi de  $107,34 \pm 49,88 \mu\text{g}/\text{mg}$  x  $194,45 \pm 19,50 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo controle. Esta redução significativa do conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  não era esperada, considerando que a inclusão do formaldeído 4% deveu-se não a investigação de uma possível propriedade anticalcificante, mas ao fato de que as válvulas cardíacas de pericárdio bovino são conservadas nessa solução após a fixação com o glutaraldeído.

Essa conservação em formaldeído 4% não foi devidamente valorizada em estudos anteriores da calcificação pós-implante. Existe, entretanto uma referência no trabalho de Gong et al. <sup>39</sup>, que embora não descrevendo as respectivas dosagens de  $\text{Ca}^{2+}$ , relataram uma menor calcificação com a conservação do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído 0,625% em formaldeído 4% por 24 horas, no implante em ratos por 70 dias. A diferença entretanto não foi estatisticamente significativa.

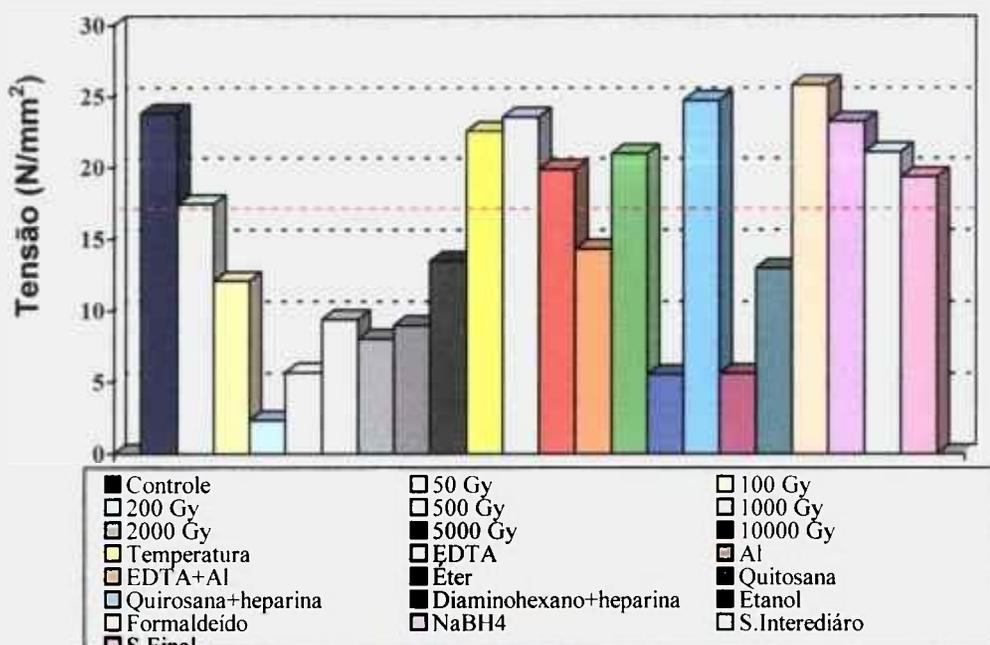
#### 4.4.9 $\text{NaBH}_4$

A dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  com o emprego do  $\text{NaBH}_4$  foi de  $79,43 \pm 52,43 \mu\text{g}/\text{mg}$ , comprovando seu efeito anticalcificante.

Na literatura as referências ao emprego do  $\text{NaBH}_4$  encontram-se associadas à incorporação da heparina ao tecido devido a sua capacidade de converter as instáveis bases de Schiff em aminas secundárias, mais estáveis. O emprego do  $\text{NaBH}_4$  como único agente anticalcificante, embora não investigado anteriormente, justifica-se pela sua propriedade de neutralizar os grupos aldeídos livres na superfície do tecido, através de sua transformação em grupos hidroxilas.

#### 4.5 Comportamento mecânico

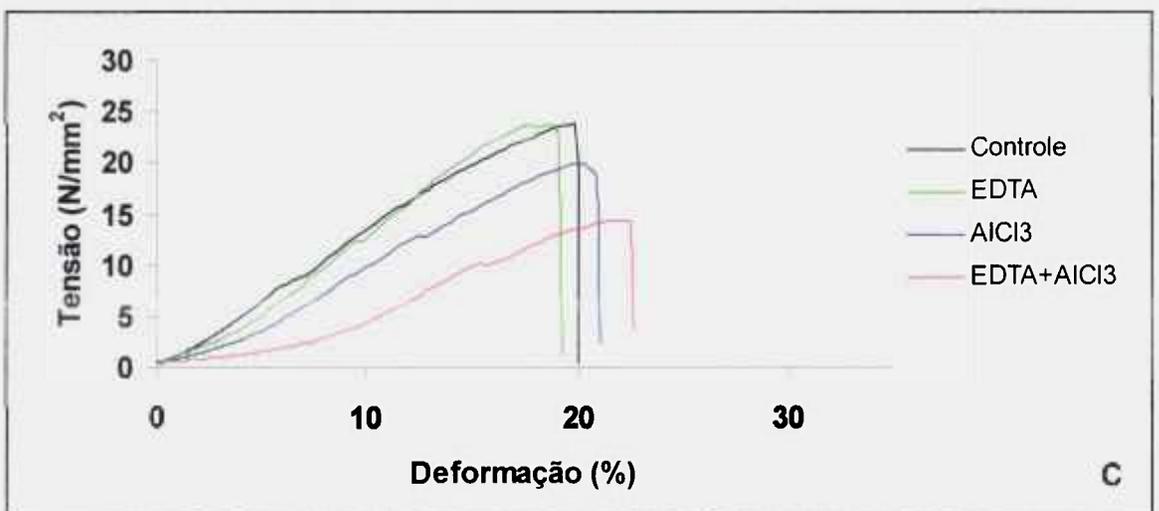
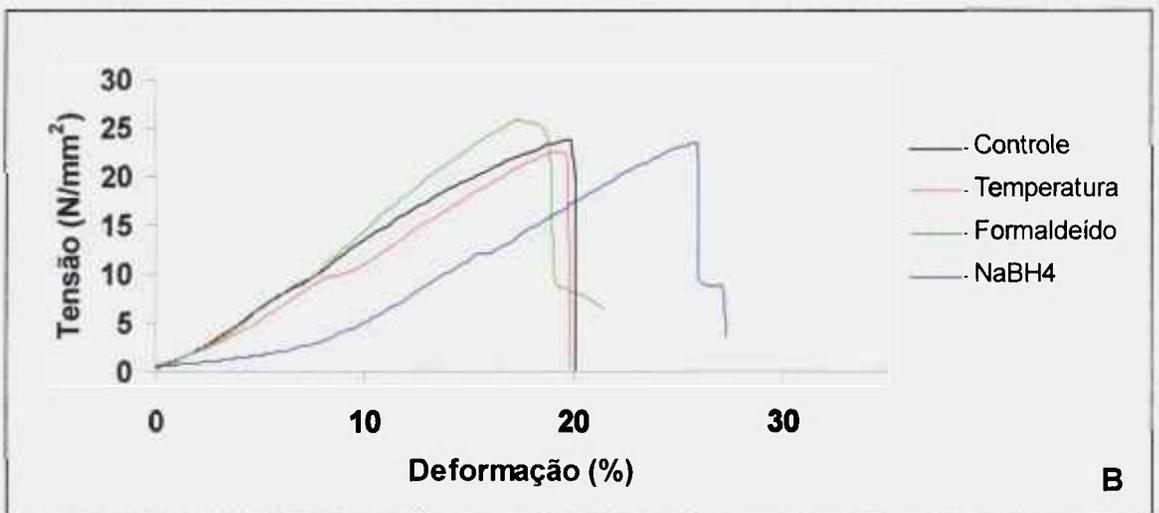
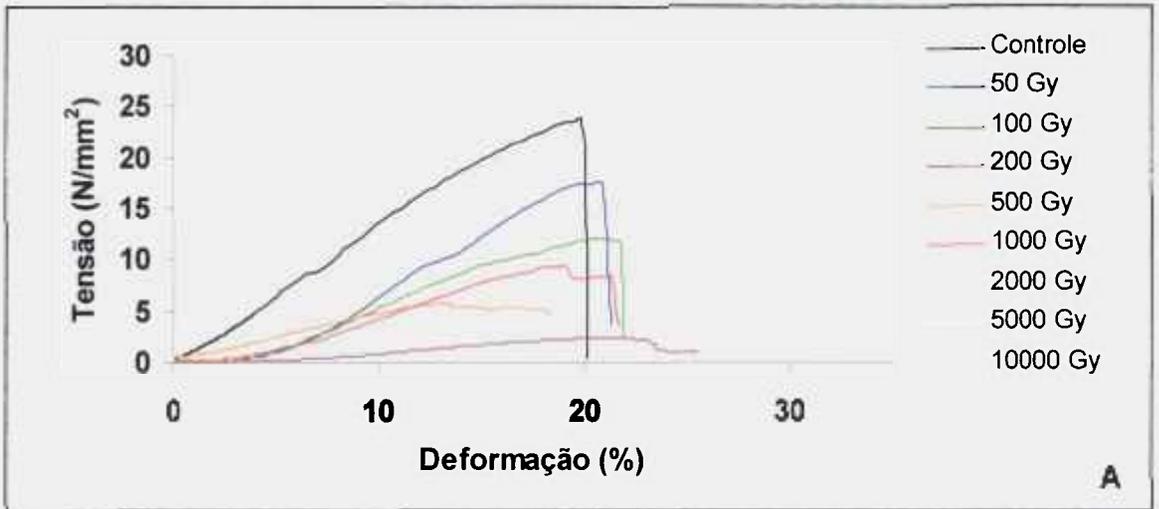
O comportamento mecânico das amostras sob tração (alongamento e tensão máxima) variou de acordo com os tratamentos empregados (Fig. 13 e Tab. 3). As curvas tensão x deformação representativas dos tratamentos anticalcificantes são apresentadas na Figura 14.

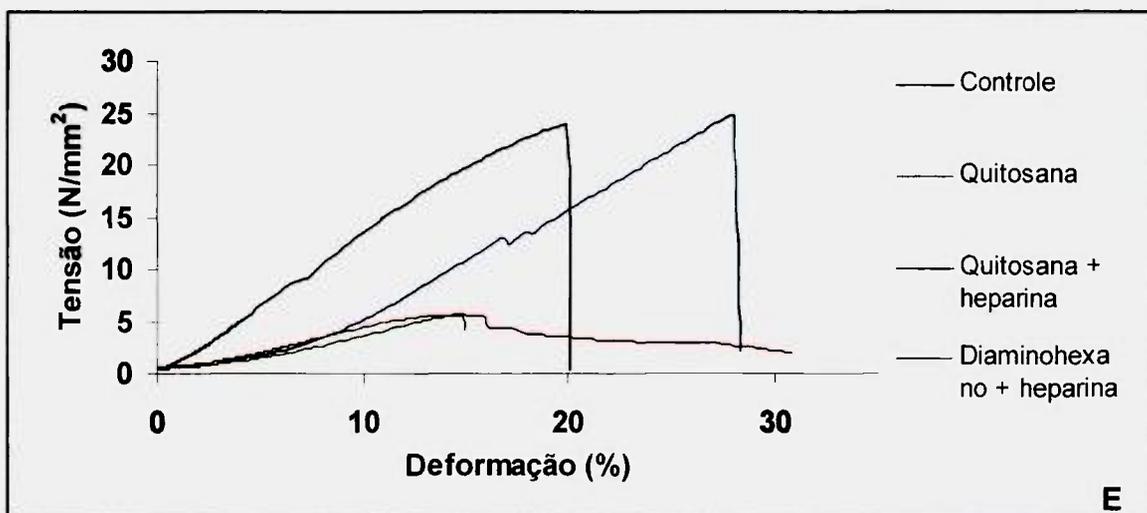
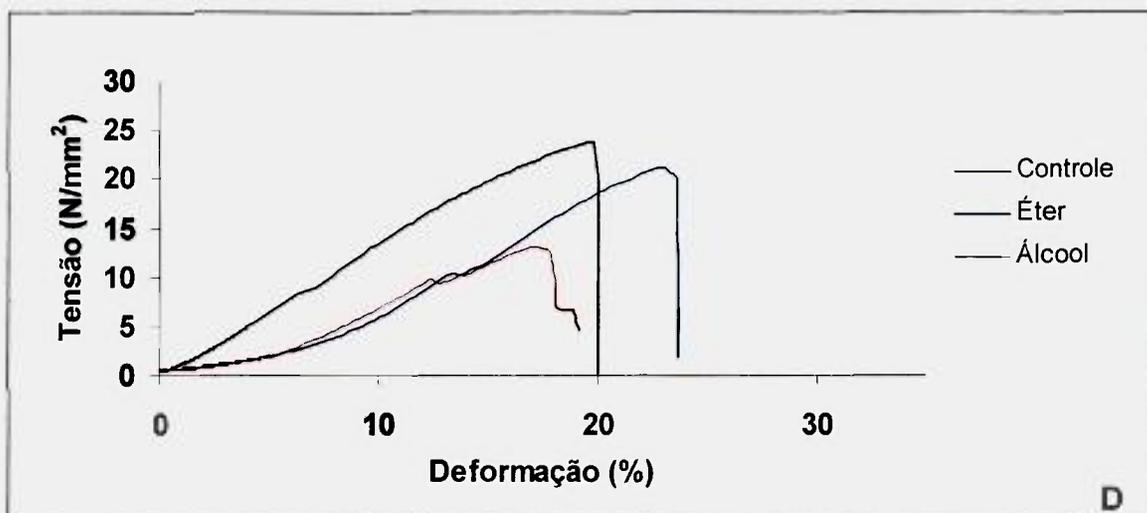


**FIGURA 13 – Tensão máxima obtida em função dos diversos tratamentos empregados.**

**TABELA 3 – Porcentagem de alongamento na tensão máxima obtida em função dos diversos tratamentos empregados.**

TRATAMENTOS	Alongamento (%)	Tensão (N/mm <sup>2</sup> )
Controle	19,8	23,8
50 Gy	20,9	17,4
100 Gy	20,3	12,1
200 Gy	21,9	2,3
500 Gy	13,4	5,7
1000 Gy	18,9	9,4
2000 Gy	27,9	8,0
5000 Gy	15,3	9,0
10000 Gy	21,2	13,5
Temperatura 50°C	19,1	22,6
EDTA	17,8	23,6
AlCl <sub>3</sub>	20,1	19,9
EDTA+AlCl <sub>3</sub>	21,9	14,3
Éter	23,1	21,0
Quitosana	14,5	5,6
Quitosana + heparina	28,0	24,8
1-6-diamino-hexano + heparina	14,5	5,6
Etanol	17,2	13,0
Formaldeído	17,3	25,8
NaBH <sub>4</sub>	25,6	23,3





**FIGURA 14 – Curvas de tensão x deformação obtidas em função dos diversos tratamentos empregados.**

Na análise do comportamento mecânico das amostras submetidas aos diversos tratamentos anticalcificantes deve ser levada em conta a sua finalidade. Quanto maior a alongação e maior a resistência mecânica, mais adequado será o tecido à confecção de válvulas cardíacas.

As amostras submetidas à radiação gama não apresentaram comportamento mecânico adequado. Embora as deformações tenham sido maiores que a observada no grupo controle (Fig. 14A), as resistências mecânicas foram baixas (inferiores a 17,6 N/mm<sup>2</sup>), porém não proporcionais às doses empregadas. Assim, embora alterações anatômicas não tenham sido observadas

por Grant et al.<sup>9</sup> com o emprego de doses elevadas de radiação gama, por microscopia eletrônica, a alteração significativa no comportamento mecânico do tecido no presente estudo, mesmo com o emprego de baixas doses de radiação, indica que alguma alteração, provavelmente em nível molecular, ocorreu no tecido irradiado.

O tratamento térmico não alterou substancialmente o comportamento mecânico do tecido, sendo considerado adequado. A deformação e a resistência mecânica foram similares às observadas no grupo controle (Fig. 14B)

A amostra submetida ao  $AlCl_3$  apresentou comportamento mecânico inadequado. Embora a deformação tenha sido maior que a observada no grupo controle, a resistência mecânica foi inferior ao valor de referência (Fig. 14C).

Este resultado foi similar ao observado por Neethling et al.<sup>80</sup> ao testarem válvulas aórticas porcinas fixadas em glutaraldeído 0,625% e tratadas com  $AlCl_3$  0,02M. Os autores empregaram um sistema hidráulico no qual uma bomba de seringa aplicava uma pressão crescente causando tensão sobre o tecido. Foi obtida uma redução significativa na tensão máxima no tecido tratado com  $AlCl_3$  quando comparado ao grupo controle.

O tratamento com o EDTA não alterou substancialmente o comportamento mecânico do tecido, sendo considerado adequado. A deformação e a resistência mecânica foram similares às observadas no grupo controle (Fig. 14C).

O tratamento prévio do tecido com o EDTA aumentou substancialmente a deformação e diminuiu a resistência mecânica do tecido quando comparada à amostra tratada unicamente com o  $AlCl_3$  (Fig. 14C). Pode-se inferir, portanto, que a elasticidade das amostras tratadas com o  $AlCl_3$  está relacionada à quantidade de  $Al^{3+}$  incorporado ao tecido.

A extração dos fosfolípidios do tecido apresentou diferenças significativas no comportamento mecânico em relação ao agente empregado. A amostra submetida ao éter dietílico apresentou comportamento mecânico adequado, ao contrário da amostra submetida ao etanol. Embora um aumento na deformação tenha ocorrido tanto com o emprego do éter dietílico como com o do etanol, a resistência mecânica foi reduzida muito mais intensamente com o

emprego do etanol do que com o emprego do éter dietílico quando comparada às observadas no grupo controle (Fig. 14D).

A amostra tratada com quitosana apresentou comportamento mecânico inadequado. Observou-se maior deformação quando comparada à do grupo controle, porém a menor resistência mecânica entre todos os tratamentos anticalcificantes (Fig. 14E). Este resultado diferiu dos relatados por Chanda et al.<sup>31</sup> no pericárdio bovino tratado com glutaraldeído 0,25% por cerca de dois meses com o emprego da quitosana 4%, onde diferenças nos valores da tensão máxima não foram observadas ( $231,22 \pm 32,2$  kg/cm<sup>2</sup> no grupo com quitosana e  $222,73 \pm 48,75$  kg/cm<sup>2</sup> no grupo controle).

Os motivos dessa diferença no comportamento mecânico não são facilmente identificáveis. Essa discrepância nos resultados, aqui observada, corrobora a estratégia inicial proposta da investigação de agentes anticalcificantes já descritos na literatura para a obtenção de resultados próprios.

A incorporação de heparina acarretou diferenças significativas no comportamento mecânico do tecido de acordo com o substrato de ligação empregado. Com o emprego da quitosana o comportamento mecânico foi considerado adequado, o mesmo não acontecendo com o emprego do 1-6-diaminohexano.

Na amostra em que a quitosana foi empregada como substrato de ligação observou-se um aumento tanto na deformação como na resistência mecânica quando comparadas às observadas no grupo controle, ao passo que na amostra em que o 1-6-diaminohexano foi empregado houve um aumento da deformação quando comparada à observada no grupo controle e uma das menores resistências mecânicas entre todos os tratamentos anticalcificantes realizados (Fig. 14E).

Resultado semelhante foi relatado por Lee et al.<sup>64</sup> entre o pericárdio bovino com heparina incorporada (tensão máxima de  $1,41 \pm 0,29$  Kgf/mm<sup>2</sup>) e o tratado apenas com glutaraldeído 0,625% (tensão máxima de  $1,11 \pm 0,05$  Kgf/mm<sup>2</sup>).

A incorporação da heparina alterou significativamente o comportamento mecânico do tecido, tornando um tecido totalmente inadequado –

o submetido exclusivamente a quitosana – em um tecido com as melhores propriedades mecânicas aqui avaliadas.

O mesmo comportamento não foi observado com a associação 1-6-diaminohexano + heparina, devido, provavelmente, a baixa incorporação da heparina, visto que cada molécula de 1-6-diaminohexano permite a ligação de apenas uma molécula de heparina, em contraste com a quitosana que permite a ligação de múltiplas moléculas desta substância.

A amostra tratada com o formaldeído foi considerada adequada. Apresentou deformação semelhante à observada no grupo controle, e a maior resistência mecânica entre todos os tratamentos anticalcificantes realizados (Fig. 14B).

Esse comportamento encontra-se concordante com o descrito na literatura:

van Noort et al.<sup>72</sup> estudaram o comportamento mecânico do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído 0,5% por sete dias e relataram que a conservação em formaldeído 4% por 38 dias não acarretou nenhuma diferença no comportamento mecânico das amostras.

Gatti et al.<sup>70</sup> determinaram a tensão máxima no pericárdio bovino tratado com glutaraldeído 0,5% por 48 horas e conservadas em formaldeído 4%. Os valores registrados foram idênticos ao obtido nas amostras conservadas em glutaraldeído ( $12,8 \pm 4,8 \text{ N/mm}^2$ ).

O comportamento mecânico da amostra tratada com o  $\text{NaBH}_4$  foi considerado adequado. O seu emprego como único agente anticalcificante acarretou um aumento na deformação da amostra sem alterar a resistência mecânica, em comparação ao grupo controle (Fig. 14B).

#### **4.6 Seleção dos agentes anticalcificantes empregados nos tratamentos seqüenciais**

A análise comparativa em termos quantitativos das dosagens de  $\text{Ca}^{2+}$  obtidas nos diversos tratamentos permitiu a identificação dos agentes mais efetivos na minimização da calcificação do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído.

Foram selecionados, por este critério, o tratamento térmico a 50 °C, o éter dietílico 70%, a quitosana, a associação quitosana + heparina, o etanol 80% e o NaBH<sub>4</sub>.

A seleção final foi realizada considerando-se o comportamento mecânico das amostras tratadas com esses agentes. Os critérios analisados foram a deformação e a resistência mecânica. Tendo em vista a finalidade a que se destinam – a confecção de válvulas cardíacas – é desejável uma alta deformação e uma resistência mecânica não inferior a 17,6 N/mm<sup>2</sup> (valor considerado adequado para o tecido fixado pelo glutaraldeído <sup>36</sup>). Foram excluídos, por este critério, a quitosana e o etanol 80%.

Assim, os agentes selecionados para os tratamentos seqüenciais foram o tratamento térmico a 50 °C, o éter dietílico 70%, a associação quitosana + heparina e o NaBH<sub>4</sub>.

#### **4.7 Tratamentos Seqüenciais**

Como a calcificação é um processo multifatorial, nos tratamentos seqüenciais foram empregados agentes anticalcificantes com diferentes mecanismos de ação.

Como a incorporação da heparina parece influir positivamente tanto na inibição da calcificação quanto no comportamento mecânico do tecido, optou-se em dividir o tratamento seqüencial em dois grupos, um denominado intermediário e o outro final, com a heparina incorporada, para poder avaliar a sua contribuição no comportamento mecânico do tecido.

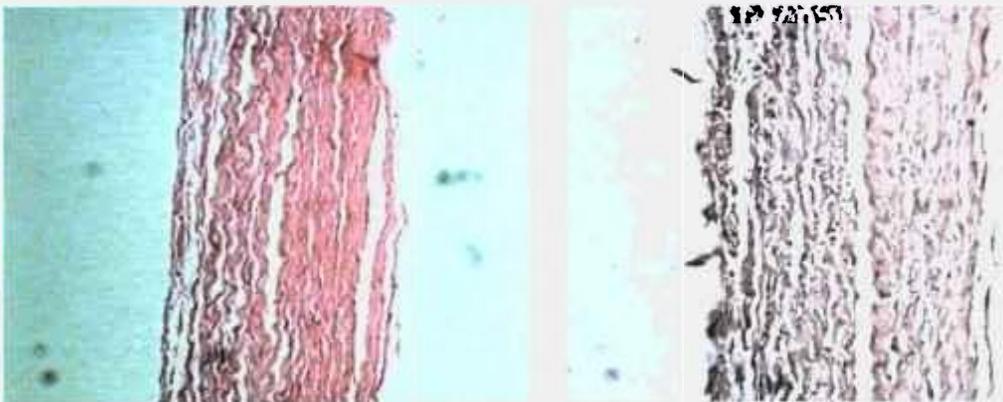
Assim, no tratamento seqüencial intermediário foram empregados o tratamento térmico a 50 °C e o éter dietílico 70%, e no tratamento seqüencial final adicionada a heparina – tendo por substrato intermediário de ligação a quitosana – e o NaBH<sub>4</sub>.

No teste de encolhimento as temperaturas registradas foram de 90,7 °C no tratamento seqüencial intermediário e de 91,8 °C no tratamento seqüencial final, indicando fixação adequada dos tecidos.

Na avaliação microscópica a calcificação não foi observada em nenhum dos tratamentos seqüenciais (Fig. 15).



**Seqüencial intermediário (grupo 11D)**



**Seqüencial final (grupo 11E)**

**FIGURA 15 – Micrografias das amostras explantadas de pericárdio bovino submetidas aos tratamentos seqüenciais.**

**Colorações: Hematoxilia-eosina à esquerda (regiões com cálcio coram-se em roxo) e Von Kossa à direita (regiões com cálcio coram-se em preto). Aumento 80x.**

As dosagens de  $\text{Ca}^{2+}$  pós-implante em ambos os grupos confirmaram o efeito sinérgico dos agentes anticalcificantes ( $0,96 \pm 0,39 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo intermediário e  $0,17 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo final x  $194,45 \pm 19,50 \mu\text{g}/\text{mg}$  no grupo controle) (Tab. 4 ).

O comportamento mecânico das amostras submetidas aos tratamentos seqüenciais foi considerado adequado (Tab. 5). As amostras de ambos os tratamentos apresentaram maior deformação do que à observada no grupo controle e resistência mecânica superior a  $17,6 \text{ N}/\text{mm}^2$ .

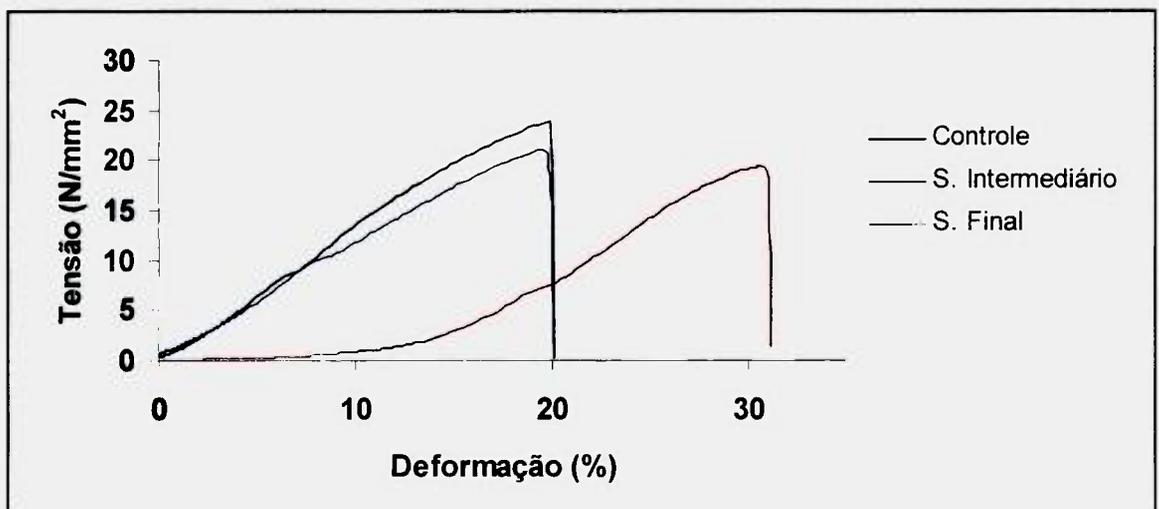
**TABELA 4 – Dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  das amostras pré e pós-implante obtida nos tratamentos seqüenciais.**

TRATAMENTOS	Pré-Implante		Pós-Implante	
	$\text{Ca}^{2+}$ ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$\sigma$ ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$\text{Ca}^{2+}$ ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$\sigma$ ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
Seqüencial intermediário	0,63	0,04	0,96	0,39
Seqüencial final	0,62	0,06	0,17	0,04

**TABELA 5 – Porcentagem de alongamento na tensão máxima obtida nos tratamentos seqüenciais.**

TRATAMENTOS	Alongamento (%)	Tensão ( $\text{N}/\text{mm}^2$ )
Seqüencial Intermediário	19,4	21,1
Seqüencial Final	30,4	19,4

No tratamento seqüencial final, com a incorporação da heparina, a deformação foi significativamente maior que à observada no tratamento seqüencial intermediário (Fig. 16).



**FIGURA 16 – Curvas de tensão x deformação obtidas nos tratamentos seqüenciais.**

## 5 CONCLUSÕES

O sinergismo almejado com o tratamento seqüencial proposto (tratamento térmico a 50 °C, éter dietílico 70%, heparina – tendo por substrato intermediário de ligação a quitosana – e NaBH<sub>4</sub>) realmente ocorreu.

Os tratamentos seqüenciais, tanto no grupo intermediário como no grupo final, foram efetivos em inibir a calcificação do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, após quatro meses do implante subcutâneo em ratos, e as amostras apresentaram um comportamento mecânico adequado para a confecção de válvulas cardíacas.

No tratamento seqüencial final, com a incorporação da heparina ao tecido, ocorreu um incremento de aproximadamente 50% na deformação até a ruptura em relação ao tratamento seqüencial intermediário, que por sua vez foi pouco maior que a observada no grupo controle.

Em relação ao emprego da radiação gama comprovou-se que:

- a enzima fosfatase alcalina, em solução aquosa, é altamente radiosensível, com inibição acima de 98% de sua atividade hidrolítica inicial com o emprego de doses de radiação gama igual ou superiores a 5000 Gy;
- a radiação gama alterou o comportamento mecânico das amostras, independentemente da dose empregada, o que indica que alguma alteração, provavelmente em nível molecular, ocorreu no tecido irradiado.
- a radiação gama não se apresentou como um agente anticalcificante, ao contrário, as prováveis alterações inflingidas ao tecido redundaram em uma calcificação mais intensa do que a observada no grupo controle, com o emprego de doses mais elevadas (acima de 2000 Gy).

Outras conclusões podem ser depreendidas a partir da metodologia empregada:

1. Em relação ao tratamento das amostras.

- A fixação de todas as amostras submetidas aos tratamentos anticalcificantes foi adequada de acordo com a determinação da temperatura de desnaturação do colágeno.
  - Os tratamentos propostos não alteraram a integridade estrutural do colágeno de acordo com a análise microscópica.
2. Em relação à determinação quantitativa do  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Vários agentes anticalcificantes foram efetivos em reduzir os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no tecido implantado, destacando-se entre eles o tratamento térmico, o éter dietílico e a associação quitosana + heparina.
  - Embora descrito por outros autores como um agente anticalcificante, o  $\text{AlCl}_3$  não reduziu a calcificação no presente estudo.
3. Em relação ao comportamento mecânico das amostras.
- Houve alterações importantes no comportamento mecânico do tecido de acordo com o tratamento anticalcificante empregado. De modo geral houve um aumento na deformação em relação ao grupo controle com a maioria dos tratamentos. As exceções foram os tratamentos com o EDTA e com o formaldeído, em que as deformações foram similares à observada no grupo controle.
  - Não houve correlação entre fixação adequada e manutenção da integridade estrutural do colágeno com o comportamento mecânico das amostras, indicando que tanto o estudo histológico como a determinação da temperatura de desnaturação do colágeno são métodos insuficientes para a caracterização do pericárdio bovino submetido a tratamentos anticalcificantes.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Continuidade deste estudo com implantes no sistema circulatório de animais.

O implante subcutâneo em ratos tem se mostrado útil no estudo do problema da calcificação devido aos achados patológicos da mineralização serem comparáveis ao observado em válvulas cardíacas calcificadas, entretanto o transporte dos resultados obtidos em animais de experimentação para o homem deve ser feito com cautela, pois eles refletem a calcificação somente do ponto de vista do estresse estático e não do estresse dinâmico da circulação sangüínea.

Assim, antes do seu emprego em seres humanos, válvulas cardíacas confeccionadas com os tecidos modificados devem ser validadas por implantes no sistema circulatório de animais. O protocolo aceito para esta validação é o do implante na posição mitral em ovelhas jovens.

- Estudo da performance hidrodinâmica de válvulas cardíacas confeccionadas com o pericárdio bovino tratado seqüencialmente.

O comportamento hidrodinâmico das válvulas cardíacas pode ser avaliado em simuladores de fluxo pulsáteis. Variando-se a freqüência da pulsação e o volume de ejeção, válvulas de diversos diâmetros podem ser testadas para determinação da área valvar efetiva, do gradiente de pressão transvalvar e do volume regurgitante.

- Teste de fadiga em válvulas cardíacas confeccionadas com o pericárdio bovino tratado seqüencialmente.

Este teste visa avaliar a durabilidade *in vitro* da válvula cardíaca. O sistema de teste de fadiga acelerado submete a válvula a um número de ciclos de abertura e fechamento muitas vezes superior ao que ocorre *in vivo*. Deste modo pode-se fazer inferências sobre a sua durabilidade em um tempo relativamente curto.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. JORGE-HERRERO, E.; FERNANDEZ, P.; GUTIERREZ, M.; CASTIL, L. Study of the calcification of bovine pericardium: Analysis of implication of lipids and proteinoglycans. **Biomaterials**, v. 12, n. 7, p. 683-689, 1991.
2. KHOR, E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. **Biomaterials**, v. 18, n. 2, p. 95-105, 1997.
3. CHEUNG, D.T.; NIMNI, M. E. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen. **Connect. Tissue Res.**, v. 10, n. 2, p. 201-216, 1982.
4. CHEUNG, D. T.; PERELMAN, N.; KO, E. C.; NIMNI, M. E. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissues. **Connect. Tissue Res.**, v. 13, n. 2, p. 109-115, 1985.
5. CHEUNG, D. T.; NIMNI, M. E. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde I: Reaction with model compounds. **Connect. Tissue Res.**, v. 10, n. 2, p. 187-99, 1982.
6. GOLOMB, G.; SCHOEN, F. J.; SMITH, M. S.; LINDEN, J.; DIXON, M. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprosthesis. **Am. J. Pathol.**, v. 127, n. 1, p. 122-130, 1987.
7. CHEUNG, D.T.; TONG, D.; PERELMAN, N.; ERTL, D.; NIMNI, M. E. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde IV. *In vitro* and *in vivo* stability of a crosslinked collagen matrix. **Connect. Tissue Res.**, v. 25, n. 1, p. 27-34, 1990.
8. PEREIRA, C. A.; LEE, J. M.; HABERER, S. A. Effect of alternative crosslinking methods on the low strain rate viscoelastic properties of bovine pericardial bioprosthetic material. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 24, p. 345-361, 1990.
9. GRANT, R. A.; COX, R. W.; KENT, C. M. The effects of gamma radiation on the structure and reactivity of native and cross-linked collagen fibers. **J. Anat.**, v. 115, n. 1, p. 29-43, 1973.
10. LEE, J. M.; PEREIRA, C. A.; KAN, W. K. Effect of molecular structure of poly(glycidyl)ether reagents on crosslinking and mechanical properties of bovine pericardial xenograft materials. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 28, n. 9, p. 981-992, 1994.

11. MOORE, M. A.; BOHACHEVSKY, I. K.; CHEUNG, D. T.; BOYAN, B. D.; CHEN, W. M.; BICKERS, R. R.; MCILROY, B. K. Stabilization of pericardial tissue by dye-mediated photooxidation. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 28, n. 5, p. 611-618, 1994.
12. XI, T.; MA, J.; TIAN, W.; LEI, X.; LONG, S.; XI, B. Prevention of tissue calcification on bioprosthetic heart valve by using epoxy compounds: a study of calcification tests *in vitro* and *in vivo*. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 26, n. 9, p. 1241-1251, 1992.
13. CARPENTIER, A. From valvular xenografts to valvular bioprosthesis (1965 – 1977). **Med. Instrum.**, v. 11, p. 98-101, 1977.
14. GOISSIS, G.; YOSHIOKA, S. A.; BRAILE, D. M.; RAMIREZ, V. D. The chemical protecting group concept applied in crosslinking of natural tissues with glutaraldehyde acetals. **Artif. Organs**, v. 22, n. 3, p. 210-214, 1998.
15. NIMNI, M. E.; CHEUNG, D.; STRATES, B.; KODAMA, M.; SHEIKH, K. Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 21, n. 6, p. 741-771, 1987.
16. BERNACCA, G. M.; DIMITRI, W. R.; FISHER, A. C.; MACKAY, T. G. Chemical modification of bovine pericardium and its effect on calcification in the rat subdermal model. **Biomaterials**, v. 13, n. 6, p. 345-352, 1992.
17. GENDLER, E.; GENDLER, S.; NIMNI, M. E. Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 18, n. 7, p. 727-736, 1984.
18. SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Bioprosthetic heart valve failure: Pathology and pathogenesis. **Cardiol. Clin.**, v. 2, p. 717-39, 1984.
19. SANDERS, S. P.; LEVY, R. J.; FREED, M. D.; NORWOOD, W. I.; CASTANHEDA, A. R. Use of Hancock bioprosthetic cardiac valve. **Eur. Heart J.**, v. 5, p. 81-5, 1984. Supplement D
20. SCHOEN, F. J.; HARASAKI, H.; KIM, KM; ANDERSON, H. C.; LEVY, R. J. Biomaterial-associated calcification: pathology, mechanisms, and strategies for prevention. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 22, n. 1, p. 11-36, 1988. Supplement A
21. SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Heart valve bioprostheses: antiminerallization. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.**, v. 6, p. S91-93, 1992. Supplement 1

22. SCHOEN, F. J.; TSAO, J. W.; LEVY, R. J. Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization. **Am. J. Pathol.**, v. 123, n. 1, p. 134-145, 1986.
23. CHANDA, J. Posttreatment with amino compounds effective in prevention of calcification of glutaraldehyde treated pericardium. **Artif. Organs**, v. 18, n. 5, p. 408-410, 1994.
24. VYAVAHARE, N.; OGLE, M.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Elastin calcification and its prevention with aluminum chloride pretreatment. **Am. J. Pathol.**, v. 155, n. 3, p. 973-982, 1999.
25. CARPENTIER, S. M.; SHEN, M.; CHEN, L.; CUNANAN, C. M.; MARTINET, B.; CARPENTIER, A. Biochemical properties of heat-treated valvular bioprostheses. **Ann Thorac. Surg.**, v. 71, n. 5 (Suppl), p. 410-412, 2001.
26. CARPENTIER, S. M.; CARPENTIER, A. F.; CHEN, L.; SHEN, M.; QUINTERO, L. J.; WITZEL, T. H. Calcium mitigation in bioprosthetic tissues by iron pretreatment: The challenge of iron leaching. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 60, n. 2, p. S332-338, 1995. Supplement 2
27. CHANDA, J. Prevention of calcification of heart valve bioprostheses: An experimental study in rat. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 60, p. S339-42, 1995. Supplement 2.
28. CHANDA, J.; KURIBAYASHI, R.; ABE, T. Heparin in calcification prevention of porcine pericardial bioprostheses. **Biomaterials**, v. 18, n. 16, p. 1109-1113, 1997.
29. CHANDA, J.; KURIBAYASHI, R.; ABE, T. Prevention of calcification in glutaraldehyde-treated porcine aortic and pulmonary valves. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 64, n. 4, p. 1063-1066, 1997.
30. CHANDA, J.; KURIBAYASHI, R.; ABE, T. Role of lipid in calcification of porcine pulmonary and aortic valves. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 115, n. 1, p. 259-261, 1998.
31. CHANDA, J.; RAO, S. B.; MOHANTY, M.; LAL, A. V.; MURALEEDHARAN, C. V.; BHUVANESHWAR, G. S.; VALIATHAN, M. S. Prevention of calcification of tissue valves. **Artif. Organs**, v. 18, n. 10, p. 752-757, 1994.

32. HIRSCH, D.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Effects of metallic ions and diphosphonates on inhibition of pericardial bioprosthetic tissue calcification and associated alkaline phosphatase activity. **Biomaterials**, v. 14, n. 5, p. 371-377, 1993.
33. KURIBAYASHI, R.; CHANDA, J.; ABE, T. Efficacy of the Chitosan posttreatment in calcification prevention of the glutaraldehyde-treated porcine aortic noncoronary cusp implanted in the right ventricular outflow tract in dogs. **Artif. Organs**, v. 20, n. 7, p. 761-766, 1996.
34. 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  $AlCl_3$  or  $FeCl_3$  preincubations. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 25, n. 8, p. 905-935, 1991.
35. NIMNI, M. E.; ERTL, D.; VILLANUEVA, J.; NIMNI, B. S. Inhibition of ectopic calcification of glutaraldehyde crosslinked collagen and collagenous tissues by a covalently bound diphosphonate (APD). **Am. J. Cardiovasc. Pathol.**, v. 3, n. 3, p. 237-245, 1990.
36. ROSSI, M. A.; BRAILE, D. M.; TEIXEIRA, M. D.; SOUZA, D. R.; PERE, S. Lipid extraction attenuates the calcific degeneration of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. **J. Exp. Pathol. (Oxford)**, v. 71, n. 2, p. 187-196, 1990.
37. TINGFEI, X.; JIAZHEN, M.; WENHUA, T.; XUEHUI, L.; SHUHUI, L.; BAOSHU, X. Prevention of tissue calcification on bioprosthetic heart valve by using epoxy compounds: A study of calcification tests *in vitro* and *in vivo*. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 26, n. 9, p. 1241-1251, 1992.
38. WEBB, C. L.; SCHOEN, F. J.; FLOWERS, W. E.; ALFREY, A. C.; HORTO, N. 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, n. 4, p. 971-981, 1991.
39. GONG, G.; LING, Z.; SEIFTER, E.; FACTOR, S. M.; FRATER, R. W. Aldehyde tanning: The villain in bioprosthetic calcification. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.**, v. 15, n. 6, p. 288-299, 1991.
40. VINCENELLI, A.; LATRÉMOUILLE, C.; ZEGDI, R.; SHEN M; LAJOS P. S.; CHACHQUES J. C.; FABIANI J. N. Does Glutaraldehyde induce calcification of bioprosthetic tissues? **Ann. Thorac. Surg.**, v. 66, p. S255-258, 1998.  
Supplement 6

41. GOLOMB, G. Controlled release of diphosphonates from synthetic polymers to inhibit calcification. **J. Biomater. Appl.**, v. 2, n. 2, p. 266-289, 1987.
42. GOLOMB, G.; DIXON, M.; SMITH, M. S.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Controlled-release drug delivery of diphosphonates to inhibit bioprosthetic heart valve calcification: release rate modulation with silicone matrices via drug solubility and membrane coating. **J. Pharm. Sci.**, v. 76, n. 4, p. 271-276, 1987.
43. LEVY, R. J.; WOLFRUM, J.; SCHOEN, F. J.; HAWLEY, M. A.; LUND, S.A.; LANGER, R. Inhibition of calcification of bioprosthetic heart valves by local controlled-release diphosphonate. **Science**, v. 228, p.190-192, 1985.
44. HIRSCH, D.; DRADER, J.; THOMAS, T. J.; SCHOEN, F. J.; LEVY, J. T.; LEVY, R. J. 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, n. 12, p. 1477-1484, 1993.
45. VYAVAHARE, N.; HIRSCH, D.; LERNER, E.; BASKIN, J. Z.; SCHOEN, F. J.; BIANCO, R.; KRUTH, H. S.; ZAND, R.; LEVY, R. J. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation. Efficacy and mechanisms. **Circulation**, v. 95, n. 2, p. 479-488, 1997.
46. VYAVAHARE, N. R.; HIRSCH, D.; LERNER, E.; BASKIN, J. Z.; ZAND, R.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 40, n. 4, p. 577-585, 1998.
47. LEE, C. H.; VYAVAHARE, N.; ZAND, R.; KRUTH, H.; SCHOEN, F. J.; BIANCO, R.; LEVY, R. J. Inhibition of aortic wall calcification in bioprosthetic heart valves by ethanol pretreatment: biochemical and biophysical mechanisms. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 42, n. 1, p. 30-37, 1998.
48. CHANDA, J.; KURIBAYASHI, R.; ABE, T. Antimineralization effect of ethanol and experimental model of accelerated calcification study in heart valve bioprostheses. **Circulation**, v. 96, n. 10, p. 3792-3793, 1997.
49. VYAVAHARE, N. R.; JONES, P. L.; HIRSCH, D.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Prevention of glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve calcification by alcohol pretreatment: further mechanistic studies. **J. Heart Valve Dis.**, v. 9, n. 4, p. 561-566, 2000.

50. WEBB, C. L.; PHELPS, L. L.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J.  
Aminodiphosphonate or Al preincubation inhibits calcification of aortic homografts in the rat subdermal model. **ASAIO Trans.**, v. 34, n. 3, p. 851-854, 1988.
51. WEBB, C. L.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Covalent binding of aminopropanehydroxydiphosphonate to glutaraldehyde residues in pericardial bioprosthetic tissue: stability and calcification inhibition studies. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 50, n. 3, p. 291-302, 1989.
52. DEWANJEE, M. K.; SOLIS, E.; LANKER, J.; MACKEY, S. T.; LOMBARDO, G. M.; TIDWELL, C.; ELLEFSEN, R. D.; KAYE, M. P. Effect of diphosphonate binding to collagen upon inhibition of calcification and promotion of spontaneous endothelial cell coverage on tissue valve prostheses. **ASAIO Trans.**, v. 32, n. 1, p. 24-29, 1986.
53. LEVY, R. J.; HAWLEY, M. A.; SCHOEN, F. J.; LUND, S. A.; LIU, P. Y.  
Inhibition by diphosphonate compounds of calcification of porcine bioprosthetic heart valve cusps implanted subcutaneously in rats. **Circulation**, v. 71, n. 2, p. 349-356, 1985.
54. WEBB, C. L.; BENEDICT, J. J.; SCHOEN, F. J.; LINDEN, J. A.; LEVY, R. J.  
Inhibition of bioprosthetic heart valve calcification with aminodiphosphonate covalently bound to residual aldehyde groups. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 46, n. 3, p. 309-316, 1988.
55. JOHNSTON, T. P.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Prevention of calcification of bioprosthetic heart valve leaflets by Ca<sup>2+</sup> diphosphonate pretreatment. **J. Pharm. Sci.**, v. 77, n. 9, p. 740-744, 1988.
56. CHEN, W.; SCHOEN, F. J.; MYERS, D. J.; LEVY, R. J. Synergistic inhibition of calcification of porcine aortic root with preincubation in FeCl<sub>3</sub> and alpha-amino oleic acid in a rat subdermal model. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 38, n. 1, p. 43-48, 1997.
57. BALDWIN, M. T.; CIESLIGA, B. L.; BARKASI, L. D.; WEBB, C. L. Long-term anticalcification effect of Fe<sup>3+</sup> in rat subdermal implants of glutaraldehyde preserved bovine pericardium. **ASAIO Trans.**, v. 37, n. 3, p. M170-172, 1991.
58. PATHAK, Y. V.; BOYD, J.; LEVY, R. J.; SCHOEN, F. J. Prevention of calcification of glutaraldehyde pretreated bovine pericardium through controlled release polymeric implants: studies of Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, protamine sulphate and levamisole. **Biomaterials**, v. 11, n. 9, p. 718-723, 1990.

59. HIRSCH, D.; DRADER, J.; PATHAK, Y. V.; YEE, R.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Synergistic inhibition of the calcification of glutaraldehyde pretreated bovine pericardium in a rat subdermal model by  $\text{FeCl}_3$  and ethanedihydroxydiphosphonate: preincubation and polymeric controlled release studies. **Biomaterials**, v. 14, n. 9, p. 705-711, 1993.
60. WEBB, C. L.; FLOWERS, W. E.; BOYD, J.; ROSENTHAL, E. L.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J.  $\text{Al}^{3+}$  binding studies and metallic cation effects on bioprosthetic heart valve calcification in the rat subdermal model. **ASAIO Trans.**, v. 36, n. 2, p. 56-59, 1990.
61. WEBB, C. L.; FLOWERS, W. E.; HORTON, C.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Long-term efficacy of  $\text{Al}^{3+}$  for prevention of bioprosthetic heart valve calcification. **ASAIO Trans.**, v. 36, n. 3, p. M408-10, 1990.
62. CHANDA, J.; KURIBAYASHI, R.; ABE, T. Use of the glutaraldehyde-chitosan-treated porcine pericardium as a pericardial substitute. **Biomaterials**, v. 17, n. 11, p. 1087-1091, 1996.
63. CHANDA, J.; KURIBAYASHI, R.; ABE, T. Heparin coupling in inhibition of calcification of vascular bioprostheses. **Biomaterials**, v. 20, n. 19, p. 1753-1757, 1999.
64. LEE, W. K.; PARK, K. D.; HAN, D. K.; SUH, H.; PARK, J. C.; KIM, Y. H. Heparinized bovine pericardium as a novel cardiovascular bioprosthesis. **Biomaterials**, v. 21, n. 22, p. 2323-2330, 2000.
65. VASUDEV, S. C.; MOSES, L. R.; SHARMA, C. P. Covalently bonded heparin to alter the pericardial calcification. **Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.**, v. 28, n. 3, p. 241-253, 2000.
66. 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, n. 1, p. 323-329, 1994.
67. GOTT, J. P.; GIRARDOT, M. N.; GIRARDOT, J. M. D.; HALL, J. D.; WHITLARK, J. D.; HORSLEY, S.; DORSEY, L. M. A.; LEVY, R. J.; CHEN, W.; SCHOEN, F. J.; GUYTON, R. A. Refinement of the alpha aminooleic acid bioprosthetic valve anticalcification technique. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 64, n. 1, p. 50-58, 1997.
68. CHANDY, T.; VASUDEV, S. C.; RAO, G. H. Changes in pericardial calcification due to antiplatelet agents: in vitro studies. **Artif. Organs**, v. 22, n. 8, p. 666-671, 1998.

69. TAN, W. M.; LOKE, W. K.; TAN, B. L.; WEE, A.; KHOR, E.; GOH, K. S. Trivalent metal ions in the prevention of calcification in glutaraldehyde treated biological tissues. Is there a chemical correlation? **Biomaterials**, v. 14, n. 13, p. 1003-1007, 1993.
70. GATTI, A. M.; GALLONI, M.; MONARI, E.; NOERA, G.; PASQUINO, E.; VALLANA F. Calcification of chemically treated bovine pericardium. **Int. J. Artif. Organs**, v. 14, n. 10, p. 647-654, 1991.
71. CARPENTIER, S. M.; CHEN, L.; SHEN, M.; FORNES, P.; MARTINET, B.; QUINTERO, L. J.; WITZEL, T. H.; CARPENTIER, A. F. Heat treatment mitigates calcification of valvular bioprotheses. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 66, p. S264-6, 1998. Supplement 6
72. VAN NOORT, R.; YATES, S. P.; MARTIN, T. R.; BARKER, A. T.; BLACK, M. M. A study of the effects of glutaraldehyde and formaldehyde on the mechanical behavior of bovine pericardium. **Biomaterials**, v. 3, n. 1, p. 21-26, 1982.
73. SIMIONESCU, D.; SIMIONESCU, A.; DEAC, R. Detection of remnant proteolytic activities in unimplanted glutaraldehyde-treated bovine pericardium and explanted cardiac bioprotheses. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 27, n. 6, p. 821-829, 1993.
74. MARANTO, A. R.; SCHOEN, F. J. Alkaline phosphatase activity of glutaraldehyde-treated bovine pericardium used in bioprosthetic cardiac valves. **Circ. Res.**, v. 63, n. 4, p. 844-848, 1988.
75. SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Bioprosthetic heart valve calcification: membrane-mediated events and alkaline phosphatase. **Bone and Mineral**, v. 17, p. 129-133, 1992.
76. MARANTO, A. R.; SCHOEN, F. J. Phosphatase enzyme activity is retained in Glutaraldehyde treated bioprosthetic heart valves. **ASAIO Trans.**, v. 34, n. 3, p. 827-830, 1988.
77. VASUDEV, S. C.; CHANDY, T.; SHARMA, C. P.; MOHANTY, M.; UMASANKAR, P. R. Synergistic effect of released aspirin/heparin for preventing bovine pericardial calcification. **Artif Organs** 24(2): 129-36, 2000. Van Belle H. Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from canine tissues. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 289, n. 1, p. 158-168, 1972.

78. TAN, W. M.; LOKE, W. K.; TAN, B. L.; WEE, A.; KHOR, E.; GOH, K. S. Trivalent metal ions in the prevention of calcification in glutaraldehyde treated biological tissues. Is there a chemical correlation? **Biomaterials**, v. 14, n. 13, p. 1003-1007, 1993.
79. QING, L. The inhibition of calcification of bioprosthetic heart valves by Al and Fe pretreatment. **ASAIO Trans.**, v. 37, n. 2, p. 115-116, 1991.
80. NEETHLING, W. M.; VAN DEN HEEVER, J. J.; MEYER, J. M.; BARNARD, H. C. Processing factors as determinants of tissue valve calcification. **J. Cardiovasc. Surg. (Torino)**, v. 33, n. 3, p. 285-291, 1992.
81. CHANDA, J.; KURIBAYASHI, R.; ABE, T.; SEKINE, S.; SHIBATA, Y.; YAMAGISHI, I. Is the dog a useful model for accelerated calcification study of cardiovascular bioprostheses? **Artif. Organs**, v. 21, n. 5, p. 391-395, 1997.
82. CHANDA, J. Anticalcification treatment of pericardial bioprostheses. **Biomaterials**, v. 16, n. 6, p. 465-469, 1994.
83. SCHULTZ-HECTOR, S.; BALZ, K. Radiation-induced loss of endothelial alkaline phosphatase activity and development of myocardial degeneration. An ultrastructural study. **Lab. Invest.**, v. 71, n. 2, p. 252-260, 1994.
84. NASCIMENTO, N. D.; SEEBART, C. S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J. R., KAISER, I. I. Influence of ionizing radiation on crotoxin: Biochemical and immunological aspects. **Toxicon**, v. 34, p. 123-131, 1996.
85. SANNER, T.; PHIL, A. Kinetics of enzyme inactivation in solution by ionizing radiation. **Eur. J. Biochem.**, v. 1, n.1, p. 33-35, 1967.
86. KOPP, P. M.; READ, J. F.; CHARLESBY, A. Comparison of the effect of alpha- and gamma-radiation on an enzyme. **Nature**, V. 211, n. 52, p. 959-960, 1966.
87. BODNAR, E.; OLSEN, E. G. J.; FLORIO, R.; DOBRIN, J. Damage of porcine aortic valve tissue caused by the surfactant sodiumduodecylsulphate. **Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 34, n. 2, p. 82-85, 1986.
88. JORGE-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ, P.; DE LA TORRE, N.; ESCUDERO, C.; GRACÍA-PÁES, J. M.; BUJÁN, J.; CASTILLO-OLIVARES, J. L. Inhibition of the calcification of porcine valve tissue by selective lipid removal. **Biomaterials**, v. 15, n. 10, p. 815-820, 1994.

89. NIMNI, M. E.; MYERS, D.; ERTL, D.; HAN, B. Factors which affect the calcification of tissue-derived bioprostheses. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 35, n. 4, p. 531-537, 1997.
90. VYAVAHARE, N. R.; JONES, P. L.; HIRSCH, D.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Prevention of glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve calcification by alcohol pretreatment: further mechanistic studies. **J. Heart Valve Dis.**, v. 9, n. 4, p. 561-566, 2000.
91. PATHAK, C. P.; ADAMS, A. K.; SIMPSON, T.; PHILLIPS, R. E.; MOORE, M. A. Treatment of bioprosthetic heart valve tissue with long chain alcohol solution to lower calcification potential. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 69, n. 1, p. 140-144, 2004.