

CITOTOXICIDADE E ADESÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DO PERICÁRDIO BOVINO MODIFICADO LIOFILIZADO E IRRADIADO COM FIBROINA DE SEDA E QUITOSANA

Andrea C. D, Rodas¹, Roberta Polak², Priscila H. Hara¹, Emily I. Lee¹, Ronaldo N. M. Pitombo², Olga Z. Higa¹

¹Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo (SP), Brasil

²Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil
E-mail: ozahiga@ipen.br

Resumo. *Próteses cardíacas com enxerto de tecidos biológicos têm sido utilizados desde os anos 60 como alternativas as próteses cardíacas mecânicas. Desde 1974 o pericárdio bovino (PB) tornou-se um dos materiais mais utilizados para a preparação de biopróteses. Para melhora das propriedades mecânicas, foram desenvolvidos vários processos químicos e físicos de reticulação. Atualmente o tratamento mais usual para as biopróteses de pericárdio bovino é a reticulação com glutaraldeído (GA), que pode induzir a calcificação in vivo, o que leva a uma insuficiência valvar e a necessidade de substituição da prótese. Em um trabalho prévio, o grupo demonstrou que a irradiação em feixe de elétrons (25kGy a 4,67kGy/h) aplicada ao PB liofilizado na ausência de oxigênio, promove a reticulação entre as fibras de colágeno do pericárdio bovino. Neste trabalho, foi estudada a incorporação de fibroína de seda (SF), quitosana (CHIT) e suas misturas (1:1, 1:3 e 3:1) no PB. Após os tratamentos do PB, as amostras foram irradiadas e então analisadas quanto a sua citotoxicidade e a capacidade de adesão e crescimento das células endoteliais. Após a análise foi verificado que todas as amostras apresentaram citotoxicidade nos seus extratos, devido aos resíduos de tratamento do PB (ácido acético e etanol). Entretanto, após algumas lavagens foram removidos os resíduos tóxicos do biomaterial, tornando-o próprio para cultura celular. O teste de biofuncionalidade mostrou que as amostras modificadas com SF/CHIT (todas as proporções) e irradiadas favoreceram a adesão e o crescimento das células endoteliais no tecido.*

Palavras-chave: *Pericárdio bovino, Quitosana, Fibroína de seda, Citotoxicidade, Adesão de células endoteliais.*

1. INTRODUÇÃO

Desde a introdução do uso do glutaraldeído como preservante de válvulas de tecido porcino, em 1968 por Carpentier e sua posterior comercialização, uma nova geração de válvulas cardíacas foi introduzida em 1971 pelo Dr. Ionescu, na qual eram confeccionadas válvulas cardíacas com pericárdio bovino reticulado com glutaraldeído, sendo sua comercialização rapidamente difundida (Starr A, 2002; Doenst, T, 2004).

Todas as referências da literatura, sem exceção, citam que a principal desvantagem destas válvulas confeccionadas com pericárdio bovino tratado com glutaraldeído é sua capacidade de calcificação espontânea. A calcificação diminui a vida útil da válvula, pois muda as características do material tornando-o duro, e este por consequência, perde suas características mecânicas, vindo a se romper.

Várias hipóteses têm sido levantadas para a facilidade da calcificação da válvula cardíaca (Schoen F.J e Levy R.J, 2005), sendo a causa mais provável, a alta toxicidade dos resíduos de glutaraldeído no pericárdio bovino (Gendler E, 1984; Simionescu D, 1993; Oyarzun J.R, 1996), que acarreta também a interação de células do sistema imunológico (Rieder E, 2006), devido a resíduos celulares provenientes do pericárdio bovino, e interação com plaquetas com formação de trombos (Kasimir M.T, 2005) contribuindo para degradação desta válvula.

Atualmente na literatura podemos encontrar inúmeros trabalhos que sugerem a destoxificação do pericárdio bovino após tratamento com glutaraldeído com ácido alfa amino

oléico (Gulbins, 2006), ácido deoxicólico (da Costa, 2004), triton (Graussa R.W., 2005); descclularização pela ação da tripsina (Graussa R.W, 2005); e mesmo a utilização de outros componentes químicos para recobrimento do pericárdio tratado como a ácido hialurônico (Ohri R., 2004) e fibronectina (Trantina-Yates AE, 2001); e mesmo a substituição do glutaraldeído como reticulante por triglicidilamina (Connolly J.M, 2005). Uma proposta para diminuição da toxicidade do PB foi a liofilização, apresentando resultados promissores (Maizato *et al.*, 2003).

A liofilização de tecidos biológicos possibilita uma alternativa para sua preservação permitindo a estocagem destes tecidos, os quais posteriormente podem ser utilizados para confecção de novos dispositivos como, por exemplo, válvulas cardíacas. O tecido liofilizado pode sofrer tratamento químico ou físico, que podem ser melhor controlados quando secos, sem a interferência da água (Leirner A.A., 2009).

Os testes de citotoxicidade e biofuncionalidade *in vitro* destes tecidos, permitem avaliar a sua biocompatibilidade e assim direcionar as melhores condições dos tecidos antes da liofilização. O teste de biofuncionalidade dos materiais está relacionado ao tipo de células aos quais estes ficarão em contato, e no caso do material utilizado para a confecção de válvulas cardíacas, deve-se verificar a interação destes materiais com células endoteliais (células que recobrem a parede interna dos vasos sanguíneos). Este teste é o mais próximo das condições *in vivo*.

Este trabalho teve como objetivo dar continuidade aos trabalhos de Nogueira (Nogueira, 2009), que iniciou o recobrimento do pericárdio bovino com solução de quitosana e fibroína de seda e que neste trabalho foram recobertas com soluções com diferentes proporções dos biopolímeros. Ainda na tentativa de promover a reticulação dos componentes, estes também foram irradiados em feixe de elétrons.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação do pericárdio bovino

Para este estudo, foi preparado o recobrimento de membranas de pericárdio bovino liofilizado, mergulhando-o em solução de quitosana (Q) 2% (m/v) em ácido acético 1% (v/v), em solução de fibroína de seda (F) 2% (m/v) e misturas dessas soluções nas proporções: Q:F / 1:3; Q:F / 1:1; Q:F / 3:1. O excesso de solução foi retirado, e tudo foi liofilizado. Metade das amostras foram irradiadas no feixe de elétrons na dose de 25kGy e taxa de dose de 4, 67 kGy/s sob vácuo. Tanto as amostras irradiadas ou não, foram submetidas ao teste de citotoxicidade e biofuncionalidade. A Tabela 1 relaciona as condições de modificação do pericárdio bovino.

Tabela 1. Relação das membranas de pericárdio bovino preparadas com quitosana, fibroína de seda e misturas.

código	descrição
PB1	PB + quitosana 2% não irradiado
PB2	PB + quitosana 2% irradiado
PB3	PB + fibroína de seda 2% não irradiado
PB4	PB + fibroína de seda 2% irradiado
PB5	PB + quitosana / fibroína (3:1) irradiado
PB6	PB + quitosana / fibroína (1:1) irradiado
PB7	PB + quitosana / fibroína (1:3) irradiado
PB8	PB + quitosana / fibroína (3:1)
PB9	PB + quitosana / fibroína (1:3)
PB10	PB + quitosana / fibroína (1:1)

PB = pericárdio bovino

2.2 Teste de Citotoxicidade

Manutenção das células CHO-k1 in vitro

As células CHO-k1 foram mantidas em cultura com meio RPMI 1640 suplementado com antibiótico e antimicótico (penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina 0,025 µg/mL), 2mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino em incubadora úmida a 37° C e atmosfera de 5% de CO₂, até atingirem a subconfluência (aproximadamente 90% de utilização da área de cultura) na placa de cultura de onde foram descoladas pela ação da solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% em solução tampão fosfato pH 7,4.

O teste de citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade do pericárdio bovino foi seguida a norma ISO – 10993-5. Os reagentes empregados para a avaliação da viabilidade celular foram do CellTiter96[®] AQueous Non – Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation).

Preparação dos extratos:

Amostras: as amostras cortadas no tamanho adequado para serem utilizadas no teste de citotoxicidade e posteriormente no estudo de biofuncionalidade, foram esterilizadas pela exposição à lâmpada germicida ultra-violeta (UV) do fluxo laminar por 30 minutos de cada lado. Cada amostra foi colocada em um tubo estéril e adicionado solução de cloreto de sódio 0,9% (m/v) na proporção final de 1cm²/mL. Para a preparação do extrato do PB, os tubos foram deixados em um banho termostaticado a 37° C, por 48 horas sob agitação. Após este período, os extratos foram filtrados com filtro para seringa com membrana de acetato de celulose, poro 0,45 µm.

Controle negativo: polietileno de alta densidade (PEAD) em grânulos, esterilizados com 25 kGy em irradiador gama. O extrato do PEAD foi preparado na proporção de 0,2g /mL de meio RPMI 1640, mantido e filtrado da mesma maneira que as amostras.

Controle positivo: Solução de fenol 0,5% (v/v) em solução fisiológica, esterilizado por filtração com filtro para seringa com membrana de acetato de celulose, poro 0,45 µm.

Diluições dos extratos: de 100 a 6,25% em meio RPMI 1640 estéril.

Procedimento:

Em uma placa de cultura de 96 poços foram colocados 50µL do extrato e suas diluições, em quadruplicata. Sobre eles foram adicionados 50µL da suspensão de células CHO, na proporção de 3000 células por poço.

A placa foi colocada na incubadora úmida com 5% de CO₂ por 72 horas a 37°C. A viabilidade celular foi determinada pela adição de 20 µL de solução de MTS/PMS (20:1) e incubado por mais 2 horas. A placa foi levada a uma leitora ELISA (espectrofotômetro para placas de 96 poços) com filtro de 490 nm. Todos os testes foram realizados com um controle positivo e negativo.

A viabilidade celular foi determinada pela relação:

$$VC(\%) = \left(\frac{DO_{amostra}}{DO_{controle}} \right) \times 100$$

Onde: *VC* = viabilidade celular (%); *DO_{amostra}* = densidade óptica da amostra; *DO_{controle}* = densidade óptica do controle.

As amostras que apresentaram redução de 30% da viabilidade celular foram consideradas citotóxicas (ISO 10993-5:2009).

2.3 Teste de biofuncionalidade: adesão e crescimento das células endoteliais *in vitro*

As células endoteliais utilizadas para avaliação da biofuncionalidade dos materiais são de linhagem estabelecida e foram adquiridas de repositório internacional. As células CRL1730 da ATCC são células endoteliais provenientes do cordão umbilical humano (HUVEC).

Manutenção das células endoteliais em cultura

As células foram cultivadas segundo protocolo da ATCC: meio Ham's F12K com 2 mM-L-glutamina, ajustado com bicarbonato de sódio para concentração de 1,5g/L; e suplementado com 0,1 mg/mL de heparina e 0,05 mg/mL ECGS (endothelial cell growth supplement – suplemento de crescimento celular endotelial), 10% de soro fetal bovino. Temperatura de incubação de 37°C com 5% de CO₂.

Quando as células ocupavam aproximadamente 80% da área de cultivo no frasco de cultura, foram descoladas pela ação enzimática de solução de tripsina 0,05% /EDTA 0,02% e amplificadas na proporção de 1:5.

Preparação das membranas de pericárdio bovino para a semeadura das células endoteliais

Após o teste de citotoxicidade, as membranas foram acomodadas em uma placa de cultura de 6 poços e sobre elas, colocado um anel de aço inoxidável de 16 mm de diâmetro interno para delimitação da área de cultivo das células. As membranas foram mantidas com meio de cultura Ham's F12 na incubadora a 37° C por uma noite, para ambientação, como mostrado na Figura 1.

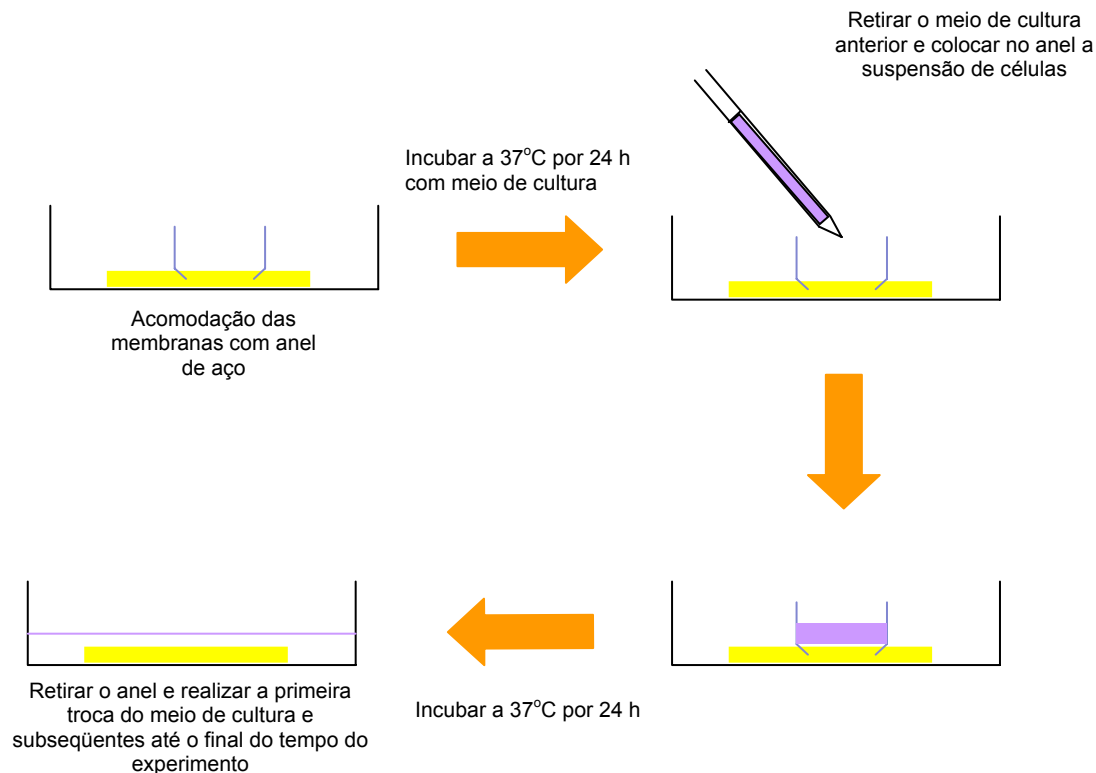


Figura 1. Esquema simplificado da preparação de amostras para adesão de células sobre elas.

As células endoteliais cultivadas (12^a passagem), tendo atingindo a confluência, foram retiradas do frasco de cultura por ação da solução tripsina/EDTA e 12000 células foram semeadas na área interna de cada anel acomodado sobre as membranas. Após 24 horas os anéis foram retirados e realizada a primeira troca com o meio de cultura composto de meio Ham's F12K com 2 mM L-glutamina, ajustado com bicarbonato de sódio para concentração de 1,5g/L; suplementado com 0,1 mg/mL de heparina; 10ng/mL de *b-FGF* (fator de crescimento de fibroblastos básico); 10ng/mL de *VEGF* (fator de crescimento de vasos endoteliais), e 10% de soro fetal bovino. As membranas com as células foram mantidas na incubadora por 3 semanas com troca de meio de cultura a cada 3 dias. Após este período, as membranas foram fixadas com metanol e submetidas a reação de imunofluorescência. A reação antígeno-anticorpo para imunofluorescência foi realizada com anticorpo anti - fator VIII humano (marcador específico das células endoteliais humanas cultivadas) (1:10), seguido de uma reação com um segundo anticorpo marcado com fluoresceína (1:100) para revelação do citoplasma celular. O núcleo das células foi corado inespecificamente com solução de brometo de etídeo (2µg/mL). As células endoteliais foram posteriormente analisadas no microscópio confocal LSM 510 META – ZEISS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pericárdio bovino é composto predominantemente por colágeno do tipo I (Jastrzebska, 2005; Kubisz e Połomska, 2007), que *in vivo* é o principal componente dos tecidos conectivos. Uma vez retirado do animal, sua degradação é iminente e para seu uso como biomaterial, requer tratamentos para manutenção, ou mesmo melhoria, de suas propriedades mecânicas e biofuncionais por meio de tratamentos químicos, sendo o tratamento com glutaraldeído o mais empregado para confecção de válvulas cardíacas. O glutaraldeído é um

agente químico altamente tóxico, e nos tecidos tratados com ele retem um excesso do agente, de difícil eliminação (Gendler, 1984).

Devido aos tratamentos aos quais o PB foi submetido, inicialmente foi realizado o teste de citotoxicidade para todas as amostras. De acordo com a nova edição da norma ISO 10993-5:2009, as amostras que apresentam diminuição de 30% da viabilidade celular são consideradas citotóxicas, ou seja, todas as amostras deste trabalho são consideradas citotóxicas.

Porém, conhecendo os componentes responsáveis pela diminuição da viabilidade celular, como o ácido acético para as misturas de quitosana, e o álcool para a membrana recoberta com fibroína de seda, cada membrana foi imersa em 40mL de solução fisiológica, que foi trocada a cada 48 horas (totalizando 3 trocas), por 7 dias. Na da última troca foi realizado novo teste de citotoxicidade, que mostra que os compostos citotóxicos da membrana foram eficientemente retirados, como representado na Figura 2.

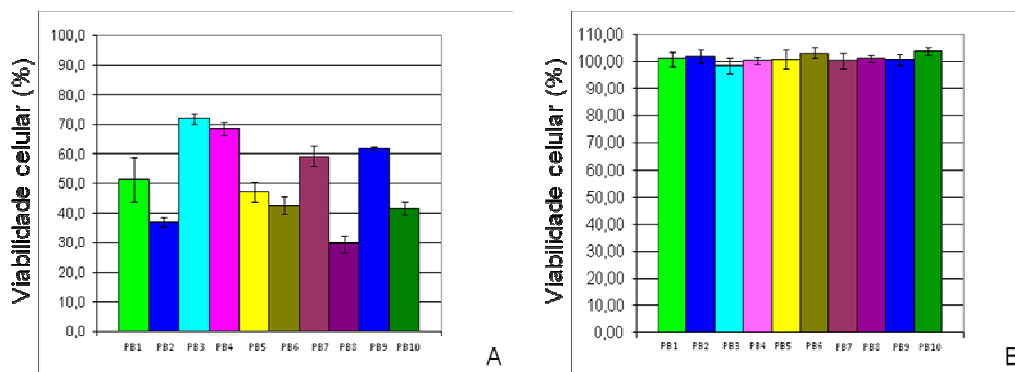


Figura 2. Viabilidade das células CHO (%) nos extratos (100%) do pericárdio bovino recobertos com quitosana, fibroína de seda e mistura de quitosana/fibroína de seda. A – antes da lavagem, B – depois da lavagem.

No teste de biofuncionalidade, as células endoteliais foram semeadas nas membranas recobertas com as soluções de quitosana e fibroína de seda. No pericárdio bovino recoberto com as soluções puras (Figura 3), foram observadas algumas as células apenas na membrana com fibroína de seda e irradiada. Nas membranas recobertas com as misturas das duas soluções e irradiadas, podem ser observadas células aderidas às fibras da estrutura do pericárdio bovino (Figuras 4).

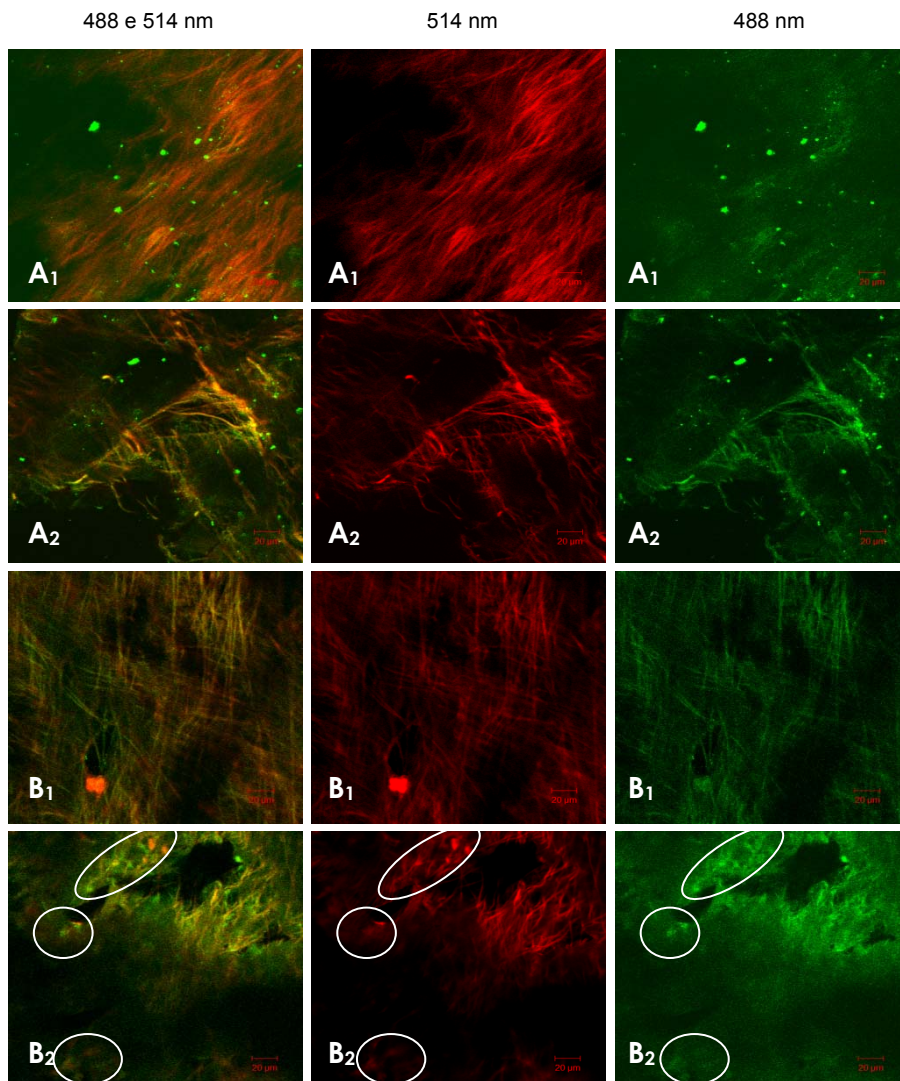


Figura 3. Imagens da microscopia confocal em 488nm e 514nm. A₁ - PB com quitosana 2% e não irradiado; A₂ - PB com quitosana 2% e irradiado; B₁ - PB com fibroína de seda 2% e não irradiado; B₂ - PB com fibroína de seda 2% e irradiado. Os círculos destacam as regiões em que são identificadas células funcionais.

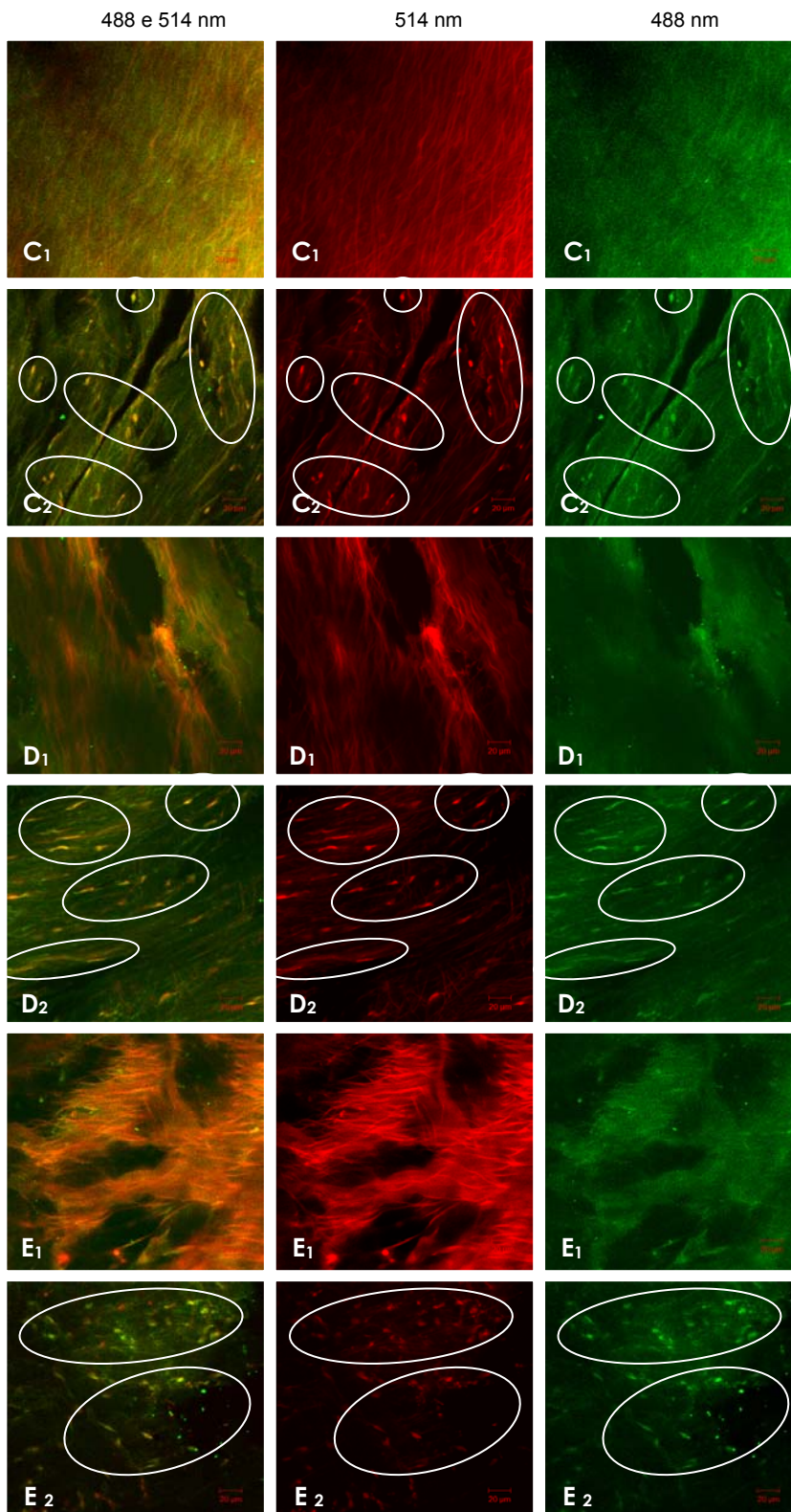


Figura 4. Imagens da microscopia confocal em 488nm e 514nm. C₁ – PB com fibroína / quitosana (1:3) não irradiado; C₂ - PB com fibroína / quitosana (1:3) irradiado; D₁ - PB com fibroína / quitosana (3:1) não irradiado ; D₂ - PB com fibroína / quitosana (3:1) irradiado; E₁ - PB com fibroína / quitosana (1:1) não irradiado; E₂ - PB com fibroína / quitosana (1:1) irradiado. Os círculos destacam as regiões em que são identificadas células funcionais.

Nas Figuras 3 e 4 também podem ser observadas mudanças estruturais do pericárdio bovino. Na Figura 3-A1 observa-se que o PB sofre alteração na sua estrutura devido ao ácido acético da solução da quitosana (Piez, 1989). O ácido acético é comumente usado para dissolução do colágeno tipo I, que é o principal componente do PB. Portanto, a imersão do pericárdio na solução de quitosana, fez com que ele se dissolvesse, e por este motivo, nas fotos ele aparece como um borrão verde amorfo.

Tanto a fibroína de seda como a quitosana, não se dissolvem completamente em solução, e assim estes biopolímeros, por apresentarem uma cadeia longa, formam uma suspensão coloidal, na qual podem ser identificadas “fibras” desses biopolímeros. Nogueira (Nogueira, 2009) mostrou que a quitosana e a fibroína de seda podem ser identificadas por microscopia óptica, e no seu trabalho, uma placa de silício foi imersa em soluções dos dois biopolímeros. Como o silício é transparente, foi possível realizar o acompanhamento da acomodação das fibras nessa placa. No caso do pericárdio por ser um material opaco, o que impede a passagem da luz, há dificuldade de sua análise por microscopia óptica, sendo necessárias alternativas para visualização deste fenômeno. Pela microscopia confocal, pode-se observar que as fibras de fibroína de seda e quitosana são facilmente identificadas na superfície do pericárdio bovino, o aspecto morfológico é semelhante ao apresentado por Nogueira. Neste caso, as fibras de fibroína de seda e quitosana podem ser identificadas nos dois comprimentos de onda utilizados para análise (Fig. 4-C1, D1 e E1).

A presença das fibras de fibroína de seda e quitosana estão pronunciadas nas misturas usadas para recobrimento do pericárdio bovino (Figuras 3 e 4). Quando o PB não foi irradiado, não se observaram células aderidas. Quando o PB foi irradiado, percebe-se degradação da estrutura do pericárdio bovino, da quitosana, da fibroína de seda, mas as células endoteliais aparecem aderidas nas fibras de colágeno presentes na estrutura do pericárdio.

As micrografias no microscópio confocal demonstraram que existe uma interação entre a membrana de pericárdio bovino com a quitosana e a fibroína de seda e que a irradiação dessas membranas favoreceu a adesão e o crescimento de células endoteliais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro, e a Prof. Dra. Toshie Kawano e Alexsander Seixas de Souza pela utilização e assistência do microscópio confocal LSM 510 META – ZEISS, situado no Instituto Butantan – Laboratório de parasitologia/malacologia.

REFERÊNCIAS

- Connolly J.M., Alferiev I., Clark-Gruel J.N., Eidelman N., Sacks M., Palmatory E., Kronsteiner A., DeFelice S., Xu J., Ohri R., Narula N., Vyavahare N., Levy R.J. (2005) "Triglycidylamine crosslinking of porcine aortic valve cusps or bovine pericardium. Results in improved biocompatibility, biomechanics, and calcification resistance: chemical and biological mechanisms". *Am J Pathology*, 166, 1-13.
- da Costa F.D.A., Dohmen P.M., Lopes S.V., Lacerda G., Pohl F., Vilani R., da Costa M.B.A., Vieira E.D., Yoschi S., Konertz W, da Costa I.A. (2004) "Comparison of cryopreserved homografts and decellularized porcine heterografts implanted in sheep". *Artificial Organs*, 28, 366 – 370
- Doenst, T., Borger, M.A., David T.E. (2004) "Long – term results of bioprosthetic mitral valve replacement the pericardial perspective". *J Cardio Surg*, 45, 449 – 454
- Gendler E, Gendler S, Nimni ME. (1984) "Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis". *J Biomed Mat Res*, 18, 727-736.
- Graussa R.W., Hazekamp M.G., Oppenhuizen F., van Munsterena C.J., Gittenberger-de Groota A.C, DeRuitera M.C. (2005). "Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods". *Euro J Card Thor Surg*, 27, 566–571.
- Gulbins H., Pritisanac A., Pieper K., Goldemund A., Meiser B.M., Reichart B., Daebritz S., (2006) "Successful endothelialization of porcine glutaraldehyde-fixed aortic valves in a heterotopic sheep model". *Ann Thor Surg*, 81, 1472 – 1479.
- International Organization For Standardization. (2009), ISO 10993-5; Biological testing of medical and dental materials devices – part 5 Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Switzerland.
- Jastrzebska M, Zalewska-Rejda J, Wrzalik R, Kocot A, Barwin´ski B, Mróz I, Cwalina B. (2005) "Dimethyl suberimidate cross-linked pericardium tissue: Raman spectroscopic and atomic force microscopy investigations." *J Molec Struct*, 744-747, 789 - 795.
- Kasimir M.T., Weigel G., Sharma J., Rieder E., Seebacher G., Wolner E., Simon P. (2005) "The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation". *Throm Haem*; 94, 562 – 567.
- Kubisz L, Połomska M. (2007) "FT NIR Raman studies on irradiated bone". *Spectrochim Acta A*;66, 616 - 25.
- Leirner AA, Tattini V Jr, Pitombo RN. (2009) "Prospects in lyophilization of bovine pericardium". *Artif Organs*. 33, 221-229.
- Maizato, MJS, Higa OZ, Mathor MB, Camillo MAP, Spencer PJ, Pitombo RN, Zavaglia CAC, Leirner AA (2003) "Glutaraldehyde-treated Bovine Pericardium: Effects of Lyophilization on Cytotoxicity and Residual Aldehydes". *Artificial Organs*, 27, 692-694.
- Nogueira, GM. (2009) "*Hidrogéis e filmes de fibroína de seda para fabricação ou recobrimento de biomateriais.*". Tese de Doutorado, FEQ/UNICAMP, Campinas.
- Ohri R., Hahn S. K., Hoffman A.S., Stayton P.S., Giachelli C.M. (2004) "Hyaluronic acid grafting mitigates calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium". *J Biomed Mat Res*, 70 A, 328–334.
- Oyazun J.R., McCormick J.R., Bogden J.D., Gabbay S. Abolhoda A., Yu S. (1996) "Calcification of Bovine Pericardium: Glutaraldehyde Versus No-React Biomodification". *Ann Thor Surg*, 62, 169 – 174.
- Piez, K.A. (1989) "Collagen", in *Encyclopedia of polymers science and engineering*, Mark; Bikales, Overberger & Menges (ed), Willey Interscience, New York.
- Rieder E., Nigisch A., Dekan B., Kasimir M.T., Mühlbacher F., Wolner E., Simon P., Weigel G. (2006) "Granulocyte-based immune response against decellularized or glutaraldehyde cross-linked vascular tissue". *Biomaterials*, 27, 5634–5642.
- Schoen F.J, Levy R.J. (2005) "Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention". *Ann Thor Surg.*, 79, 1072–1080.
- Simionescu D, Simionescu A, Deac R. (1993) "Mapping of glutaraldehyde-treated bovine pericardium and tissue selection for bioprosthetic heart valves". *J Biomed Mat Res.*, 27, 697-704.
- Starr A., Fessler C.L., Grunkemeier G. Guo-Wei H. (2002) "Heart valve replacement surgery: past, present and future". *Clin Exp Pharm Physiol.*, 29, 735–738.
- Trantina-Yates AE, Human P, Bracher M, Zilla P. (2001) "Mitigation of bioprosthetic heart valve degeneration through biocompatibility: in vitro versus spontaneous endothelialization". *Biomaterials*, 22, 1837-1846.

CYTOTOXICITY AND ENDOTHELIAL CELL ADHESION OF LYOPHILIZED AND IRRADIATED BOVINE PERICARDIUM MODIFIED WITH SILK FIBROIN AND CHITOSAN

Andrea C. D. Rodas¹, Roberta Polak², Priscila H. Hara¹, Emily I lee¹, Ronaldo N.M. Piotmbo², Olga Z. Higa¹

¹Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo (SP), Brasil

²Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil

E-mail: ozahiga@ipen.br

Abstract. *Grafts of biological tissues have been used since the 60s as an alternative to the mechanical heart prostheses. Since 1974 the bovine pericardium (BP) has become one of the most commonly used materials for the preparation of bioprostheses. To improve the strength of materials, various processes of chemical and physical crosslinking were developed. Nowadays the most consolidated treatment to bovine pericardial bioprostheses is the crosslinking with glutaraldehyde (GA), although GA may induce calcification in vivo, leading to valve insufficiency and the need of the prosthesis substitution. In previous work, our group demonstrated that electron beam irradiation (25 kGy at 4,67 kGy/s) applied at lyophilized PB in the absence of oxygen promote crosslinks among collagen fibers of BP tissue. In this work, the incorporation of silk fibroin (SF), chitosan (CHIT) and their mixtures (1:1, 1:3 and 3:1) in the BP were studied. After the modifications, samples were irradiated and then analyzed for their cytotoxicity and the ability of adhesion and growth of endothelial cells. After analysis it was verified that all samples showed cytotoxicity in the extract. However, after few washings this cytotoxicity, due to acetic acid and ethanol residues, is removed from the biomaterial, making it suitable for use. Biofuncional test showed that the samples modified with SF/CHIT (all ratios) and irradiated favored the adhesion and growth of endothelial cells throughout the tissue. These results suggest that irradiation promotes interactions between the SF/CHIT and BP and that these changes are positive for the adhesion and growth of endothelial cells.*

Key words: *Bovine pericardium, Chitosan, Silk Fibroin, Cytotoxicity, Endothelial cell adhesion.*