UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Comparação de tratamentos preventivos à calcificação em
biomaterial (pericárdio bovino) empregado para a
confeção de válvulas cardíacas protéticas**

Luis Henrique Garcia-Amoedo

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientadora:
Profa. Tit. Terezinha de Jesus A. Pinto**

**São Paulo
2004**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Comparação de tratamentos preventivos à calcificação em
biomaterial (pericárdio bovino) empregado para a
confeção de válvulas cardíacas protéticas**

Luis Henrique Garcia-Amoedo

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientadora:
Profa. Tit. Terezinha de Jesus A. Pinto**

**São Paulo
2004**

17955

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

DEDALUS - Acervo - CQ

30100006122

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

G216c Garcia-Amoedo, Luis Henrique
Comparação de tratamentos preventivos à calcificação em
biomaterial (pericárdio bovino) empregado para a confecção de
válvulas cardíacas protéticas / Luis Henrique Garcia-
Amoedo. -- São Paulo, 2004.
84p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Produto médico-hospitalar : Controle de Qualidade
I. T. II. Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

615.19015 CDD

Luis Henrique Garcia-Amoedo

Comparação de tratamentos preventivos à calcificação em
biomaterial (pericárdio bovino) empregado para a
confeção de válvulas cardíacas protéticas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de 2004.

Agradecimentos

A todos aqueles que direta ou indiretamente auxiliaram positivamente no desenvolvimento deste trabalho, muito obrigado.

Um agradecimento especial à minha família, o foco de luz que me norteia, e que com amor pleno, respeito e apoio incondicional ao meu trabalho, sempre me incentivou.

Um agradecimento especial à Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, que antes de ser unicamente a minha orientadora, é também uma grande amiga, por quem tenho profundo respeito, admiração e bem-querer.

A todos vocês o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

1. Introdução	2
2. Revisão de Literatura	8
3. Objetivos	35
4. Material e Métodos	37
4.1 Material	37
4.2 Métodos	38
4.2.1 Planejamento estatístico.....	38
4.2.2 Tratamento de superfície – tetrafluoreto de carbono	38
4.2.3 Tratamento de superfície – carbono amorfo tipo diamante...	39
4.2.4 Avaliação da citotoxicidade – teste <i>in vitro</i>	40
4.2.5 Teste de resistência mecânica – tração.....	42
4.2.6 Determinação da temperatura de encolhimento	42
4.2.7 Microscopia eletrônica de varredura.....	43
4.2.8 Implante do biomaterial obtido em animais de experimentação	43
4.2.9 Determinação do teor de cálcio nas amostras	45
4.2.10 Exame histopatológico do material explantado.....	45
Método de Von Kossa.....	46
Método do Tricrômio de Masson.....	46
Método da Hematoxilina-Eosina	47
5. Resultados e Discussão	49
5.1 Tratamento de superfície – aplicação de tetrafluoreto de carbono e carbono amorfo tipo diamante.....	49
5.2 Microscopia eletrônica de varredura	51
5.3 Avaliação da citotoxicidade – teste <i>in vitro</i>	55
5.4 Teste de resistência mecânica – tração	59
5.5 Temperatura de desnaturação das peças.....	60
5.6 Exame histopatológico do material explantado	62
5.7 Determinação do teor de cálcio.....	68
6. Conclusão	72
7. Referências Bibliográficas	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do glutaraldeído	10
Figura 2	Glutaraldeído livre, formas oligoméricas, e hemiacetal cíclico presentes em soluções aquosas de glutaraldeído.....	11
Figura 3	Polimerização do glutaraldeído.....	12
Figura 4	Ligações cruzadas entre os aminogrupos do colágeno por ação do glutaraldeído	12
Figura 5	Representação esquemática dos posicionamentos dos implantes nas lojas subcutâneas abrangendo controle (C), carbono amorfo tipo diamante (D) e polímero à base de tetrafluoreto de carbono (F).....	44
Figura 6	Imagem de peça de pericárdio bovino fixada com glutaraldeído não submetida ao processamento por plasma	49
Figura 7	Imagem de peça de pericárdio bovino, previamente fixada com glutaraldeído, após tratamento para deposição de polímero à base de tetrafluoreto de carbono e hidrogênio a plasma.....	50
Figura 8	Imagem de peça de pericárdio bovino, previamente fixada com glutaraldeído, após tratamento para deposição de carbono amorfo tipo diamante a plasma	50

Figura 9	Fotomicrografia (eletrônica de varredura) de peça de pericárdio bovino fixada com glutaraldeído não submetida ao processamento a plasma; aumento 372x.....	51
Figura 10	Fotomicrografia (eletrônica de varredura) de peça de pericárdio bovino, previamente fixada com glutaraldeído, após processamento para deposição de polímero por plasma de tetrafluoreto de carbono e hidrogênio; aumento de 372 X.....	52
Figura 11:	Fotomicrografia (eletrônica de varredura) de peça de pericárdio bovino, previamente fixada com glutaraldeído, após processamento para deposição de carbono amorfo tipo diamante a plasma, aumento de 372 X.....	53
Figura 12	Observação macroscópica do Controle positivo para o teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> , evidenciando halo de morte celular	57
Figura 13	Observação macroscópica do Controle negativo para o teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> , não evidenciando halo de morte celular	57
Figura 14	Observação macroscópica para o teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> de uma amostra representativa dos grupos tratados com plasma, não evidenciando halo de morte celular	58
Figura 15	Fotomicrografia exploratória da morfologia das células NCTC clone 929, empregadas no teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> , evidenciando a região limítrofe do halo de morte celular; aumento 200X.....	58

Figura 16	Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino, representativa do grupo submetido à deposição a plasma de polímero de tetrafluoreto de carbono, explantada e corada; (Hematoxilina-Eosina, HE 200 X)	63
Figura 17	Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino, representativa do grupo submetido à deposição a plasma de polímero de tetrafluoreto de carbono, explantada e corada; (Tricrômio de Masson, 100X)	64
Figura 18	Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino, representativa do grupo submetido à deposição a plasma de <i>diamond like carbon</i> , explantada e corada;(Hematoxilina eosina, 200X)	64
Figura 19	Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino, representativa do grupo submetido à deposição de <i>diamond like carbon</i> a plasma, explantada e corada; (Tricrômio de Masson, 200X).....	65
Figura 20	Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino do grupo controle, explantada e corada. (von Kossa, 200 X)	66
Figura 21	Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino, representativa do grupo submetido à deposição a plasma de polímero de tetrafluoreto de carbono, explantada e corada; (von Kossa, 200X)	67

Figura 22	Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino, representativa do grupo submetido à deposição de carbono amorfo tipo diamante a plasma, explantada e corada; (von Kossa, 100X)	68
------------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados das avaliações macroscópica e microscópica de toxicidade das amostras obtidos nos ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i>	56
Tabela 2	Resultados obtidos para a tensão máxima à tração (kgf) em peças de pericárdio bovino isento de tratamento adicional à fixação com glutaraldeído (controle) e após tratamento por deposição de polímero à base de tetrafluoreto de carbono (Tetrafluoreto de carbono) e carbono amorfo tipo diamante (DLC).....	59
Tabela 3	Temperaturas (°C) de desnaturação das peças de pericárdio bovino isento de tratamento adicional à fixação com glutaraldeído (controle) e após tratamento por deposição de polímero à base de Tetrafluoreto de Carbono (T1, T2 e T3) e carbono amorfo tipo diamante (DLC) (D1, D2 e D3).....	61
Tabela 4	Quantidades de cálcio (Ca ²⁺) incorporado no pericárdio (µg/grama de tecido seco) isento de tratamento adicional à fixação com glutaraldeído (controle) e após tratamento para deposição de polímero à base de Tetrafluoreto de Carbono (T1, T2 e T3) e carbono amorfo tipo diamante (DLC) (D1, D2 e D3).....	69

RESUMO

Biopróteses de válvulas cardíacas derivadas de tecidos animais que sofreram ligações cruzadas por ação do glutaraldeído, como o pericárdio bovino, têm uso terapêutico limitado devido ao fato de que tendem a sofrer processo de calcificação. Para prevenir a calcificação, diversas modificações podem ser feitas nos biomateriais; uma das estratégias empregadas é introduzir moléculas volumosas que podem ocupar os espaços entre as estruturas, e por efeito estérico, impedir o crescimento dos cristais de cálcio. Assim o objetivo deste trabalho foi depositar um filme de polímero fluorado (tipo Teflon®), e um filme de carbono amorfo tipo diamante por entre as fibras de colágeno que compõem o pericárdio bovino, e com isso promover um impedimento estérico nos locais onde os cristais de cálcio poderiam se desenvolver. Para tanto, foi empregada a estratégia de deposição de polímero à base de tetrafluoreto de carbono e hidrogênio e de carbono amorfo tipo diamante por plasma. Amostras dos grupos controle, e tratados com os dois processos foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade empregando células de fibroblastos de camundongos, L929, com resultados satisfatórios. A resistência mecânica, também comparativa, foi efetuada e permitiu definir para os dois grupos tratados (polímero à base de tetrafluoreto de carbono e carbono amorfo tipo diamante) respectivamente valor de média geral correspondente a (1,0737 e 0,8565) kgf. A temperatura de encolhimento abrupto das amostras, efetuada como medida do grau de estabilização do colágeno após fixação, e foram verificados valores médios semelhantes entre os dois grupos tratados (90,3 e 90,8)°C e por sua vez superiores aos do controle. As avaliações feitas em microscopia eletrônica de varredura evidenciaram, sob aumento de 372X, superfícies de menor rugosidade para ambos os grupos tratados comparativamente ao controle, característica positiva a princípio na hemocompatibilidade dos materiais. A superfície conseguida após tratamento com tetrafluoreto de carbono mostra-se mais uniforme que aquela submetida ao tratamento com carbono amorfo tipo diamante. As medições de cálcio por absorção atômica mostram diferenças intensas entre os valores medidos para controle, grupos tratados

com tetrafluoreto de carbono e carbono amorfo tipo diamante. Os resultados obtidos a partir dos implantes subcutâneos, com tempo total de permanência de 25 dias, permitiram, após coloração de von Kossa, observar intenso contraste entre o grupo controle (com grosseiro depósito de cálcio) e grupos tratados, praticamente isentos de cálcio, eficácia funcional do tratamento, conforme já permitiam antever os resultados químicos. Ainda na coloração do tricrômio de Masson, permitiu que fosse evidenciada a integridade das fibras de colágeno, corroborando com o resultado mecânico (tração) e físico-químico (encolhimento) anteriormente apresentados. Por sua vez, os resultados da coloração Hematoxilina-Eosina, evidenciando ausência de reações que caracterizam rejeição, degradação, reabsorção ou neovascularização. Portanto, além das vantagens funcionais, os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* caracterizam a biocompatibilidade do pericárdio submetido aos tratamentos propostos. Por fim, valorizam a sua adequação, merecendo imediata consideração em aplicações clínico-cirúrgicas, com nítidas vantagens a ambos os processos propostos no aspecto de melhoria funcional. Ainda, entre ambos, evidenciam-se melhores características para o tratado por deposição de polímero à base de tetrafluoreto de carbono.

ABSTRACT

Bioprosthetic cardiac valves derived from glutaraldehyde cross-linked animal tissues, like fixed bovine pericardium, have limited therapeutic uses due to the fact that they tend to undergo a process of calcification. To prevent calcification a variety of modifications can be done to the biomaterials. One strategy is to introduce into biomaterials large molecules that can act as space-fillers, hindering the growth of calcium crystals. Plasma deposition process were used to introduce diamond like carbon and polymer from carbon tetrafluoride and hydrogen into the collagenic fibrous structure of the tissue. Samples of untreated pericardial patches (control group) and patches treated by plasma deposition of diamond-like carbon and polymer from carbon tetrafluoride were evaluated initially by *in vitro* cytotoxicity test – agar diffusion test with fibroblast cell line L929, showing satisfactory results. Tensile strength was measured and the results were (1,0737 and 0,8565) kgf respectively to tetrafluoride carbon and diamond like carbon groups. The shrinkage temperature was determined and the mean results were similar between the treated groups (90,3 and 90,8)°C, and bigger in both case than control group. The scanning electron microscopy showed at magnification 372X, smoothed surfaces to treated groups when compared to the control one. This fact is positive because increases the biomaterial haemocompatibility. Calcification was assessed by determining the calcium content of the patches using atomic absorption and revealed intensive differences between control and treated groups. From de subcutaneous explanted patches parallel assays were made in search of histopathological changes after implantation. At the von Kossa's stain it was possible to observe the intensive contrast between the groups by the gross deposition of calcium to the control group, and sparce and scarce calcification in form of dots to the treated ones. At the Masson trichrome stain it was possible to examine the integrity of collagen fibers correlating to the results of mechanical strength and shrinkage temperature. At the hematoxilin-eosin stain it was not seen characteristics reactions of rejection, degradation, resorption or neovascularization. By this way, considering the functional

advantages and the very good results obtained it is possible to characterize the biocompatibility of the treated pericardium by both process, increasing the possibility and adequacy of clinical application.

INTRODUÇÃO

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

No cotidiano diversas são as situações em que o nosso corpo (mais especificamente os seus tecidos) está sujeito a doenças e injúrias, que se não forem devidamente contidas e/ou tratadas podem levar a sofrimentos maiores, como dor, perda de função, desfiguramento, restrição da mobilidade, e até mesmo à imobilidade (WILLIAMS, 1985). Inúmeros fatores participam no estabelecimento e manutenção de um estado de equilíbrio do organismo, e neste contexto o coração tem fundamental importância, uma vez que, por bombeamento, estabelece a circulação sanguínea através de todo o organismo. Sua função de impelir o sangue é convenientemente complementada pelas válvulas, que através de mecanismo passivo de abertura e fechamento, impedem a regurgitação, estabelecendo um sentido único para o fluxo sanguíneo (STEVENS; LOWE, 1998).

Alterações no funcionamento normal em válvulas cardíacas, como a estenose ou insuficiência valvular, podem ocorrer devido a vários fatores, como febre reumática, endocardite infecciosa, displasia cardíaca congênita entre outras (LEASK; JAIN; BUTANY, 2003). O tratamento médico em enfermidades valvulares cardíacas é adotado para restaurar a função de bombeamento do coração, enquanto que o tratamento cirúrgico faz-se necessário em casos nos quais o comprometimento da função cardíaca não mostra sinais de melhora.

Embora a reparação plástica na válvula seja preferível à sua substituição, o procedimento nem sempre é possível de ser realizado, pois a cirurgia é tecnicamente mais difícil e a durabilidade dos resultados variável e dependente do estado evolutivo da doença; além disso, os resultados hemodinâmicos podem ser insatisfatórios (CHANDA; KURIBAYASHI; ABE, 1997). Outrossim, nas situações em que a função cardíaca da válvula não pode ser recuperada pela cirurgia, a mesma tem que ser removida e substituída por uma prótese.

O implante de próteses de válvulas cardíacas tem sido uma importante contribuição no campo da cirurgia cardíaca nas últimas décadas (CHANDA; KURIBAYASHI; ABE, 1997). A cirurgia para a substituição de válvula começou a ser aceita universalmente, a partir dos anos 60 estimulada por Starr e Edwards quando introduziram uma prótese de válvula cardíaca do modelo bola-gaiola em um paciente com estenose mitral e regurgitação. Paulatinamente os procedimentos, as técnicas e os dispositivos foram evoluindo, e experimentando em determinadas épocas avaliações singulares em suas performances, como por exemplo a de audibilidade (a válvula deveria ser inaudível), noticiada na década de 80 (WEILAND, 1983).

O universo das válvulas cardíacas protéticas divide-se em dois significativos grupos (BARBOSA FILHO; BARBOSA, 1999) :

- as válvulas mecânicas

Construídas com metal e/ou outros materiais sintéticos; são compostas basicamente por elementos fixos em forma de anel, que são aportados à estrutura fibrosa do coração, e por elementos móveis que através de mecanismo de abertura e fechamento do orifício de passagem do sangue, desempenham sua função, impedindo o retorno sanguíneo.

- e as válvulas biológicas

Preparadas com material biológico adequadamente tratado. Podem ser homoenxertos – a partir de válvulas aórticas de cadáveres humanos, ou heteroenxertos – a partir de outros tecidos animais, sendo o de maior utilização o pericárdio bovino previamente fixado com glutaraldeído.

A decisão sobre a válvula cardíaca a implantar no paciente não é tarefa fácil. O cirurgião deve fazer uma difícil e importante escolha entre as próteses biológicas e as mecânicas, mas não sem antes ponderar sobre

uma série de fatores individuais, dentre os quais a idade do paciente (THULIN; SJÖGREN, 2001), e o tamanho da prótese (ATIK e colaboradores, 1999).

Ambos os modelos, tanto os mecânicos como os biológicos, apresentam exemplares duráveis e funcionais, que no entanto ainda não podem ser considerados substitutos ideais, por persistirem diversas complicações, particulares a cada caso.

As válvulas mecânicas quando comparadas às biológicas apresentam como vantagem a resistência, que lhes confere longa duração. Entretanto, simultaneamente há um obstáculo a transpor: a propensão à trombose e tromboembolismo, que implicam na necessidade de terapêutica anticoagulante permanente.

A alternativa para o uso de válvulas mecânicas é o emprego de próteses biológicas, que apresentam baixo risco de tromboembolismo, não exigindo o uso continuado de anticoagulantes. Além do mais, a qualidade de vida pode ser considerada muito próxima à da vida normal, permitindo trabalhos pesados, práticas esportivas, gravidez normal e inclusive viver em áreas remotas (CHANDA; KURIBAYASHI; ABE, 1997).

A primeira consideração a ser feita a respeito do uso da bioprótese, é o ceticismo relativo à sua durabilidade, acurado pela morbidade potencial, e mortalidade relativa à degradação.

Próteses tratadas com glutaraldeído resultam em rápida calcificação e deterioração estruturais, particularmente em populações pediátricas e jovens (ATIK e colaboradores, 1999).

A longevidade e a qualidade de vida dos pacientes implantados estão grandemente relacionadas à função hemodinâmica, à durabilidade, e às

diversas complicações que podem advir da válvula utilizada (TURINA e colaboradores, 1993), como calcificação, endocardite, tromboembolismo, trombose, hemorragia, escape paravalvular, entre outras.

Lemos e Stolf (2003) articulam que "encontrar soluções para estes problemas foi e continua sendo o ânimo gerador dos esforços empreendidos, ontem e hoje, na procura da válvula definitiva".

Hipoteticamente, as próteses de válvulas cardíacas podem ainda ser delineadas e elaboradas a partir de polímeros e elastômeros, como o poliuretano, com três cúspides e com características funcionais, anatômicas e de dinâmica de fluido, idênticas às das válvulas humanas. No entanto, embora haja um grande número de polímeros candidatos, com características mecânicas e de durabilidade apropriadas, ainda não se encontrou um que possa ser aplicado com sucesso na confecção de válvulas cardíacas poliméricas, que atendesse a todos os requisitos necessários à biocompatibilidade (ALFRERIEV e colaboradores, 2001).

Cada modelo de prótese de válvula cardíaca apresenta suas vantagens e desvantagens inerentes, e uma vez que nenhum dos modelos atualmente existentes satisfaz plenamente a todos os critérios das válvulas ideais, diversos esforços têm sido despendidos no sentido de diminuir a ocorrência de disfunção das próteses valvulares, contando inclusive com o emprego de tecnologias específicas e com a exploração da engenharia de tecidos (LANGER e VACANTI, 1993), para projetar e confeccionar substitutos biológicos, destinados à reposição, manutenção ou melhoramento das funções de um tecido ou órgão.

Na busca incessante de melhorias para o material de confecção das válvulas cardíacas, muitas estratégias têm sido empregadas na tentativa de inibir ou diminuir os efeitos da calcificação; este trabalho se insere neste contexto. No entanto, alguns esquemas empregados para a fixação do

biomaterial, embora sejam eficientes no que diz respeito ao efeito anticalcificante, não fornecem produtos finais com as características desejáveis aos biomateriais, que são biocompatibilidade e funcionalidade.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

Características biológicas apropriadas, como biodegradabilidade e fraca antigenicidade caracterizam o colágeno como biomaterial de ampla aplicação. A excelente biocompatibilidade e segurança de uso que o colágeno, assim como seus derivados apresentam, fazem com que se posicionem entre os mais interessantes e versáteis (LEE; SINGLA; LEE, 2001). Seus usos são múltiplos, estendendo-se desde géis que podem ser empregados como protetores para ferimentos e queimaduras (HANKER; GIAMMARA, 1988), em procedimentos cirúrgicos para o tamponamento de lesões transfixantes (MANTOVANI; VIDAL; COCON FILHO, 1999) ou em dispositivos para a liberação controlada de drogas (FUJIOKA e colaboradores, 1998), até filmes e membranas (degradáveis ou não) para aplicações em sistemas de culturas celulares e engenharia de tecidos, assim como em reparos no sistema cardiovascular e parede do cólon (HANKER; GIAMMARA, 1988; SALLES e colaboradores, 1998).

Tal versatilidade faz com que a cada dia novas abordagens e explorações sejam investigadas. Por exemplo, a necessidade de substitutos artificiais para a pele, quer seja para o emprego como curativos ou no desenvolvimento de membranas para estudos de permeação cutânea, tem incentivado o desenvolvimento de modelos tridimensionais a partir do colágeno. Estes modelos têm como características, além de consistir em suporte à proliferação celular, o estímulo à migração e infiltração celular, propriedades desejáveis por facilitarem os processos de cicatrização (SHEU e colaboradores, 2001).

A notável diferença de textura e resistência dos biomateriais obtidos a partir do colágeno, é derivada de um processo de estabilização conhecido como fixação. Neste processo, ligações cruzadas são induzidas no colágeno, sendo o glutaraldeído o agente químico mais amplamente empregado para atingir a este objetivo. Os produtos assim obtidos apresentam, via de regra, maior força mecânica e resistência, além de

propriedades antigênicas menos intensas e menor susceptibilidade à reabsorção, na proporção direta quanto à densidade de ligações cruzadas (BERNACCA e colaboradores, 1992).

Os tecidos biológicos empregados para a produção de biopróteses são ricos em tecidos conectivos e matrizes colágenas pré-formadas. Estas, quando adequadamente submetidas a tratamento químico, podem ser empregadas para a confecção de lenços destinados a reparos do sistema cardiovascular e à confecção de biopróteses de válvulas cardíacas. Os tipos mais comuns de tecidos colágenos empregados na confecção de biopróteses são o pericárdio bovino, a *fascia lata*, a *dura mater* e a válvula aórtica porcina (KHOR, 1997).

A partir do momento de obtenção do tecido, e independentemente de sua procedência, quer seja de abatedouro ou proveniente de cadáver humano, ele passa a sofrer, de imediato, um processo natural de deterioração, uma vez que lhe faltam os elementos vitais, necessários e apropriados à subsistência. Deste modo, para que possa ser dirigido a aplicações clínicas, esta deterioração necessita ser interrompida. O processo de fixação desempenha tal tarefa, conservando a estrutura original e a integridade mecânica do biomaterial, além de eliminar ou pelo menos atenuar as propriedades antigênicas atribuídas a estes materiais (KHOR, 1997).

Há métodos físicos e químicos para o tratamento dos tecidos colágenos. Os métodos convencionalmente empregados são fundamentados na inserção de ligações químicas adicionais entre as moléculas de colágeno (JAYAKRISHNAN; JAMEELA, 1996), promovendo ligações preferencialmente entre os grupos funcionais dos aminoácidos (KHOR, 1997). Estas ligações suplementares reforçam a estrutura colágena, e quando são irreversíveis e estáveis ocasionam o surgimento de um tecido não viável e provido da necessária resistência mecânica.

Os métodos químicos de tratamento empregam habitualmente substâncias químicas bifuncionais, ou seja, aquelas que interagem com o colágeno em dois pontos diferentes. Nestes casos, os grupos funcionais dos reagentes químicos reagem com os resíduos de aminoácidos do colágeno, tais como os ϵ -aminogrupos da lisina e da hidroxiprolina, ou com o grupo carbonila dos ácidos aspártico e glutâmico, para resultar em ligações cruzadas intra e entre as moléculas de colágeno (KHOR, 1997).

Os métodos físicos incluem secagem, aquecimento ou exposição às radiações ultravioleta ou gama, e no geral promovem a formação de ligações pouco resistentes.

O glutaraldeído é o agente químico mais amplamente empregado nos processos comercialmente viáveis de tratamento dos tecidos. Foi empregado pela primeira vez na década de 60, e desde então, inúmeras variações têm sido estudadas buscando otimizar a sua eficiência. Desde sua introdução, nenhum método inovador foi capaz de substituí-lo efetivamente.

O glutaraldeído é uma molécula alifática de cinco carbonos com um aldeído em cada extremidade da cadeia, o que o faz bifuncional (Figura 1).

Figura 1: Estrutura química do glutaraldeído

No estado puro, o glutaraldeído apresenta-se sob a forma de líquido oleoso ou cristais incolores, apresentando cheiro característico. É solúvel em todas as proporções na água e no etanol, sendo que na prática é possível

encontrá-lo sob a forma de soluções aquosas contendo geralmente 25 ou 50 por cento em peso de glutaraldeído. Estas se apresentam como líquidos incolores, pouco voláteis, de reação ligeiramente ácida. O glutaraldeído é muito reativo, e pode polimerizar na presença da água, por reação de condensação, sendo esta mais rápida em meio alcalino, como são as condensações aldólicas.

As soluções aquosas de glutaraldeído consistem de uma mistura de aldeído livre, monômeros do glutaraldeído em forma mono e dihidratada e hemiacetais cíclicos polimerizados ou não (Figura 2). O glutaraldeído livre, o hemiacetal cíclico e os oligômeros mantêm-se em equilíbrio (JAYAKRISHNAN; JAMEELA, 1996).

Figura 2: Glutaraldeído livre, formas oligoméricas, e hemiacetal cíclico presentes em soluções aquosas de glutaraldeído

O grau de polimerização do glutaraldeído em solução aquosa é dependente da concentração, pH e temperatura (JAYAKRISHNAN; JAMEELA, 1996).

Figura 3: Polimerização do glutaraldeído

O glutaraldeído é capaz de interagir com aminogrupos do colágeno, e pelo fato de ser bifuncional, ele se liga a dois diferentes pontos da mesma molécula, ou de moléculas diferentes, fazendo dessa forma ligações químicas cruzadas. (Figura 4)

Figura 4: Ligações cruzadas entre os aminogrupos do colágeno por ação do glutaraldeído

As ligações cruzadas tanto intra como intermoleculares ocorrem por ligações covalentes. Estas decorrem da reação do grupo aldeído com o aminogruppo da lisina ou hidroxilisina, com a respectiva formação da base de Schiff e/ou da condensação aldólica entre aldeídos adjacentes, resultando em sua polimerização (JAYAKRISHNAN; JAMEELA, 1996).

A eficiência e extensão destas reações dependem de alguns parâmetros, como a espessura das camadas de colágeno no tecido, além da concentração do reagente, do tempo e da temperatura aos quais foram expostos, dessa forma definindo a magnitude da penetração no material. É geralmente aceito que quanto mais ligações exógenas forem geradas no biomaterial natural, maior será sua durabilidade (KHOR, 1997).

Diversos aldeídos podem ser usados para promover as ligações cruzadas das proteínas da matriz; entretanto quando comparados ao glutaraldeído, os demais são menos eficientes em produzir ligações químicas que sejam térmica e biologicamente estáveis.

Bowes e Cater (1968) estudaram a interação de uma série de aldeídos com o colágeno. Verificaram que a substituição nos aminogrupos é variável de acordo com a habilidade do aldeído em promover ligações cruzadas, interferindo portanto, com o número destas ligações introduzidas no colágeno, e conseqüentemente com a estabilidade do produto final. Os autores realizaram um estudo detalhado a respeito da interação de uma série de aldeídos com o colágeno, para obter maiores informações a respeito do mecanismo das reações envolvidas e para tentar estabelecer as razões para estas diferenças. O principal objetivo do trabalho dos autores foi comparar a reatividade de diferentes aldeídos e condições de tratamento, experimentadas em condições desfavoráveis para a ocorrência da reação, como por exemplo, excesso de aldeído, alterações de pH e períodos relativamente longos. Os resultados demonstraram que os aldeídos apresentam diferenças significativas quanto à sua reatividade com os

aminogrupos do colágeno, assim como com outros grupos da proteína. As evidências mostraram que a reação do formaldeído é completa, e embora seja muito reativo com os aminogrupos, as ligações formadas parecem ser quebradas com relativa facilidade. Os autores observaram que com os dialdeídos, a reatividade aumenta, e em alguns casos, como o do succinaldeído, o número de aminogrupos substituídos se aproxima do máximo; já com o glutaraldeído a densidade de ligações cruzadas nunca excede o valor de 26-27 mmoles dos possíveis 32-33 mmoles, mesmo quando a temperatura foi elevada e o tempo de reação prolongado. Observaram ainda vários fatores envolvidos, sendo o resultado final do número de ligações cruzadas aparentemente influenciado por características estereoquímicas, particularmente no que concerne à reatividade e eficiência do glutaraldeído e de seus oligômeros em possibilitar ligações intramoleculares do colágeno, via aminogrupos.

Roe, Milthorpe e Schindhelm (1990) avaliaram os efeitos da concentração de glutaraldeído na efetividade de ligações cruzadas e na reabsorção de colágeno proveniente de tendões de cangurus. Os autores empregaram métodos *in vitro* como a determinação da resistência à digestão por collagenase bacteriana e *in vivo* pela avaliação da biocompatibilidade e da reabsorção de implantes intramusculares em coelhos. Observaram resultados satisfatórios (não reabsorção) com concentrações de glutaraldeído iguais ou maiores que 0,05%. Concentrações menores de glutaraldeído resultaram em resistência parcial à collagenase, e reabsorção lenta.

Complementarmente os resultados de CHEUNG e colaboradores (1985) assinalam que o uso de baixas concentrações de glutaraldeído no tratamento dos tecidos é mais eficiente na promoção de ligações cruzadas do que o uso de concentrações maiores. Os autores propuseram que as altas concentrações de glutaraldeído promovem rápida formação de ligações

cruzadas na superfície do tecido, gerando uma barreira que impede ou dificulta a difusão do glutaraldeído para o interstício da fibra.

O tratamento químico dos tecidos com glutaraldeído apresenta vantagens que o tornam possível de ser explorado comercialmente, como o fato de reagir relativamente rápido, de atingir longas distâncias entre as fibras de colágeno (por conta de sua polimerização), e de ser capaz de reagir com um grande número de aminogrupos disponíveis na molécula, o que resulta em uma incidência mais consistente de ligações cruzadas (JAYAKRISHNAN; JAMEELA, 1996).

O emprego do glutaraldeído como agente de fixação auxiliou na obtenção de resultados bastante favoráveis quanto à preservação mecânica e estrutural das válvulas, resultando em alto grau de sucesso clínico. Este fato, aliado à adequação econômica, fez com que o glutaraldeído fosse eleito como agente fixador de escolha.

Após o estabelecimento do glutaraldeído como agente fixador de escolha, os problemas associados com este processo começaram gradualmente a serem conhecidos.

Uma grande desvantagem do uso do glutaraldeído é a toxicidade intrínseca devida a resíduos aldeídicos que não reagiram e que permanecem radicados na estrutura.

O procedimento adotado para a fixação das biopróteses aumenta a estabilidade mecânica pela ligação cruzada entre as fibras naturais de colágeno; este processo ocorre a um pH fisiológico, que favorece a incorporação de uma porção significativa do glutaraldeído polimerizado no interior do tecido. Estes polímeros de alto peso molecular podem a partir de uma reversão das ligações cruzadas, gradativamente se decompor.

Consistem portanto em reservatórios para a liberação lenta e continuada de aldeídos com potencial efeito tóxico (GRIMM e colaboradores, 1991).

Embora este seja um fator indesejável para a utilização do glutaraldeído, não se conhecem agentes químicos alternativos que realizem as ligações cruzadas entre as moléculas sem introduzir substâncias tóxicas nos tecidos (KHOR, 1997).

Gatti e colaboradores (1991) considerando a necessidade de conhecer melhor a toxicidade dos radicais aldeídicos livres, desenvolveram estudos nos quais pericárdios bovinos previamente fixados com glutaraldeído eram tratados com soluções de aminoácidos. O objetivo desta manobra era fazer com que os aminoácidos se ligassem aos grupos aldeídicos livres, promovendo-lhes diminuição da toxicidade. Ainda no mesmo estudo os autores (GATTI e colaboradores, 1991) empregam um novo procedimento de fixação, envolvendo a transformação dos grupos carboxila livres do colágeno em grupos acil-azida para que os mesmos reagissem com os aminogrupos livres das cadeias colágenas adjacentes. A estabilidade do material foi avaliada empregando testes físicos, e os resultados indicaram que os processos testados apresentaram resultados similares quanto à fixação, sendo aceitáveis para a manufatura de dispositivos protéticos biológicos. Entretanto, os resultados de testes biológicos evidenciaram uma diferença quanto ao tratamento químico por mecanismos acil-azídicos: a prevenção da calcificação no pericárdio.

No mesmo período, os estudos complementares foram desenvolvidos por Grimm e colaboradores (1991) complementaram o panorama, pois ao considerar a liberação contínua de glutaraldeído como fator citotóxico, sugeriram que o mesmo inibe o crescimento espontâneo de células endoteliais na superfície valvular. Os autores projetaram um estudo por tratamento complementar com ácido L-glutâmico em válvulas pré-fixadas com glutaraldeído, visando minimizar seus efeitos adversos. Conforme estes

estudos a biocompatibilidade das válvulas cardíacas previamente fixadas com glutaraldeído pode ser marcadamente aumentada pelo tratamento com ácido L-glutâmico. Houve melhora significativa na compatibilidade das células endoteliais, indicando uma bem sucedida diminuição da ação tóxica dos grupos aldeídicos na superfície do tecido. Os resultados ainda mostraram um notável decréscimo na taxa de calcificação do tecido tratado, quando comparado aos tecidos comercialmente empregados para a confecção de válvulas cardíacas.

É importante ressaltar que uma barreira a ser transposta quando do uso dos tecidos fixados com glutaraldeído é a tendência à calcificação, e conseqüentemente a degradação a médio e longo prazo. Esta é uma expressiva desvantagem destes biomateriais (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

Embora os fatores predisponentes à calcificação não sejam completamente conhecidos, várias hipóteses são levantadas para tentar explicar o fato.

A calcificação é um evento causado por um grande número de fatores, como a presença de fosfolípídeos no tecido que podem atrair os íons de cálcio, ou espaços e cavidades no tecido tratado que se criaram com a remoção de proteoglicanas durante o processo de degeneração celular. Estes fatores predispõem algumas regiões no tecido fixado por glutaraldeído a aprisionar partículas estranhas que podem iniciar a nucleação de centros de calcificação. A partir daí ocorre o aumento da captura de cálcio sob a forma de fosfato de cálcio, e a consolidação como hidroxiapatita, quando da cristalização (KHOR, 1997).

Possíveis causas da calcificação dos tecidos tratados com glutaraldeído usados na confecção de válvulas cardíacas e também de elastômeros implantáveis de uso prolongado foram referidos por Bruck (1981). Considerando que a calcificação não é um fenômeno exclusivo dos

tecidos tratados com glutaraldeído, mas que também ocorre largamente com os elastômeros sintéticos e em menor grau com polímeros não elastoméricos implantáveis, o autor apresentou uma revisão sob o ponto de vista físico químico, na qual ressalta a participação de partes flexíveis ou que estão sujeitas à movimentação e pulsos constantes, no processo de instalação da calcificação.

O papel do estresse mecânico na calcificação de biopróteses de válvulas aórticas também foi investigado por Thubrikar e colaboradores (1983) e os resultados obtidos evidenciaram que em biopróteses pericárdicas, a calcificação ocorre como múltiplos focos ao longo da zona de flexão da cúspide. Os autores localizaram focos de calcificação entre as duas camadas de colágeno paralelas ao plano da superfície da folha, ou seja, a calcificação nas biopróteses ocorre nas áreas de maior estresse mecânico. Os autores concluem que o estresse mecânico inicia a calcificação por promover danos à integridade estrutural do tecido, e tecem considerações quanto à importância que o desenho e o projeto da válvula têm neste processo, juntamente com as propriedades do tecido.

Arbustini, Jones e Ferrans (1983) em seus experimentos, nos quais implantaram em carneiros diversos modelos de biopróteses de válvulas cardíacas, formularam um mecanismo complementar aos tradicionalmente contemplados para o processo de mineralização. Através dos resultados de seus experimentos, os autores mostraram focos cartilaginosos com células transicionais semelhantes a condrócitos nas biopróteses de válvulas cardíacas implantadas. O seu crescimento e diferenciação em tecido conectivo aparentam exercer importante papel na formação de cartilagem, a partir da qual se desenvolvem nódulos de calcificação.

Klues e colaboradores (1991) apresentaram um relato de caso, que ressalta a importância da possível relação entre o cálcio da dieta obtido pelo uso freqüente de complementos nutricionais no pós-operatório, e a

calcificação das biopróteses implantadas. Em verdade, os autores (KLUES e colaboradores, 1991) resgataram um assunto outrora discutido por Carpentier e colaboradores (1982), que se referiram não somente ao cálcio da dieta, mas também a metabólitos sanguíneos, como os fosfolipídios, que atuariam como iniciadores do processo de calcificação. Assim diversos fatores, tanto relativos ao paciente, quanto os relacionados à própria peça implantada, tomam lugar neste complexo processo multifatorial que é a calcificação da bioprótese de válvula cardíaca. Nesta mesma publicação Carpentier e colaboradores (1982) ensaiaram várias técnicas adicionais à fixação por glutaraldeído com a finalidade de influenciar os iniciadores do processo de calcificação, prevenindo-o. Um artifício empregado pelos autores foi a incorporação de polímero à bioprótese sob a forma de hidrogel. Esta foi uma estratégia bastante interessante por atuar em dois iniciadores do processo de calcificação, a saber prevenindo a penetração de fosfolipídios, assim como a ligação do fosfato e do cálcio ao colágeno. Como resultados os autores obtiveram significativa redução na calcificação, sem notáveis efeitos deletérios ao tecido.

Embora muitos estudos estivessem sendo desenvolvidos no sentido de desvendar os mecanismos e implicações da calcificação, Julien e colaboradores (1997) alertaram sobre a escassez de informações disponíveis na literatura a respeito da estocagem dos tecidos bioprotéticos em glutaraldeído. Uma vez que é inevitável para quaisquer dispositivos protéticos, que permaneçam estocados por um período de tempo compreendido entre sua confecção e implantação, os autores aludiram sobre a importância de avaliar se este período, conhecido como vida de prateleira, afetaria a integridade da prótese e subseqüentemente sua performance a longo termo. Os autores conjecturaram sobre a possível polimerização que o glutaraldeído poderia vir a sofrer durante este período de estocagem. Ainda, que os produtos oligoméricos e poliméricos então formados presumivelmente reagiriam com o tecido da válvula produzindo-lhe efeitos deletérios. Assim tinham particular interesse em saber se a estrutura e as

propriedades mecânicas das cúspides da válvula, assim como a performance clínica em longo termo são dependentes destas condições de estocagem. O estudo destes autores foi realizado no sentido de determinar se o tempo e as condições de armazenamento das biopróteses de válvulas cardíacas afetam a morfologia e o comportamento mecânico das mesmas, e para tal dois parâmetros foram investigados: a temperatura de armazenamento e o período de tempo em glutaraldeído. O efeito das diferentes condições de armazenamento sobre a integridade estrutural do tecido foi obtido por análise da estrutura morfológica, do comportamento mecânico e da temperatura de desnaturação do colágeno dos tecidos valvulares. À análise por microscopia eletrônica não foram evidenciadas diferenças óbvias na morfologia da superfície quando comparadas às válvulas porcinas não tratadas. No entanto, os autores concluem que as válvulas estocadas em soluções de glutaraldeído em temperatura ambiente experimentam mudanças na estrutura, que produzem decréscimo de extensibilidade e aumento da força necessária à ruptura do tecido. Não tendo sido possível aos autores prever o impacto, após estas mudanças, na performance *in vivo* em longo prazo das válvulas, recomendaram maior investigação adotando o teste de fadiga em válvulas inteiras.

A partir da constatação da calcificação nos tecidos empregados para a confecção de biopróteses, técnicas e métodos para diminuir ou evitar este processo, e os mecanismos para seu controle e inibição têm sido o objeto de estudo de diversas equipes no mundo inteiro nas últimas décadas.

Grupos de pesquisa das mais diversas procedências buscam, por diferentes meios, diminuir ou eliminar o indesejável efeito da calcificação distrófica tardia nestes biomateriais. Estudos são realizados no sentido de melhorar a performance do material, aumentando sua resistência mecânica e diminuindo sua degradabilidade, antigenicidade e tendência à calcificação, sem produzir efeitos indesejáveis. Fato já relatado por Black, Drury e Tindale (1983) que se iniciou na década de 80, a investigação para o

desenvolvimento do substituto ideal continua sendo um desafio que tem sido enfrentado por pesquisadores das mais diversas áreas do conhecimento.

Neste contexto, Schmidt e Baier (2000) escreveram um artigo de revisão discutindo a necessidade das próteses cardiovasculares de origem natural e os potenciais tecidos naturais para sua confecção. Neste trabalho os autores discutem os tratamentos que vêm sendo desenvolvidos para estabilizar os tecidos, protegendo-os de degradação química e enzimática, ao mesmo tempo em que sejam mantidas ou melhoradas suas propriedades mecânicas naturais, especialmente no que concerne à calcificação, imunogenicidade e citotoxicidade.

Alternativamente outros pesquisadores dirigiram-se a estudos na intenção de substituir o glutaraldeído.

A estratégia óbvia seria usar um outro agente bifuncional para promover as ligações cruzadas fazendo reagir os grupos funcionais do colágeno. O uso de radicais epóxis e diisocianatos lideram essa tendência. Outra possibilidade consiste em promover reações químicas nos grupos funcionais dos aminoácidos no colágeno para gerar sítios reativos para as ligações cruzadas, sendo esta a base das reações de acil-azida e de carbodiimida. Estes métodos têm como vantagens aparentes sobre o glutaraldeído, a menor calcificação e, presumivelmente, baixa toxicidade.

KHOR e colaboradores (1972) concluíram de seus estudos que altas concentrações de dimetilsulfóxido desnaturam o tecido colágeno. O efeito que o dimetilsulfóxido promove no colágeno é uma alteração da estrutura do tecido, eliminando ou pelo menos minimizando a orientação dos pontos de atração do cálcio como a carbonila e as aminas residuais no tecido.

Jorge-Herrero, Gutiérrez e Castillo-Olivares (1991) compararam a eficiência do tratamento anticalcificante em amostras de pericárdios bovinos

implantadas em ratas após diferentes tratamentos químicos, e obtiveram resultados positivos com a remoção de lipídeos e o tratamento com alumínio. De outro lado, a extração seletiva das proteoglicanas conduziu a acúmulo considerável de sais de cálcio no tecido. Os autores consideram que no modelo experimental testado, a remoção de proteoglicanas produziu um efeito morfológico significativo, uma desestruturação do tecido, que tende a formar espaços vazios, áreas de potencial nucleação da hidroxiapatita. Esta pode ser uma explicação da calcificação em modelos circulatórios nos quais o estresse mecânico poderia gerar o mesmo efeito morfológico, que permitiria o grande acúmulo de cálcio nos espaços vazios.

Prosseguindo com a linha de tratamentos químicos alternativos ao glutaraldeído, e capazes de promover ligações cruzadas no pericárdio bovino e no colágeno, Jorge-Herrero e colaboradores (1999) estudaram a influência destes tratamentos nas propriedades do biomaterial. Produtos como difenilfosforilazida (DPPA) e etildimetilaminopropilcarbodiimida (EDAC) foram empregados como agentes de ligações cruzadas na matriz de colágeno bovino. O mecanismo de ação envolvido está baseado na ativação dos grupos carboxila, que então permitem suas ligações cruzadas com os aminogrupos. Como controle empregaram o tratamento convencional com glutaraldeído, sendo o mesmo aplicado tanto ao pericárdio bovino como também em membranas colágenas produzidas a partir de pericárdio bovino. Neste experimento, os autores avaliaram os efeitos do tratamento químico quanto à resistência frente à degradação pela collagenase e quanto à incorporação de cálcio.

Yoshioka e colaboradores (1999) estudaram a fixação (os autores usam o termo reticulação) de pericárdios bovinos tratados com acetais de glutaraldeído. Os autores consideram que a reticulação com o uso de glutaraldeído não é homogênea em tecidos ricos em colágeno, pois dois fatores interferem no processo: a natureza complexa do glutaraldeído na forma de solução aquosa e a reticulação rápida induzindo a uma

impermeabilização superficial nos tecidos colagênicos, impedindo reação mais homogênea do reagente com os tecidos. Tomando por base estes princípios, o objetivo do trabalho foi estudar a performance hidrodinâmica da bioprótese valvular cardíaca manufaturada com pericárdio bovino tratado com o novo processo químico de reticulação com acetais do glutaraldeído. Segundo os autores, o glutaraldeído na forma de acetais corresponde estruturalmente a uma forma quimicamente protegida da função aldeídica, que pode ser ativada rapidamente pela adição de base. Nesta forma protegida, a reatividade do glutaraldeído pode ser facilmente controlada, permitindo ao reagente uma difusão mais homogênea no interior da matriz, introduzindo portanto ligações de reticulação melhor definidas e com uma distribuição mais homogênea no interior da matriz. Com este procedimento efeitos de impermeabilização observados em matrizes colagenicas tratadas com glutaraldeído pelo método convencional seriam minimizados, e provavelmente ocorreria também a uma redução dos efeitos citotóxicos observados em função da menor densidade de reticulações poliméricas, responsáveis pela liberação gradual do glutaraldeído pós-implante. Resultados frente à colagenase mostraram que materiais derivados de pericárdio bovino obtidos por este processo foram biologicamente mais estáveis em comparação àqueles obtidos pelo método convencional. Ainda os resultados preliminares da performance hidrodinâmica mostraram que o tratamento alternativo de matrizes ricas em colágeno com os acetais de glutaraldeído pode ser potencialmente interessante para a obtenção destes tipos de válvulas, principalmente levando-se em conta a maior homogeneidade da reação de reticulação.

A partir do fato de que o colágeno possui poucos resíduos de cisteína e/ou cistina e reconhecendo o importante papel das ligações dissulfeto na estabilização de moléculas protéicas, a ponto de torná-las resistentes a condições ambientais instáveis, Nicolas e Gagnieu (1997) estudaram métodos para inserir novos grupos tiólicos na estrutura do colágeno e de seus derivados (como a gelatina). Estes grupos tiólicos quando oxidados

podem ser facilmente transformados em ligações dissulfeto, incrementando a possibilidade de ocorrência de ligações cruzadas com o colágeno. Ao se controlar a densidade e natureza das funções tiólicas na molécula, uma grande variedade de estruturas protéicas modificadas podem ser conseguidas, com diferentes propriedades desejáveis para a elaboração de biomateriais à base de colágeno.

Em linha de pesquisa semelhante e complementar à de Nicolas e Gagnieu (1997), Yamauchi e colaboradores (2001) relataram um novo material que tem por base o colágeno quimicamente modificado pela 4-butirotiolactona para fornecer o colágeno com grupo mercapto (colágeno SH), cuja maior característica é a fácil formação das ligações dissulfeto pelo oxigênio dissolvido em água, mostrando ser um bom método para a obtenção de ligações cruzadas. O filme feito de colágeno tiolado (colágeno SS) exibiu resistência à tração maior que 36 MPa e foi insolúvel na maioria dos solventes, inclusive a água. O filme de colágeno SS foi mais resistente à degradação pela collagenase que o filme normal de colágeno, e ainda, suportou o crescimento de fibroblastos L929, de forma similar ao filme de colágeno. Tais características revelam-se de grande interesse para o seu aproveitamento na elaboração de biopróteses vasculares e/ou confecção de válvulas cardíacas protéticas.

Ogle e colaboradores (2003) ponderaram sobre o pré-tratamento com etanol como inibidor da calcificação das cúspides das válvulas aórticas porcinas previamente fixadas com glutaraldeído. Os autores consideraram que este mecanismo de inibição da calcificação distrófica está relacionado com a extração dos lipídeos e alteração da estrutura do colágeno no biomaterial. No entanto seus efeitos não puderam ser observados nas paredes da aorta, que apresentaram melhor resposta anticalcificante quando submetidas ao pré-tratamento com cloreto de alumínio. Os mecanismos desta inibição estão relacionados com a prevenção da calcificação da elastina e redução da atividade local da fosfatase alcalina. Neste estudo os

autores investigaram o tratamento combinado de etanol e cloreto de alumínio para a prevenção, tanto da mineralização da cúspide, como da parede da aorta em biopróteses de implantes porcinos. Assim, elaboraram a hipótese de que o uso combinado do etanol com o cloreto de alumínio poderia inibir ambas as formas de calcificação. Os resultados evidenciam que o tratamento duplo proposto é eficiente. Todavia puderam notar que ao empregar modelos animais diferentes para a avaliação da calcificação, as respostas foram significativamente distintas. Os resultados obtidos quando da implantação em sistema circulatório em carneiro foram desiguais a outros obtidos empregando delineamento por implantes subcutâneos em ratos.

Outra abordagem foi descrita por Suh e colaboradores (2000) que desenvolveram um trabalho cujos resultados suportam a hipótese de que o agente de ligações cruzadas, o glutaraldeído, estabiliza e talvez até modifique as estruturas calcificáveis ricas em fósforo. Em seus estudos, amostras previamente tratadas com glutaraldeído (grupo controle) foram confrontadas com amostras submetidas à radiação ultravioleta por 24 horas, e os resultados da calcificação por método *in vitro* após três dias de incubação foram significativamente maiores no grupo controle que no grupo irradiado por luz ultravioleta ($257,6 \pm 57,7$) $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ e ($57,7 \pm 23,5$) $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, respectivamente. Os autores discutem que a rápida deposição de cálcio em valvas tratadas por glutaraldeído pode ser devida aos grupos aldeídicos residuais após o pré-tratamento. Discutem ainda que o tempo de exposição à luz ultravioleta não está significativamente correlacionado com a extensão da calcificação, e concluem que o procedimento de irradiação com ultravioleta pode ser considerado um método eficiente para promover ligações cruzadas, capaz de superar os efeitos induzidos pelo pré-tratamento com glutaraldeído, além de dotá-lo de adequadas propriedades mecânicas.

Na busca por um método de promover ligações cruzadas que não apresentasse os inconvenientes do glutaraldeído, Suh e Park (2000)

empregaram a radiação ultravioleta para promover as ligações cruzadas no material colágeno sem a introdução de produtos químicos tóxicos, esperando assim, que as fibras guardassem a estrutura nativa e exibissem resistência aceitável à protease inespecífica *in vivo*. Como resultado observaram uma deposição de cálcio significativamente menor nas válvulas tratadas com radiação ultravioleta que nas outras, tratadas com glutaraldeído.

Ainda outras estratégias foram empregadas na tentativa de controlar a calcificação. Nimni e colaboradores (1990) na busca para a solução de vários problemas relatados durante o acompanhamento de pacientes com implantes derivados do colágeno, como a infiltração fibrótica, degeneração da matriz, calcificação, entre outros, experimentaram um novo método de tratamento do tecido, baseado na reação por ligação covalente de difosfonatos ao mesmo. Os autores indicam que esta mesma tecnologia é correntemente empregada com vários graus de sucesso para outros materiais protéticos, tais como pele, tendões, ligamentos, lenços pericárdicos, tecidos vasculares e implantes colágenos. Os autores testaram tecidos com diferentes conteúdos de colágeno, eslatina, e proteoglicanas, tendo observado menores níveis de calcificação.

Golomb, Lewinstein e Ezra (1992) estudaram modificações em biopróteses de válvulas cardíacas por reação com sulfato de protamina. Como resultado, observaram que ocorrem ligações covalentes estáveis da protamina ao tecido, conferindo-lhe resistência à calcificação. Observaram ainda que o tecido tratado com protamina apresentou valor de resistência mecânica e temperatura de desnaturação maiores que o grupo controle, submetido ao cloreto de sódio, indicando a ocorrência de eventos que afetam a desnaturação e estabilidade do tecido.

Chanda, Kuribayashi e Abe (1997) baseados no fato de que o tratamento complementar ao glutaraldeído com aminocompostos é eficiente

na prevenção da calcificação de válvulas porcinas, propuseram com sucesso o acoplamento da heparina ao tecido.

Jee e colaboradores (2003) desenvolveram por sua vez um novo método de modificação química de tecidos para biopróteses usando L-arginina. Os autores propuseram o acoplamento direto de uma molécula bioativa, a L-arginina ao pericárdio bovino. A modificação envolve pré-tratamento do pericárdio bovino usando o glutaraldeído e em seguida o enxerto de arginina ao pericárdio através da reação do aldeído residual e do aminogruppo da L-arginina. O material resultante foi avaliado com relação à calcificação e à biocompatibilidade tanto por métodos *in vitro* como por métodos *in vivo*. Os resultados obtidos atestam condições para o uso pleno do pericárdio tratado com L-arginina para a confecção de biopróteses cardiovasculares.

O ácido 2-amino-oléico foi empregado como agente anticalcificante em próteses de válvulas porcinas, processadas e implantadas por Gott e colaboradores (1992), empregando como modelo experimental carneiros jovens. Como resultados os autores encontraram calcificação maciça nas peças do grupo controle, não tratado, com conteúdo médio de cálcio em torno de 129 mg de cálcio por grama de tecido seco, e substancial redução da calcificação no grupo em estudo, com conteúdo médio de cálcio de 7,7 mg de cálcio por grama de tecido seco.

Empregando a estratégia de adição de grupos volumosos, Lee e colaboradores (2000) promoveram a heparinização do pericárdio bovino previamente tratado com glutaraldeído. Os autores buscaram uma nova modificação química no tecido biológico através do acoplamento direto de heparina ao mesmo, por reação entre seu aminogruppo e o aldeído residual. O efeito do acoplamento da heparina foi avaliado *in vitro* e *in vivo*, sendo o produto obtido caracterizado por temperatura de desnaturação, propriedades mecânicas, resistência à digestão por collagenase, citotoxicidade *in vitro* e

calcificação *in vivo*. Os parâmetros avaliados mostraram que a resistência à colagenase e a durabilidade do tecido tratado com heparina é maior se comparada com o tecido fresco e com o tecido tratado somente com glutaraldeído. O tecido heparinizado mostrou ainda ausência de citotoxicidade quando comparado ao tecido tratado com glutaraldeído, devido à liberação de glutaraldeído deste último. O estudo de calcificação *in vivo* demonstrou muito menor deposição de cálcio no tecido tratado com heparina que no tratado com glutaraldeído, e os autores concluíram, de acordo com os resultados obtidos, que o tecido heparinizado pode ser plenamente utilizado para biopróteses cardiovasculares.

O desenvolvimento de um conduto valvulado flexível foi efetuado por Noishiki e colaboradores (1993) a partir da jugular externa de bois que continham uma válvula nativa natural, nas quais foram promovidas ligações cruzadas por ação do diglicidileter e incorporação de heparina. Os autores avaliaram o experimento mais especificamente o implante em animais (cachorros) com um sistema de *doppler* colorido, revelando boa flexibilidade das valvas no pós-operatório; a temperatura de desnaturação também foi avaliada. Como resultado o exame histológico dos condutos explantados não revelaram sinais de calcificação ou degeneração, e os parâmetros bioquímicos avaliados mostraram através da temperatura de desnaturação que a fixação por diglicidileter promoveu adequada estabilidade ao novo biomaterial pelo período estudado, cerca de 5 meses.

O emprego de materiais mistos e de polímeros sintéticos na confecção de biopróteses implantáveis é uma realidade crescente. Pinto, Saito e Glerean (1993) compararam a avaliação da biocompatibilidade do pericárdio bovino, produto biológico mais amplamente empregado na produção das próteses de válvulas cardíacas, e o tricô de Dacron®, de origem sintética. Os autores empregaram estudos experimentais *in vivo*, com a implantação subcutânea de fragmentos em ratos, e estudos experimentais *in vitro*, pelo uso do teste de citotoxicidade em culturas celulares. Os

resultados obtidos revelaram perfeita biocompatibilidade para o biomaterial de origem sintética e um intenso grau de toxicidade para os pericárdios bovinos previamente fixados, sendo esta toxicidade associada ao agente esterilizante e de manutenção da válvula, o formaldeído. Os autores concluem ressaltando a importância e necessidade de aperfeiçoamento e otimização da técnica de lavagem da prótese biológica antes da implantação nos pacientes.

Sung e colaboradores (1996) desenvolveram uma membrana biológica tratada com epóxi e a seguir com heparina, em substituição ao pericárdio. O estudo foi realizado para avaliar as características das ligações cruzadas deste novo material, comparando-o com o pericárdio sem tratamento e com o pericárdio previamente fixado com glutaraldeído. Este biomaterial foi testado como possível substituto ao pericárdio, empregando o cão como modelo animal. No estudo foi observado que a coloração do tecido biológico fixado com epóxi permaneceu similar à do pericárdio nativo, e mais flexível que o pericárdio fixado com glutaraldeído. Ainda ambos tanto o tecido fixado com epóxi como o fixado com glutaraldeído apresentaram significantes aumentos na temperatura de desnaturação quando comparados ao tecido fresco. O estudo experimental evidenciou que o acoplamento da heparina diminuiu significativamente a formação de adesões à superfície do material implantado, quando comparado com os demais correntemente empregados na prática clínica.

Chandy e colaboradores (2000) buscando um material não trombogênico apropriado para o uso em enxertos vasculares de pequeno diâmetro realizaram um trabalho para examinar se a modificação de superfície do Teflon® e do Dacron® poderia aumentar sua biocompatibilidade sem alterar sua estrutura. Uma série de camadas de colágeno e laminina foram depositadas na superfície de Teflon® e Dacron® previamente tratados por ação do plasma de argônio. Sobre essas coberturas foram imobilizadas moléculas bioativas como heparina ou fosfatidil colina, via funções

carbodiimida. Os estudos *in vitro* mostraram que a adsorção de fibrinogênio e a adesão plaquetária nos implantes tratados foram significativamente diminuídas. Este estudo propõe que a inserção de componentes na superfície da matriz e subsequente a imobilização de moléculas bioativas mudaram a condição da superfície, condicionando os implantes vasculares e subsequente aumentando sua biocompatibilidade.

Do emprego da tecnologia de ligações cruzadas inicialmente empregada para a estabilização do tecido e controle da calcificação, derivou uma nova utilização. Kuijpers e colaboradores (2000) a empregaram com o intuito de reduzir as consequências da endocardite pós-implante de válvulas cardíacas. Os autores aludem sobre a possibilidade de se reduzir a endocardite pela liberação local de proteínas antibacterianas a partir do anel costurado de Dacron® de uma válvula cardíaca protética. Assim, discos de Dacron® foram tratados com plasma de dióxido de carbono para promover a hidrofiliabilidade e ainda permitir a impregnação homogênea com gelatina. A gelatina empregada foi submetida a ligação cruzada em diferentes graus usando várias quantidades de carbodiimidas solúveis em água e N-hidroxissuccinimida. Sobre a gelatina, foi agregada a lisozima, uma proteína modelo para atividades antimicrobianas. A liberação *in vivo* do lisozima foi medida após implante das amostras no subcutâneo de ratos, e os resultados favoráveis.

Embora vários métodos e técnicas tenham sido testadas, algumas delas com relativo grau de sucesso, a experimentação com outros materiais diferentes do pericárdio bovino também vem sendo desenvolvida.

Owen e colaboradores (1997) consideram que os efeitos do tratamento com glutaraldeído em biomateriais, investigados em vários modelos animais, conduzem a complicações que compreendem mudanças degenerativas, quebra do colágeno e calcificação, ainda não completamente eliminadas. Os autores demonstraram em estudo experimental, que uma

camada específica do intestino delgado, a submucosa, pode servir com sucesso para reposição arterial ou venosa e ajudar na reconstrução de paredes do corpo, tendões e ligamentos, e reparos na bexiga urinária. Este material quando usado como um autoenxerto, homoenxerto ou heteroenxerto suporta rapidamente o crescimento celular e, aparentemente, a diferenciação celular, resultando em uma estrutura que é morfológicamente similar ao tecido hospedeiro. A submucosa é reabsorvida após quatro meses de implantação, deixando no lugar a nova estrutura de tecido. Como grande vantagem, não são necessárias modificações químicas para reduzir a resposta imunológica ou para aumentar a performance do implante. Além disso, a avaliação histológica de estudos nos quais procedeu-se ao implante em intestinos, além de outras aplicações, não revelaram a evidência de calcificação no local do implante, embora não tenha sido feita uma análise específica para avaliar a extensão deste processo. O propósito do trabalho foi avaliar o potencial de calcificação de submucosas tratadas (visando a descontaminação) com glutaraldeído e com ácido peracético, comparativamente com aquele promovido pelos tecidos comercialmente disponíveis, preservados pelo tratamento com glutaraldeído. Os autores empregaram no estudo modelo experimental de implantação subcutânea em ratos.

Polímeros sintéticos como o poliuretano também foram e são empregados para a construção de materiais implantáveis. A calcificação em implantes cardiovasculares de poliuretano foi revista por Alfreriev e colaboradores (2001) como sendo um importante processo que pode comprometer em longo prazo a função dos dispositivos implantados, tais como válvulas cardíacas poliméricas e sistemas de assistência ventricular. Neste estudo os autores, tomando por base a atividade farmacológica do bifosfonato imobilizado, relatam a formulação bem sucedida e caracterização de poliuretanos derivados bifosfonados, lançando a hipótese de que resistem à calcificação. Os bifosfonatos são fármacos com potentes efeitos, bem estabelecidos na modulação da mineralização. Poliuretanos totalmente

polimerizados foram modificados por bromoalquilação, efetuando-se em seguida a ancoragem de um grupo bifosfonato no local da bromina. Estes poliuretanos bifosfonatados resistiram à calcificação em implantes em ratos por 60 dias quando comparados com um grupo controle, não tratado, que calcificou.

Em próteses vasculares sintéticas comuns, pode ocorrer coagulação do sangue em sua superfície luminal, e formação de um trombo membranoso a partir do processo de cicatrização de um corte, iniciando uma pseudointima que poderia servir como um conduto para o sangue. Assim, as próteses vasculares de pequeno diâmetro podem ser rapidamente obstruídas pelo trombo inicial e portanto, não foram desenvolvidas até o momento próteses vasculares de pequeno diâmetro clinicamente aplicáveis. Yoneyama e colaboradores (2002) desenvolveram estudo com o propósito de confeccionar uma prótese de pequeno diâmetro, clinicamente aplicável, baseada no novo conceito do polímero de 2-metacrilóiloxietilfosforilcolina (MPC), que se assemelha à estrutura de uma membrana celular externa, similar ao modelo do mosaico fluido e que se caracteriza por excelente antitrombogenicidade. Os resultados obtidos demonstraram que a prótese vascular contendo MPC pode ser aplicada como uma prótese de pequeno diâmetro por causa de suas características antitrombogênicas e por não propiciar a formação de pseudoíntima.

Tendências futuras no campo de desenvolvimento de biomateriais implantáveis apontam para a agregação de tecnologias e conhecimentos no sentido de desenvolver dispositivos feitos de materiais reconhecidamente estáveis com revestimentos que agregam propriedades à sua superfície. Tais revestimentos devem ser não somente biocompatíveis, mas também bioativos, de modo a promover as interações adequadas na cobertura do tecido, a depender da aplicação do implante. Como exemplo existem as coberturas de hidroxiapatita, que podem promover a ancoragem e

crescimento de tecido ósseo, aumentando sua estabilidade a longo termo e a integridade do implante.

Os filmes de carbono amorfo depositados sobre a superfície de metais têm sido estudados como possíveis candidatos para aplicações biológicas, pelo fato de serem inertes e compostos por elementos naturalmente presentes no organismo humano. Rodil e colaboradores (2003) realizaram estudos comparativos da resposta biológica de revestimentos de carbono amorfo tipo diamante, também conhecidos como *Diamond Like Carbon* (DLC) em superfícies de aço inoxidável. Os testes biológicos com filmes de carbono e hidrogênio têm demonstrado que este material caracteriza-se por boa biotolerância, que é eficiente contra a corrosão e metalose nos fluidos biológicos, não é citotóxico e é apropriado para aplicações nas interfaces em contato com sangue, pois inibem a formação de trombos e evidenciam uma boa biointegração na cavidade oral.

Nos últimos 40 anos diferentes materiais para a substituição de tecidos cardiovasculares têm sido pesquisados, e apesar das diversas tentativas de diminuir ou eliminar as complicações tardias de seu uso, o biomaterial ideal ainda não foi conseguido. Os dados publicados pelos autores nem sempre podem ser correlacionados, pois as condições experimentais são muito diversificadas, proporcionando uma natural dissociação na interpretação dos resultados.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Principal

O presente trabalho tem como objetivo principal a comparação da eficiência de dois tratamentos anticalcificantes complementares ao tratamento químico habitualmente empregado no pericárdio bovino destinado à confecção de biopróteses de válvulas cardíacas.

Secundários

Para avaliar a segurança da aplicação destes tratamentos ao pericárdio bovino, deverão ser avaliadas características de biocompatibilidade e funcionalidade do biomaterial resultante, através de testes físicos, químicos e biológicos, tais como a medida de resistência mecânica, a verificação da incorporação de cálcio, a avaliação in vitro da citotoxicidade e o estudo histopatológico do material explantado.

MATERIAL E MÉTODOS

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
Universidade de São Paulo

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O material de estudo consistiu de peças de pericárdio bovino, medindo cerca de (120 x 80 x 3) mm, gentilmente cedidas pela empresa Biocardio Indústria, Comércio e Representação de Produtos Médicos, Hospitalares e Correlatos, Ltda., produtora de próteses biológicas. Para cada grupo estudado foram empregadas três peças de pericárdio, perfazendo área de cerca de 30 cm². No total nove peças foram empregadas.

As peças de pericárdio utilizadas haviam sido submetidas a tratamento prévio conforme o seguinte procedimento: os pericárdios foram coletados imediatamente após o abate dos animais em estabelecimento frigorífico submetido à fiscalização do Departamento de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura e Departamento de Vigilância Sanitária da Secretaria de Saúde Estadual, e submetidos a um procedimento inicial de limpeza, para a retirada do tecido adiposo peri-pericárdico; em seguida, foram selecionadas as unidades com espessura e homogeneidade similares, e estendidas em suportes ovais plásticos com medidas de (15 x 12) cm; os pericárdios então presos aos suportes foram mergulhados em solução aquosa de glutaraldeído a 0,5%, tamponada a pH 7,4, para a ação fixadora do glutaraldeído e mantidos a 4°C e ao abrigo da luz por 10 dias, com trocas da solução após 24 e 72 horas. Após o período de fixação, os pericárdios bovinos foram retirados dos suportes e lavados em solução de cloreto de sódio a 0,9% (quatro trocas sucessivas) em temperatura ambiente, sob agitação contínua por 24 horas, com o intuito de remover o residual de glutaraldeído que não reagiu, e conservados até o momento de uso em solução de formaldeído a 4%.

4.2 Métodos

4.2.1 Planejamento estatístico

De acordo com as preconizações da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEEAF/FCF) no tocante à utilização de animais de experimentação, e no intuito de eliminar o sacrifício desnecessário de animais, foram realizados ensaios preliminares com um número reduzido dos mesmos, para a determinação de incorporação de cálcio em peças implantadas. Os resultados assim obtidos foram empregados para realizar o teste de hipóteses, e determinar o tamanho de amostra necessário para detectar a diferença entre os grupos Controle e Teste. Foram realizados cálculos de tamanho de amostras para as potências de teste 0,75, 0,80 e 0,90, cujos resultados indicaram que pela utilização de grupos com 12 animais, é possível ter limite de confiança de 90% nos resultados. Este delineamento foi submetido à apreciação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEEAF/FCF), e aprovado.

4.2.2 Tratamento de superfície – aplicação de Tetrafluoreto de Carbono

O tratamento de superfície do pericárdio foi realizado em conjunto com o Laboratório de Sistemas Integráveis do Departamento de Engenharia e de Sistemas Eletrônicos da Escola Politécnica da USP, utilizando um sistema de Deposição Química à Vapor Enriquecido com Plasma (*Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition*) para a deposição de um filme de polímero fluorado (tipo Teflon®). Como substrato base para a deposição do polímero de tetrafluoreto de carbono foram empregadas 3 membranas de pericárdio bovino previamente tratadas com glutaraldeído. Cada uma das

amostras foi processada em um ciclo independente. Os processamentos ocorreram em um sistema planar de plasma, utilizando como gases de processo o CF_4 (tetrafluoreto de carbono) e o hidrogênio. As amostras foram carregadas no reator e a câmara evacuada a 10^{-3} Torr; a câmara foi pressurizada com os gases de processo, 50% de CF_4 e 50% de hidrogênio à pressão de 1 Torr; o plasma foi gerado por aplicação de radiofrequência aos 13,56 MHz, e mantido por 2 minutos. Após o tempo de processamento, houve o encerramento do plasma e evacuação dos gases reativos; a câmara foi então pressurizada com nitrogênio até pressão atmosférica. As amostras foram retiradas da câmara e imediatamente mergulhadas em solução fisiológica estéril para hidratação, e submetidas às avaliações 4.2.4, 4.2.5, 4.2.6, 4.2.7, 4.2.8, 4.2.9 e 4.2.10. Os resultados obtidos foram indicados como T1, T2 e T3, respectivamente, correspondendo a cada uma das amostras obtidas.

4.2.3 Tratamento de superfície – aplicação de Carbono Amorfo tipo Diamante (DLC)

Além do sistema de deposição utilizado acima, foi também empregado um sistema de deposição química a vapor com plasma de alta densidade (*High Density Plasma Chemical Vapor Deposition*) para a deposição de filmes de carbono amorfo tipo diamante (*diamond-like carbon* - DLC) sobre os pericárdios. Esse sistema de deposição possui um acoplamento de plasma indutivo com uma bobina planar com eletrodo de campo como fonte de plasma, que possibilita a obtenção de plasmas com altas densidades. Para a deposição dos filmes de DLC, foi utilizado o gás metano puro (CH_4) sob pressão de processo de 3,3 mTorr deste gás. Foram feitos três processos diferentes para a deposição de DLC sobre os pericárdios: o primeiro processo (cujos resultados estão indicados como D1) foi feito com 200 W de potência aplicada à bobina planar, 100 W de potência aplicada ao eletrodo, tempo de deposição de 5 minutos e vazão de metano

de 40 sccm; o segundo processo (cujos resultados estão indicados como D2), foi feito com 200 W de potência aplicada à bobina planar, 100 W de potência aplicada ao eletrodo, tempo de deposição de 5 minutos e vazão de metano de 93 sccm; e o terceiro processo (cujos resultados estão indicados como D3), foi feito com 200 W de potência aplicada à bobina planar, 0 W de potência aplicada ao eletrodo (plasma remoto), tempo de deposição de 2 minutos e vazão de metano de 93 sccm. Os filmes de DLC depositados com esses processos apresentam uma característica de 50% de ligações referentes ao grafite e 50% de ligações referentes ao diamante (caracterizados por análise de micro-Raman e FTIR (Fourier Transformed Infra-Red Spectroscopy)).

4.2.4 Avaliação da citotoxicidade – teste *in vitro*

Para a avaliação da citotoxicidade *in vitro*, foi empregado o método de difusão em camada de ágar sobre monocamada celular. Para a realização do teste foram empregadas as linhagens celulares NCTC clone 929 (ATCC-CCL 1) correspondente a células fibroblásticas de camundongo provenientes do *American Type Culture Collection*.

Em ensaios triplicados, os testes foram realizados empregando técnicas assépticas, fazendo-se uso de luvas, toucas, aventais e máscaras cirúrgicas estéreis, sendo o trabalho desenvolvido em câmara asséptica, com recurso de pressão positiva e provida de sistema de filtro absoluto. A câmara e antecâmara eram em alvenaria, com piso em granilite, cantos arredondados, dispondo a câmara de bancadas de trabalho em aço inoxidável.

As células foram cultivadas em garrafas de Roux contendo meio mínimo de Eagle com 10% de soro fetal bovino inativado, em estufa a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, por 48 horas. Para a preparação do meio de Eagle empregou-se

água destilada, posteriormente submetida à purificação em aparelho Milli-Q Plus®. A adição do soro fetal bovino ocorreu após sua inativação a 56°C por 1 hora. O meio contendo o soro sofreu esterilização por filtração através de membranas de porosidade de 1,2µm; 0,8µm; 0,45µm e 0,22µm, consecutivamente, precedidas por um pré-filtro.

Após o descarte do meio de crescimento, as células cultivadas em garrafas de Roux foram dispersas utilizando uma associação de tripsina 0,20% e versene a 0,02% e suspensas no mesmo meio de cultura, sendo que desta suspensão foram pipetados, para as placas de Petri descartáveis de 60 mm de diâmetro, um volume de 5 mL contendo cerca de 105 células/mL de meio. As placas foram incubadas a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, por 48 horas em estufa com ambiente de CO_2 a 5%.

Após a formação do tapete celular avaliou-se microscopicamente a morfologia das células para confirmar suas características, descartou-se o meio de crescimento, que foi substituído por meio sólido de manutenção constituído de partes iguais do meio de Eagle duas vezes concentrado, sem soro fetal bovino, e de uma solução de ágar a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro. A fusão do ágar em solução aquosa do indicador precedeu a mistura das partes constituintes do meio de manutenção e foi feita no momento do uso, estando ambos a uma temperatura de 44°C. Após homogeneização um volume de 5 mL do meio contendo ágar foi adicionado sobre a camada de células.

Imediatamente após a solidificação à temperatura ambiente procedeu-se ao depósito, em cada placa, de um pedaço de amostra de cerca de 0,5 cm². As placas, contendo amostras e controles, foram novamente incubadas a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ em ambiente de 5% de CO_2 , por 24 horas. Para cada amostra foram preparadas 6 placas e os controles positivo e negativo, constituíam-se de solução de hidróxido de sódio 1N e

solução fisiológica obtida quando da preparação dos extratos, respectivamente.

A avaliação da toxicidade das amostras foi feita macroscopicamente pela medição do halo formado ao redor da amostra e microscopicamente pela coloração e morfologia celulares, com a observação de formação de grânulos intra-citoplasmáticos, arredondamento ou lise celular. A graduação das reações foi feita obedecendo ao descrito na Farmacopéia Americana 26ª edição, onde de acordo com o diâmetro do halo formado é atribuída uma pontuação: grau 0 para ausência de halo e lesões celulares embaixo ou ao redor da amostra, grau 1 para presença de células lesadas sob a amostra, grau 2 para halo de 0,5 cm, grau 3 para halo variando entre 0,5 cm e 1,0 cm e grau 4 para halo maior que 1,0 cm.

As fotomicrografias foram efetuadas em microscópio óptico marca ZEISS, modelo AXIOSKOP com máquina fotográfica acoplada.

4.2.5 Teste de resistência mecânica – tração

Medidas de resistência mecânica foram realizadas em amostras de cada grupo. Para a execução do teste, tiras de (2,0 x 0,5) cm foram recortadas a partir das amostras, imersas em solução de cloreto de sódio a 0,9% a 37°C para condicionamento, e submetidas ao ensaio de tração em equipamento INSTRON modelo 1115, para determinação da tensão máxima à tração.

4.2.6 Determinação da temperatura de encolhimento

Também denominada temperatura de desnaturação, foi efetuada como medida do grau de estabilização do colágeno após fixação, sendo

determinada a partir da temperatura de encolhimento abrupto das amostras. Para a execução do teste, tiras de (3,0 x 1,0) cm foram recortadas a partir das amostras, e montadas em equipamento adaptado para a realização do teste, de modo que estas tiras ficassem imersas em solução de cloreto de sódio a 0,9% à temperatura ambiente com uma de suas extremidades fixada e outra submetida a uma tração de 0,5 g. A temperatura do líquido de imersão (solução salina) foi progressivamente elevada, à proporção de 4°C por minuto, e simultaneamente monitorada, até observação da ocorrência de encolhimento abrupto, representativo da desnaturação do colágeno.

4.2.7 Microscopia eletrônica de varredura

Devido à natureza orgânica do pericárdio e do polímero depositado a plasma, as peças foram submetidas a uma secagem a vácuo tomando os cuidados necessários para prevenir o enrugamento. Sobre elas uma fina camada de ouro foi depositada a plasma de argônio por três minutos a 200 mTorr, para facilitar a condução de cargas elétricas das peças, então examinadas, em aumentos diversos, ao microscópio eletrônico Philips SEM-515, provido de câmara fotográfica.

4.2.8 Implante do biomaterial obtido em animais de experimentação

Os animais empregados para a experimentação foram ratos Wistar provenientes do Biotério de Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da Universidade de São Paulo, recém desmamados, com cerca de três semanas ou aproximadamente 50 gramas de peso. Para o procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados por administração intra-peritoneal de quetamina em dose 25 mg/kg de peso e xilasina em dose 10 mg/kg de peso. Ao se constatar o estado hipnótico, os animais foram tricotomizados no dorso, e feita a antisepsia com

antisséptico à base de iodopovidona. Efetuou-se o procedimento empregando campos cirúrgicos, instrumentais e materiais auxiliares previamente esterilizados. Foi feita uma incisão longitudinal no dorso dos animais e dissecção de quatro lojas subcutâneas em cada animal para a aplicação das amostras, de forma que em cada um foram implantados tanto fragmentos de pericárdio controle como fragmentos de pericárdios tratados, conforme esquema apresentado pela Figura 5.

Figura 5: Representação esquemática dos posicionamentos dos implantes nas lojas subcutâneas abrangendo controle (C), carbono amorfo tipo diamante (D) e polímero à base de tetrafluoreto de carbono (F).

Após o posicionamento das amostras os animais foram suturados com pontos simples e descontínuos empregando fio cirúrgico tipo “catgut” simples, número zero, absorvível e estéril.

Após a cirurgia os animais foram dispostos em gaiolas isoladas e estiveram sob observação até plena recuperação, enquanto mantidos em

regime alimentar *ad libitum*, conservando-se esta condição até o sacrifício dos animais.

Nos primeiros dez dias após o procedimento cirúrgico, a evolução dos animais foi acompanhada por observações diárias, e em seguida, a evolução foi monitorada com verificações duas vezes por semana, observando-se o comportamento dos animais, o ganho de peso e o consumo de alimentos e água. Os animais foram mantidos durante 25 dias.

4.2.9 Determinação do teor de cálcio nas amostras

Amostras de cada grupo foram desidratadas em ambiente com baixa atividade de água, obtido em dessecador com ácido sulfúrico, e suas massas foram determinadas. Em seguida as amostras foram calcinadas em forno mufla a 800°C, até obtenção dos resíduos minerais correspondentes. Estes foram recuperados em solução de ácido nítrico a 10%, e submetidos à determinação quantitativa de cálcio por espectroscopia de absorção atômica aos 422,7 nm em equipamento Perkin-Elmer 703. Os resultados obtidos foram expressos em microgramas de cálcio por miligramas de tecido seco.

4.2.10 Exame histopatológico do material explantado

Os animais foram sacrificados em câmara de gás, por indução de anoxia, consequência da exposição ao dióxido de carbono por três minutos. Em seguida foram tricotomizados e uma incisão longitudinal foi feita no dorso dos mesmos. As quatro lojas subcutâneas foram dissecadas para permitir a localização dos fragmentos implantados. Procedeu-se à exérese do material para exame anátomo-patológico macro e microscópico. O exame macroscópico das peças foi efetuado no momento do procedimento cirúrgico

e imediatamente após, as mesmas foram fixadas em solução de formaldeído neutro a 10%, seguindo-se inclusão em parafina e corte em micrótomo em espessura de 6µm. As peças foram então convenientemente processadas para as colorações Hematoxilina-Eosina, Tricrômio de Masson e Von Kossa, conforme procedimentos preconizados por MICHALANY (1980), descritos a seguir:

MÉTODO DE VON KOSSA

As amostras foram desparafinizadas, alcoolizadas e hidratadas, em seguida lavadas com água destilada e submetidas à ação do nitrato de prata 5% por 30 minutos e depois irradiadas por lâmpada incandescente de 100 watts. Em seguida foram enxaguadas em água destilada e submetidas à coloração de contraste pelo Kernechrot durante 5 minutos, e novamente lavadas em água destilada. As peças foram então desidratadas, diafanizadas e montadas em lâminas.

MÉTODO DO TRICRÔMIO DE MASSON

As amostras foram desparafinizadas, alcoolizadas, hidratadas e submetidas a imersão em solução de alúmen de ferro a 5% por cerca de 15 horas. Em seguida foram então lavadas em água corrente e submetidas à Hematoxilina de Regaud por cerca de 15 horas. Foram lavadas em água destilada e rapidamente com álcool a 95°, e diferenciadas em álcool pícrico. Foram submetidas à mistura Ponceau por 30 minutos e rapidamente lavadas em água acetificada a 1%. Em seguida, foram submetidas ao ácido fosfomolibdico a 1% durante 10 a 30 minutos e lavadas em água destilada. Foram então submetidas ao azul de anilina durante 5 a 10 minutos, e lavadas em água acetificada a 1%. Foram novamente submetidas ao ácido fosfomolibdico por 5 minutos, e novamente lavadas com água acetificada a 1%, desidratadas, diafanizadas e montadas em lâminas.

MÉTODO DA HEMATOXILINA-EOSINA

As amostras foram desparafinizadas, alcoolizadas e hidratadas. Foram imersas em hematoxilina por 10 minutos, e lavadas em água corrente até azulecimento dos cortes. Foram diferenciadas rapidamente em álcool-ácido, lavadas em água corrente por 5 a 10 minutos e lavadas rapidamente em álcool 95°. Por fim foram submetidas à eosina por 1 a 2 minutos e diferenciadas em álcool 95° para em seguida serem desidratadas, diafanizadas e montadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tratamento de superfície – aplicação de tetrafluoreto de carbono e carbono amorfo tipo diamante

As peças submetidas à aplicação de tetrafluoreto de carbono e de DLC não evidenciaram alterações macroscópicas significativas em suas superfícies, merecendo menção apenas um escurecimento muito discreto, conforme pode ser visualizado ao comparar as Figuras 6, 7 e 8. Imediatamente após o processamento, as amostras foram mergulhadas em solução fisiológica estéril para hidratação, e após cinco minutos as peças estavam novamente hidratadas.

Figura 6: Imagem de peça de pericárdio bovino fixada com glutaraldeído não submetida a processamento por plasma

Figura 7: Imagem de peça de pericárdio bovino, previamente fixada com glutaraldeído, após tratamento para deposição de polímero à base de tetrafluoreto de carbono e hidrogênio a plasma.

Figura 8 : Imagem de peça de pericárdio bovino, previamente fixada com glutaraldeído, após tratamento para deposição de carbono amorfo tipo diamante a plasma.

5.2 Microscopia eletrônica de varredura

As discretas alterações macroscópicas pós-tratamento não são satisfatórias para comprovar a deposição do polímero na superfície do pericárdio bovino, e portanto, buscando a visualização deste fenômeno, foi realizada microscopia eletrônica de varredura. Os resultados são apresentados nas Figuras 9, 10 e 11, as quais permitem notar a alteração na superfície do substrato, causada pela deposição dos polímeros.

Figura 9: Fotomicrografia (eletrônica de varredura) de peça de pericárdio bovino fixada com glutaraldeído não submetida ao processamento a plasma; aumento 372x.

Figura 10: Fotomicrografia (eletrônica de varredura) de peça de pericárdio bovino, previamente fixada com glutaraldeído, após processamento para deposição de polímero por plasma de tetrafluoreto de carbono e hidrogênio; aumento de 372 X.

Através das figuras é possível observar que a deposição dos polímeros, em ambos os casos, promoveu um alisamento da superfície do substrato, diminuindo-lhe as irregularidades naturalmente existentes entre as fibras do colágeno. Na Figura 9 que reproduz o pericárdio bovino previamente tratado com glutaraldeído, sem tratamento complementar, vê-se um relevo bastante irregular, com proeminências e reentrâncias acentuadas. Estes achados são condizentes com os descritos por Julien e colaboradores (1997), quando discutem sobre a observação de espécimes ao microscópio eletrônico, e após analisarem diversos fragmentos afirmam que embora sejam trechos pequenos, relativamente ao tamanho das peças das quais são provenientes, são representativos do todo, particularmente quando observados em aumentos maiores.

Figura 11: Fotomicrografia (eletrônica de varredura) de peça de pericárdio bovino, previamente fixada com glutaraldeído, após processamento para deposição de *diamond like carbon* a plasma; aumento de 372 X.

É importante destacar a participação que estas irregularidades, e os espaços existentes entre as fibras têm sobre o processo de calcificação. Thubrikar e colaboradores (1983), interpretaram que as interrupções na continuidade da estrutura colágena causadas entre outros motivos por estresse mecânico, observadas como fissuras na zona de flexão das válvulas cardíacas, são fatores predisponentes ao processo de calcificação, induzindo, a partir destes espaços, à formação de múltiplos focos de calcificação no tecido. Tal fato foi alentado mais tarde, por Jorge-Herrero, Gutiérrez e Castillo-Olivares (1991) que consideraram que modificações morfológicas e/ou desestruturações do tecido, tendem a formar espaços vazios, que servem como áreas de potencial nucleação da hidroxiapatita. Esta pode ser uma das explicações para a calcificação em modelos circulatórios nos quais o estresse mecânico causa modificações morfológicas que permitem o acúmulo de cálcio nos espaços vazios.

Para diminuir estes efeitos indesejáveis sobre o biomaterial, uma estratégia que pode ser empregada é a modificação de sua superfície, que de acordo com Cui e Li (2000) pode ser considerada um processo chave na elaboração de materiais para uso clínico. Neste estudo, o tratamento de superfície por aplicação dos polímeros de tetrafluoreto de carbono e carbono amorfo tipo diamante foi empregado justamente com esta finalidade.

É possível observar nas Figuras 10 e 11 que as irregularidades da superfície foram sensivelmente atenuadas pelas coberturas depositadas durante os tratamentos complementares, em ambos os casos, comparativamente ao controle, sendo esta uma característica positiva a princípio na hemocompatibilidade das amostras. No entanto, a diminuição das irregularidades de superfície parece ser mais pronunciada quando sobre o pericárdio bovino previamente tratado com glutaraldeído, foi depositado complementarmente o polímero à base de tetrafluoreto de carbono, conferindo distinção a este grupo, do que no processo de deposição de carbono amorfo tipo diamante.

Além da possibilidade de cobertura e conseqüente melhoramento ou modificação do biomaterial de forma controlada, outro importante aspecto a observar nestes processos de deposição assistidos por plasma é a versatilidade dos mesmos. Aspectos levantados por Mitura e colaboradores (1996), McNamara, Murphy e Morshed (2001) e Tessier e colaboradores (2003) comprovam tal versatilidade, e compreendem dentre outros a preservação da estrutura original do substrato, proporcionando alterações mínimas em sua coloração e flexibilidade. Os resultados por nós obtidos são concordantes com os autores.

Favia e colaboradores (2003) consideram que ainda pode ser somada a estas vantagens a inerente esterilidade que os processos de deposição assistidos por plasma propiciam. Esta observação pode ser perfeitamente

aplicada ao tratamento empregado neste trabalho, visto que muito se aproxima do tratamento aplicado por Lassen, Nordby e Grün (2003) quando de seus estudos na otimização de processo de esterilização por plasma gerado por radiofrequência a partir de tetrafluoreto de carbono e oxigênio.

5.3 Avaliação da citotoxicidade – teste *in vitro*

O material então obtido após o tratamento com plasma, deverá apresentar determinadas características que assegurem a sua aplicação clínica em seres humanos, como a biocompatibilidade. A *International Standard Organization*, organismo internacional de padronização, preconiza que o teste de citotoxicidade *in vitro* deve ser o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade dos materiais para uso em dispositivos biomédicos. Nos casos em que a toxicidade não for detectada, ensaios com animais de laboratório podem derivar, de modo a complementar os dados sobre a biocompatibilidade.

Os resultados obtidos para o teste de citotoxicidade *in vitro* estão expressos na Tabela 1.

É possível observar que todos os grupos testados (tanto o grupo controle quanto as amostras tratadas por deposição de tetrafluoreto de carbono e de DLC) apresentaram graduações de índice de zona iguais ou menores que 2, o que pode ser interpretado, de acordo com a Farmacopéia Americana 26ª edição, como leve reatividade. Para os materiais poliméricos para uso em contato, direto ou indireto, com o paciente, é recomendado que a reatividade biológica expresse um índice de zona não maior que 2.

Tabela 1: Resultados das avaliações macroscópica e microscópica de toxicidade das amostras obtidos nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

Amostras	Controle	Tetrafluoreto de carbono			DLC		
		T1	T2	T3	D1	D2	D3
Halos de lesão celular (em centímetros)	0,2	—	0,2	Sob	Sob	Sob	Sob
	0,2	—	Sob	Sob	Sob	Sob	—
	0,2	—	Sob	Sob	Sob	—	Sob
Índice de zona	2	0	1	1	1	1	1

Legenda:

- Indica que não foram observados indicativos de lesão e morte celular
- Sob Indica que houve lesão e/ou morte celular na área restrita abaixo do ponto de aplicação da amostra

Graduações de índices de zona:

- Grau 0 Indica ausência de halo e lesões celulares embaixo ou ao redor da amostra
- Grau 1 Indica presença de células lesadas sob a amostra
- Grau 2 Indica presença de halo limitado ou sob a amostra
- Grau 3 Indica presença de halo variando entre 0,5 cm e 1,0 cm
- Grau 4 Indica presença de halo maior que 1,0 cm

As amostras de pericárdio fixado com glutaraldeído (grupo controle) apresentaram como resultado médio, leve reatividade, evidenciando halos de 0,2 cm ao redor do ponto de aplicação, enquanto que para as amostras tratadas por plasma (grupos tetrafluoreto de carbono e DLC) os índices médios foram menores. Resultados semelhantes foram relatados por Lee e colaboradores (2000) a partir de estudos nos quais foram realizadas modificações químicas em pericárdios bovinos previamente fixados com glutaraldeído, por acoplamento direto de heparina. Os autores verificaram, menor reatividade nas amostras tratadas que no grupo controle, o que os fez inferir sobre uma possível ação benéfica e favorável do tratamento químico complementar no que diz respeito à toxicidade intrínseca do biomaterial fixado com glutaraldeído.

Em ambos os grupos tratados com plasma não foram evidenciados halos ao redor das amostras, entretanto o exame microscópico da morfologia celular na porção situada sob as mesmas, demonstrou degeneração e / ou morte celular.

A observação macroscópica e microscópica de aspectos do teste de citotoxicidade pode ser vista nas Figuras 12, 13, 14 e 15.

Figura 12: Observação macroscópica do Controle positivo para o teste de citotoxicidade *in vitro*, evidenciando halo de morte celular.

Figura 13: Observação macroscópica do Controle negativo para o teste de citotoxicidade *in vitro*, evidenciando ausência de halo de morte celular.

Figura 14: Observação macroscópica para o teste de citotoxicidade *in vitro* de uma amostra representativa dos grupos tratados com plasma, evidenciando ausência de halo de morte celular.

Figura 15: Fotomicrografia exploratória da morfologia das células NCTC clone 929, empregadas no teste de citotoxicidade *in vitro*, evidenciando a região limítrofe do halo de morte celular; aumento 200X.

5.4 Teste de resistência mecânica – tração

Durante o processamento para a deposição do polímero, átomos residuais de oxigênio no interior da câmara, ou radicais emanados do plasma podem vir a promover corrosão na superfície do corpo de prova e, portanto, comprometer a integridade física do mesmo. O teste de resistência mecânica, por determinação da tensão máxima à tração, foi empregado para avaliar a integridade física dos pericárdios tratados.

Os resultados obtidos para a tensão máxima à tração das peças estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 : Resultados obtidos para a tensão máxima à tração (kgf) em peças de pericárdio bovino isento de tratamento adicional à fixação com glutaraldeído (controle) e após tratamento por deposição de polímero à base de tetrafluoreto de carbono (Tetrafluoreto de carbono) e carbono amorfo tipo diamante (DLC)

Amostras	Controle	Tetrafluoreto de carbono			DLC		
		T1	T2	T3	D1	D2	D3
Tensão máxima à tração (kgf)	1,1189	1,197	0,789	1,148	0,7203	1,058	1,006
	1,2569	1,439	1,293	0,875	0,9312	0,398	0,812
	1,2547	1,114	0,7664	1,042	0,9966	0,85	0,937
Média	1,2102	1,2500	0,9495	1,0217	0,8827	0,7687	0,9183
Desvio padrão	0,0790	0,1689	0,2977	0,1376	0,1444	0,3374	0,0983

Foi realizada a análise de variância dos valores médios obtidos para os grupos, valendo-se do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, e conclui-se que são estatisticamente iguais ($p > 0,05$), o que demonstra que os tratamentos de deposição a plasma, não danificam a estrutura da matriz de colágeno.

Sendo esta característica física do material menos explorada há, conseqüentemente, poucos relatos na literatura para comparação com os resultados obtidos.

Soma-se ainda a este fato, a diversidade de matrizes empregadas como biomateriais, cada qual com comportamento distinto; por conseguinte entre materiais com distinta compleição matricial, comparações pouco consistentes podem ser realizadas. Como exemplo é possível citar Yamauchi e colaboradores (2001) que reportam valores da ordem de 36 Mpa ao trabalharem com filmes colágenos preparados a partir de colágeno solúvel, e não de pericárdios.

5.5 Temperatura de desnaturação das peças

Uma das formas de avaliar a estabilização do colágeno e sua resistência a longo-termo à ruptura e à reabsorção "in vivo" pode ser obtida através de medidas de estabilidade térmica. À temperatura de desnaturação as ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura terciária do colágeno se desfazem, promovendo um desdobramento da estrutura espacial enovelada da molécula (DUNCAM; BOGHNER; VESELY, 1996).

De acordo com Golomb, Lewinstein e Ezra (1992), o aumento da estabilidade térmica do tecido decorre de extensa ligação cruzada intra-hélices (do colágeno), assim a temperatura de desnaturação relaciona-se com a estabilidade da tripla hélice do colágeno, conferida por ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações e ligações hidrofóbicas.

A temperatura de desnaturação é portanto um método simples de monitorar a densidade de ligações cruzadas no corpo de prova (LOKE; KHOR, 1995), de modo que temperaturas de desnaturação mais elevadas estão relacionadas com maior densidade de ligações cruzadas em

biopróteses fixadas com glutaraldeído (LEE e colaboradores, 2000). Complementarmente, Thomas e colaboradores (2001) consideram que a densidade de ligações cruzadas interferem na interação biológica, e portanto, pode estar relacionada com a calcificação.

Desta forma, este teste foi realizado com a intenção de monitorar uma possível ação deletéria do plasma e de radicais dele emanados sobre a fixação do pericárdio bovino, com prejuízo das ligações cruzadas.

Os resultados obtidos para a temperatura de desnaturação das peças estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3: Temperaturas (°C) de desnaturação das peças de pericárdio bovino isento de tratamento adicional à fixação com glutaraldeído (controle) e após tratamento por deposição de polímero à base de Tetrafluoreto de Carbono (T1, T2 e T3) e carbono amorfo tipo diamante (DLC) (D1, D2 e D3)

Amostras	Controle	Tetrafluoreto de carbono			DLC		
		T1	T2	T3	D1	D2	D3
Temperatura de desnaturação	87,7	90,0	90,0	90,6	90,9	90,4	91,2
	89,5	90,0	90,4	91,0	90,7	90,6	91,1
	88,7	89,9	90,5	90,3	90,5	90,6	91,0
Média	88,6	90,0	90,3	90,6	90,7	90,5	91,1
Desvio padrão	0,90	0,06	0,26	0,35	0,20	0,12	0,10

Os valores médios verificados foram semelhantes entre os grupos tratados por deposição de polímero à base de tetrafluoreto de carbono e carbono amorfo tipo diamante (90,3 e 90,8)°C, respectivamente, e por sua vez superiores à média do controle. A avaliação estatística dos resultados, empregando análise de variância por aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, revelou que há diferença significativa ($p < 0,001$) entre o valor médio de ambos os grupos quando comparados ao grupo

controle, e ainda, que a diferença entre os grupos tratados não é significativa ($p > 0,05$). Ao ponderar os resultados obtidos frente àqueles derivados de ensaios realizados com pericárdios bovinos fixados com glutaraldeído, descritos por outros autores (DUNCAM; BOGHNER; VESELY, 1996; LEE e colaboradores, 2000), é possível notar correspondência entre os valores. Lee e colaboradores (2000) encontraram temperaturas de desnaturação ao redor de 86°C tanto em amostras fixadas com glutaraldeído, como em outras que receberam tratamento complementar, com finalidade anticalcificante, por acoplamento de heparina. Duncam, Boghner e Vesely (1996) obtiveram valores de temperatura de desnaturação entre 83 e 89 °C conforme os tratamentos aplicados às amostras. Os valores de temperatura de desnaturação que se encontrou nos grupos tratados no presente trabalho são maiores que os do grupo controle, e também maiores que os valores descritos por outros autores, o que leva à inferência de que o processamento, além de não promover efeitos deletérios sobre a fixação do pericárdio bovino, ainda reforça tal estrutura.

5.6 Exame histopatológico do material explantado

Buscando visualizar primeiramente a calcificação incorporada no tecido, e ainda complementarmente ao teste de citotoxicidade "in vitro", a biocompatibilidade através de possíveis reações tóxicas e/ou alérgicas nos tecidos animais, amostras de cada grupo foram implantadas em ratos. A metodologia histológica para a análise das peças explantadas baseou-se em observações estruturais após coloração por hematoxilina-eosina (HE), tricrômio de Masson e von Kossa, e os resultados comprovam adequada tolerância *in vivo* das peças implantadas. À interpretação de cortes corados por HE não há sinais de rejeição, degradação, reabsorção ou neovascularização das amostras em cada um dos grupos, sendo possível observar a integridade das fibras colágenas coradas em tonalidade rósea, e comprová-la através da coloração adequada e específica para as fibras

colágenas (tricroômio de Masson), corando-se agora em tons de azul. Estes resultados reforçam aqueles obtidos dos testes de tração mecânica, e temperatura de desnaturação, consolidando a hipótese de não agressividade do tratamento por plasma à estrutura colágena do pericárdio.

A observação microscópica de aspectos das colorações hematoxilina-eosina e tricroômio de Masson, de amostras representativas dos grupos tratados por deposição a plasma de polímero tetrafluoreto de carbono e de carbono amorfo tipo diamante podem ser vistos nas Figuras 16, 17, 18 e 19.

Figura 16: Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino, representativa do grupo submetido à deposição a plasma de polímero de tetrafluoreto de carbono, explantada e corada; (Hematoxilina-Eosina, HE 200X)

Figura 17: Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino, representativa do grupo submetido à deposição a plasma de polímero de tetrafluoreto de carbono, explantada e corada; (Tricrômio de Masson, 100X)

Figura 18: Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino, representativa do grupo submetido à deposição a plasma de *diamond like carbon*, explantada e corada; (Hematoxilina eosina, 200X)

Figura 19: Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino, representativa do grupo submetido à deposição de *diamond like carbon* a plasma, explantada e corada; (Tricrômio de Masson, 200X)

Por outro lado, a observação dos cortes obtida por coloração de von Kossa, revela calcificação maciça no grupo controle, evidenciada pela coloração preta no interior da peça, que pode ser observada na Figura 20.

O mesmo modelo de calcificação foi descrito e demonstrado por Fishbein e colaboradores (1982) que a descrevem inicialmente como focal, pequena, irregular, com depósitos granulares que parecem crescer em tamanho e densidade com o tempo. Os autores ainda enfatizam que a calcificação não afeta uniformemente os tecidos, podendo sua extensão variar de peça para peça, de animal para animal. Tal padrão desigual de calcificação foi confirmado por Grimm e colaboradores (1991) em seus experimentos no tratamento complementar de pericárdios bovinos previamente fixados com glutaraldeído; os autores também descrevem um

modelo de calcificação a partir da região central da peça e que reduz gradativamente quanto mais próximo das extremidades do tecido. De forma semelhante, a calcificação também foi relatada por Thubrikar e colaboradores (1983) em zonas de estresse mecânico, sendo localizada entre as duas camadas de colágeno que são paralelas ao plano da superfície da folha, ou seja, no interior da peça.

Figura 20: Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino do grupo controle, explantada e corada.
(von Kossa, 200 X)

Comparativamente, nos grupos tratados por plasma, a calcificação notavelmente menor, pode ser vista nas Figuras 21 e 22, sob a forma de pequenos pontos de calcificação focal, escassos e esparsos, dispersos por toda a extensão da peça; estes resultados são concordantes com os divulgados por Levy e colaboradores (2003) em tratamento anticalcificante com etanol e sais de alumínio, que se caracteriza por ser um tratamento em profundidade, e não somente na superfície do pericárdio.

A evidente modificação no modelo de calcificação após o tratamento por plasma conduz à inferência de que durante processamento, a deposição ocorre por entre as fibras de colágeno, que compõem o pericárdio bovino e com isso promove um impedimento estérico nos locais onde os cristais de cálcio poderiam se desenvolver, modificando a distribuição da calcificação distrófica nas peças.

Aspectos da coloração de von Kossa, das amostras tratadas por ambos os processos avaliados, e representativas de cada lote podem ser vistos nas Figuras 21 e 22.

Figura 21: Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino, representativa do grupo submetido à deposição a plasma de polímero de tetrafluoreto de carbono, explantada e corada; (von Kossa, 200X)

Figura 22: Fotomicrografia óptica de secção transversal de peça de pericárdio bovino, representativa do grupo submetido à deposição de carbono amorfo tipo diamante a plasma, explantada e corada; (von Kossa, 100X)

5.7 Determinação do teor de cálcio

A evidência histológica da alteração no modelo de calcificação das peças foi comprovada através da determinação quantitativa do teor de cálcio incorporado nas amostras, cujos resultados estão expressos na Tabela 4.

A expressiva diferença entre os valores médios encontrados para o grupo controle e os grupos tratados foi avaliada estatisticamente por análise de variância, revelando ser intensa ($p < 0,001$) entre o grupo controle e os grupos tratados por plasma, enquanto que a diferença entre os grupos tratados não é significativa ($p > 0,05$).

Tabela 4: Quantidades de cálcio (Ca^{2+}) incorporado no pericárdio ($\mu\text{g}/\text{grama}$ de tecido seco) isento de tratamento adicional à fixação com glutaraldeído (controle) e após tratamento para deposição de polímero à base de Tetrafluoreto de Carbono (T1, T2 e T3) e carbono amorfo tipo diamante (DLC) (D1, D2 e D3)

Amostras Resultados	Controle	Tetrafluoreto de carbono			DLC		
		T1	T2	T3	D1	D2	D3
Teor de cálcio µg / g tecido seco	148.367,90	1.128,54	1.227,62	1.185,27	1.975,45	2.290,02	2.548,11
	152.912,98	1.294,64	1.176,74	1.135,98	2.192,74	2.303,15	2.508,93
	165.007,78	1.206,47	1.137,72	1.325,69	2.251,49	2.270,96	2.492,44
	157.217,57	1.040,94	1.174,62	1.192,31	2.043,97	2.139,26	2.303,08
	140.530,74	1.258,59	1.292,02	1.119,89	2.108,48	2.331,22	2.425,21
	150.986,01	1.097,15	1.159,42	1.040,46	2.184,90	2.298,39	2.484,91
	161.998,75	1.145,35	1.023,47	1.129,47	2.116,37	2.300,24	2.632,24
	159.256,43	1.189,72	1.131,18	1.114,67	2.207,05	1.983,63	2.639,91
	158.996,64	1.191,87	1.218,98	1.104,01	2.109,86	2.257,65	2.478,13
	179.116,22	1.082,26	1.178,62	1.087,86	2.217,62	2.003,86	2.396,87
	155.870,02	1.201,27	1.059,71	1.081,87	1.988,81	1.987,17	2.857,22
	148.893,96	1.166,51	1.081,96	1.155,57	1.996,70	2.108,02	2.419,61
Média	156.596,25	1.166,94	1.155,17	1.139,42	2.116,12	2.189,46	2.515,22
Desvio padrão	9774,80373	72,89272	75,17096	72,60047	96,79272	136,6651	143,4303

Observa-se que os resultados do teor de cálcio incorporado obtidos para os grupos tratados por plasma foram bastante satisfatórios, entre 1 e 2 mg de cálcio por grama de tecido, comprovando os resultados dos cortes histológicos corados por von Kossa (Figura 20). A comparação destes resultados àqueles obtidos por outros métodos anticalcificantes, como o preconizado por Lee e colaboradores (2000) por acoplamento da heparina, que mostra valor médio de cerca de 6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de cálcio incorporado, por Gott e colaboradores (1992) por tratamento com o ácido 2-amino-oléico que revela valores ao redor de 7,7 mg/g de cálcio incorporado, ou o preconizado por Levy e colaboradores (2003) sob tratamento com etanol e cloreto de alumínio que revela valor médio de cerca de 6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de cálcio incorporado,

são animaroes. Fazem entrever excelente perspectiva de aproveitamento prático dos processos de deposição a plasma para aplicações cirúrgicas, apoiando a opinião de Hauert (2003) a respeito destes processos, particularmente no que diz respeito a ser uma estratégia anticalcificante para biomateriais empregados na confecção de válvulas cardíacas protéticas.

Ao se considerar os resultados divulgados por Jorge-Herrero e colaboradores (1999) ao analisar diferentes tratamentos químicos (com DPPA e EDAC) com finalidade anticalcificante usando o modelo de implante subcutâneo em ratos; os autores avaliaram a incorporação de cálcio em peças que ficaram implantadas por 30 e por 60 dias, e divulgaram os valores em miligramas de cálcio por grama de tecido seco ($124,1 \pm 31,3$ mg). Este procedimento é concordante com o preconizado por Levy e colaboradores (1983) que ao comparar os modelos de implantação em coelhos e ratos, recomenda o uso de ratos, devido a acelerada calcificação em três semanas contra seis meses nos coelhos. De outro lado, Gabbay e colaboradores (1984) avaliaram a calcificação de heteroenxertos de pericárdio em cães. Mais recentemente, Suh e colaboradores (2000) também avaliando a calcificação em pericárdios previamente fixados, desenvolveram seus trabalhos em um sistema *in vitro* para avaliar a calcificação, durante 3 dias, e reportaram resultados em microgramas de cálcio por centímetro cúbico de tecido.

Portanto, se de um lado os resultados são no geral promissores, a diversidade de condições experimentais, modelos e tratamentos aplicados dificultam a intercomparação, e por conseguinte retardam a efetiva aplicação clínica de condições evolutivas aos processos convencionais.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, é possível observar que o tratamento anticalcificante proposto, empregando o plasma para deposição de tetrafluoreto de carbono, assim como de carbono amorfo tipo diamante apresentam excelentes perspectivas de aproveitamento prático para aplicações cirúrgicas, particularmente aquelas relativas à confecção de biomateriais para uso cardiovascular, como próteses de válvulas cardíacas. Em ambos os casos, tanto as características de funcionalidade como de biocompatibilidade apresentaram desempenho adequado, não tendo sido detectada diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos de tratamento.

Ao avaliar características de funcionalidade, foram obtidos resultados satisfatórios com expressivas diferenças entre os grupos controle e teste quando da determinação do teor de cálcio incorporado nas amostras. Por outro lado, a resistência mecânica do material, assim como a densidade de ligações cruzadas, que mantém a estrutura protéica, foram resguardadas, indicando baixa agressividade dos tratamentos complementares propostos.

Com relação às características de biocompatibilidade, as mesmas foram observadas tanto nos testes *in vitro* como *in vivo*. Os ensaios para a avaliação da citotoxicidade *in vitro* não revelaram respostas positivas além daquelas inerentes ao biomaterial (por conter resíduos de glutaraldeído), sendo este resultado alentado pela resposta pós-cirúrgica dos animais, que não demonstraram reações agudas ou sub-crônicas aos implantes.

Ambas as características, biocompatibilidade e funcionalidade, foram portanto comprovadas pela avaliação histopatológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ALFRERIEV, I., VYAVAHARE, N., SONG, C., CONNOLLY, J., HINSON, J.T., LU, Z., TALLAPRAGADA, S., BIANCO, R., LEVY, R. Biophosphonate derivatized polyurethanes resist calcification. *Biomaterials*, Amsterdam, v. 22, n.19, p.2683-2693, 2001.

ARBUSTINI, E., JONES, M., FERRANS, V. J. Formation of cartilage in bioprosthetic cardiac valves implanted in sheep: a morphologic study. *Am. J. Cardiol.*, New York, v.52, p.632-636, 1983.

ATIK, F.A., DIAS, A.R., POMERANTZEFF, P.M.A., BARBERO-MARCIAL, M., STOLF, N.A.G., JATENE, A.D. Immediate and long term evolution of valve replacement in children less than 12 years old. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v.73, n.5, p.424-428, 1999.

BARBOSA FILHO, J., BARBOSA, P.R. **Próteses cardíacas valvares.** Disponível em: <http://www.soceri.org.br/revista/3_99/prote.htm> Acesso em: 10 de novembro de 2003. [publicação da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro]

BERNACCA, G.M., DIMITRI, W.R., FISHER, A.C., MACKAY, T.G., WHEATLEY, D.J. Chemical modification of bovine pericardium and its effect on calcification in the rat subdermal model. *Biomaterials*, Amsterdam, v.13, n.6, p.345-52, 1992.

BLACK, M.M., DRURY, P.J., TINDALE, W.B. Twenty-five years of heart valve substitutes: a review. *J. R. Soc. Med.*, London, v.76, p.667-680, 1983.

¹ De acordo com a NBR 6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI).

BOWES, I.H., CATER, C.W. The interaction of aldehydes with collagen. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v.168, p.341-352, 1968.

BRUCK, S.D. Possible causes for the calcification of glutaraldehyde-treated tissue heart valves and blood contacting elastomers during prolonged use in medical devices – a physico-chemical view. *Biomaterials*, Amsterdam, v.2, n.1, p.14-18, 1981.

CARPENTIER, A., NASHREF, A., CARPENTIER, S., GOUSSEF, N., RELLAND, J., LEVY, R.J., FISHBEIN, M.C., EL-ASMAR, B., BENOMAR, M., EL-SAYED, S., DONZEAU-GOUGE, P.G. Prevention of tissue valve calcification by chemical techniques. *Cardiac bioprosthesis – Proceedings of the second international symposium*. 1.ed., York Medical Books, 1982.

CHANDA, J., KURIBAYASHI, R., ABE, T. Heparin in calcification prevention of porcine pericardial bioprostheses. *Biomaterials*, Amsterdam, v.18, n.16, p. 1109-1113, 1997.

CHANDY, T., DAS, G.S., WILSON, R.F., RAO, G.H.R. Use of plasma glow for surface-engineering biomolecules to enhance bloodcompatibility of Dacron and PTFE vascular prosthesis. *Biomaterials*, Amsterdam, v.21, n. 7, p.699-712, 2000.

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.*, London, v.13, n.2, 1985.

CUI, F.Z., LI, D.J. A review of investigations on biocompatibility of diamond-like carbon and carbon nitride films. *Surf. Coat. Technol.*, Amsterdam, v.131, p.481-487, 2000.

DUNCAM, A.C.; BOUGHNER, D.; VESELY, I. Dynamic glutaraldehyde fixation of a porcine aortic valve xenograft. *Biomaterials*, Amsterdam, v.17, n.19 p.1849-1856, 1996.

FAVIA, P., SARDELLA, E., GRISTINA, R., d'AGOSTINO, R. Novel plasma processes for biomaterials – micro-scale patterning of biomedical polymers. *Surf. Coat. Technol.*, Amsterdam, v.169-170, p.707-711, 2003.

FISHBEIN, M.C., LEVY, R.J., FERRANS, V.J., DEARDEN, L.C., NASHEF, A., GOODMAN, A.P., CARPENTIER, A. Calcification of cardiac valve bioprosthesis. *J. thorac. cardiovasc. sur.*, St Louis, v.83, p.602-609, 1982.

FUJIOKA, K., MAEDA, M., HOJO, T., SANO, A. Protein release from collagen matrices. *Adv. drug deliv. rev.*, Amsterdam, v.31, p.247-266, 1998.

GABBAY, S., BORTOLOTTI, U., FACTOR, S., SHORE, D.F., FRATER, R.W.M. Calcification of implanted xenograft pericardium. *J. thorac. cardiovasc. sur.*, St Louis, v.87, p.782-787, 1984.

GATTI, A.M., GALLONI, M., NOERA, G., PASQUINO, E., VALLANA, F. Calcification of chemically treated bovine pericardium. *Int. j. artif. organs.*, Milano, v.14, n.10, p.647-654, 1991.

GOLOMB, G., LEWINSTEIN, I., EZRA, V. Mechanical properties and histology of charge modified bioprosthetic tissue resistant to calcification. *Biomaterials*, Amsterdam, v.13, n.6, p.353-356, 1992.

GOTT, J.P., CHIH, P., DORSEY, L.M.A., JAY, J.L., JETT, G.K., SCHOEN, F.J., GIRARDOT, J.-M., GUYTON, R.A. Calcification on porcine valves: a successful new method of antimineralization. *Ann Thorac Surg*, Boston, v.53, p.207-216, 1992.

GRIMM, M., EYBL, E., GRABENWÖGER, M., GRIESMACHER, A., LOSERT, U., BÖCK, P., MÜLER, M.M., WOLNER, E. Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, St Louis, v.102, 195-201, 1991.

HANKER, J.S., GIAMMARA, B.L. Biomaterials and biomedical devices. *Science*, Whashington, v.242, p.885-892, 1988.

HAUERT, R. A review of modified DLC coatings for biological applications. *Diamond and Related Materials*, Amsterdam, v.12, p. 583-589, 2003. [co126]

INTERNATIONAL Standard: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10993-5, 1992.

JAYAKRISHNAN, A., JAMEELA, S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprosthesis and drug delivery matrices. *Biomaterials*, Amsterdam, v.17, n.5, p.471-484, 1996.

JEE, K.S., KIM, Y.S., PARK, K.D., KIM, Y.H. A novel chemical modification of bioprosthetic tissues using L-arginine. *Biomaterials*, Amsterdam, v.24, n.20, p.3409-3016, 2003.

JORGE-HERRERO, E., FERNÁNDEZ, R., TURNAY, J., OLMO, N., COLERO, P., GARCÍA, R., FREILE, I., CASTILLO-OLIVARES, J.L. Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. *Biomaterials*, Amsterdam, v.20, p.539-545, 1999.

JORGE-HERRERO, E., GUTIÉRREZ, M.P., CASTILLO-OLIVARES, J.L. Calcification of soft tissue employed in the construction of heart valve prostheses – study of different chemical treatments. *Biomaterials*, Amsterdam, v.12, n.2, p.249-252, 1991.

JULIEN, M., LÉTOUNEAU, R., MAROIS, Y., CARDOU, A., KING, M.W., GUIDOIN, R., CHACHRA, D., LEE, J.M. Shelf-life of bioprosthetic heart valves – a structural and mechanical study. *Biomaterials*. Amsterdam, v.18, n.8, p.605-612, 1997.

KHOR, E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials*, Amsterdam, v.18, n.2, p.95-105, 1997.

KHOR, E., WEE, A., LOKE, W.K., TAN, B.L. Dimethylsulfoxide as an anticalcification agent for glutaraldehyde fixed biological tissue. *J. Mater. Sci: Mater med* v.7, n. 11, p. 691-693, 1972.

KLUES, H.G., STATLER, L.S., WALLACE, R.B., ROBERTS, W.C. Massive calcification of a porcine bioprosthesis in the aortic valve position and the role of calcium supplements, *Am. heart j.*, St Louis, v.121, n.6, part 1, p.1829-1831, 1991.

KUIJIPERS, A.J., van WACHEM, P.B., van LUYN, M.J.A., ENGBERS, G.H.M., KRIJGSVELD, J., ZAAT, S.A.J., DANKERT, J., FEIJEN, J. In vivo and in vitro release of lysozyme from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves. *Journal of controlled release*, Amsterdam, v.67, p.323-336, 2000.

LANGER, R., VACANTI, J.P. "Tissue Engineering", *Science*, Whashington, v.260, p.920-926, 1993.

LASSEN, K.S; NORDBY, B.; GRÜN, R., Optimization of a RF-Generated CF₄/O₂ gas plasma sterilization process. *J. Biomed. Mater. Res.*, New York, v.65B, n.2, p.239-244, 2003.

LEASK, R.L., JAIN, N., BUTANY, J. Endothelium and valvular diseases of the heart. *Microsc. res. Tech.*, New York, v.60, p.129-137, 2003.

LEE, C.H., SINGLA, A., LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.221, p.1-22, 2001.

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*, Amsterdam, v.21, n.22, p.2323-2330, 2000.

LEMOES, P.C.P.; STOLF, N.A. **Caminhos da cardiologia – A prótese valvar cardíaca definitiva: meio século de procura.** Disponível em: <<http://publicacoes.cardiol.br/caminhos/013/default.asp>> Acesso em: 15 de dezembro de 2003. [publicação da Sociedade Brasileira de Cardiologia]

LEVY, R.J., SCHOEN, F.J., LEVY, J.T., NELSON, A.C., HOWARD, S.L., OSHRY, L.J. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. *Am. J. Pathol.*, New York, v.113, p.143-155, 1983.

LEVY, R.J., VYAVAHARE, N., ASHWORTH, P., BIANCO, R., SCHOEN, F.J. Inhibition of cusp and aortic wall calcification in ethanol- and aluminum-treated bioprosthetic heart valves in sheep: background, mechanisms, and synergism. *J.Heart Valve Dis*, Pinner, v.12, n.2, 2003.

LOKE, W.K.; KHOR, E. Validation of the shrinkage temperature of animal tissue for bioprosthetic heart valve application by differential scanning calorimetry. *Biomaterials*, Amsterdam, v16, n.3, p.251-258, 1995.

MANTOVANI, M., VIDAL, B.C., CONCON FILHO, A. Tamponamento de lesões renais transfixantes com colágeno tipo 1. *Acta Cir. Bras.*, São Paulo, v.14, n.4, p.0-0, 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86501999000400007&lng=en&nrm=iso Acesso em: 20 de janeiro de 2004. ISSN0102-8650 [on-line]

McNAMARA, B.P., MURPHY, H., MORSHED, M.M. Adhesion properties of diamond-like coated orthopaedic biomaterials. *Diamond and related materials*, Amsterdam, v.10, p.1098-1102, 2001.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 1.ed. São Paulo:EPU, 1980, 178p.

MITURA, S., NIEDZIELSKI, P., JACHOWICZ, D., LANGER, M., MARCINIAK, J., STANISHEVSKY, A., TOCHITSKY, E., LOUDA, P., COUVRAT, P., DENIS, M., LOURDIN, P. Influence of carbon coatings origin on the properties important for biomedical application. *Diamond and related materials*, Amsterdam, v.5, p.1185-1188, 1996.

NICOLAS, F.L., GAGNIEU, C.H., Denatured thiolated collagen: I synthesis and characterization, *Biomaterials*, Amsterdam, v.18, n.11, p. 807-813, 1997.

NICOLAS, F.L., GAGNIEU, C.H., Denatured thiolated collagen: II cross-linking by oxidation, *Biomaterials*, Amsterdam, v.18, n.11, p. 815-821, 1997.

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.* Philadelphia, v.3, n.3, p.237-245, 1990.

NOISHIKI, Y., HATA, C., TU, R., SHEN, S.H., LIN, D., SUNG, H.W., WITZEL, T., WANG, E., THYAGARAJAN, K., TOMIZAWA, Y., QUIJANO, R.C. Development and evaluation of a pliable biological valved conduit - Part I: preparation, biochemical properties, and histological findings. *Int. j. artif. Organs*, Milano, v.16, n.4, p.192-198, 1993.

OGLE, M.F., KELLY, S.J., BIANCO, R.W., LEVY, R.J. Calcification resistance with aluminum-ethanol treated porcine aortic valve bioprostheses in juvenile sheep. *Ann. Thorac. Surg.* Boston, v.75, p.1267-1273, 2003.

OWEN, T.J., LANTZ, G.C., HILES, M.C., VANVLEET, J., MARTIN, B.R., GEDDES, L.A. Calcification potential of small intestinal submucosa in a rat subcutaneous model. *J. surg. Res.*, New York, v.71, p.179-186, 1997.

PINTO, T.J.A., SAITO, T., GLERAN, A. Biocompatibilidade de materiais empregados na confecção de próteses cardiovasculares: comparação entre pericárdio bovino e Dacron. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.27, n.3, p.185-189, 1993.

RODIL, S.E., OLIVARES, R., ARZATE, H., MUHL, S. Properties of carbon films and their biocompatibility using in-vitro tests. *Diamond and Related Materials*. Amsterdam, v.12, p.931-937, 2003.

ROE, S.C., MILTHORPE, B.K., SCHINDHELM, K. Collagen cross-linking and resorption: effect of glutaraldehyde concentration. *Artif. organs*, Cleveland, v.14, n.6, p.443-448, 1990.

SALLES, C.A., SILVA, R.P., BORÉM, P.M., CASAGRANDE, I.S.J., MOREIRA, M.C.V., GUSMÃO, J.B., TEIXEIRA, V.C., SILVA, S.R.B. Reconstrução da aorta com conduto de pericárdio bovino corrugado. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, São Paulo, v.13, n.2, p.131-140, 1998.

SCHMIDT, C., BAIER, J.M. Acellular vascular tissues : natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*, Amsterdam, v.21, n.2, p.2215-2231, 2000.

SHEU, M.-T., HUANG, J.-C., YEH, G.-C., HO, H.-O. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. *Biomaterials*, Amsterdam, v.22, n.13, p.1713-1719, 2001.

STEVENS, A., LOWE, J. **Patologia**. 2.ed.Bras. São Paulo:Editora Manole, 1998, 535p.

SUH, H., PARK, J.C. Evaluation of calcification in porcine valves treated by ultraviolet ray and glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering*, Lausanne, v.13, p.65-73, 2000.

SUH, W., HWANG, Y.-S., PARK, J.-C., CHO, B.K. Calcification of leaflets from porcine aortic valves crosslinked by ultraviolet irradiation. *Artif. Organs*, Cleveland, v.24, n.7, p.555-563, 2000.

SUNG, H.-S., CHANG, Y., CHIU, Y.-T., HSU, H.-L., SHIH, C.-C., LU, J.-H., YANG, P.-C. Evaluation of an epoxy-fixed biological patch with ionically bound heparin as a pericardial substitute. *Biomaterials*, Amsterdam, v.17, n.17, p.1693-1701, 1996.

TESSIER, P.Y., PICHON, L., VILLECHAISE, P., LINEZ, P., ANGLERAUD, B., MUBUMBILA, N., FOUQUET, V., STRABONI, A., MILHET, X., HILDEBRAND, H.F. Carbon nitride thin films as protective coatings for biomaterials – synthesis, mechanical and biocompatibility characterizations. *Diamond and related materials*, Amsterdam, v.12, p.1066-1069, 2003.

THOMAS, V., KUMARI, T.V., JAYABALAN, M. In vitro studies on the effect of physical cross-linking on the biological performance of aliphatic poly(urethane urea) for blood contact applications. *Biomacromolecules*, Washington, v.2, n.2, p.588-596, 2001.

THUBRIKAR, M.J., DECK, J.D., AOUAD, J., NOLAN, S.P. Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves. *J. thorac. cardiovasc. Sur.*, St Louis, v.85, n.1, p.115-125, 1983.

THULIN, L.I., SJÖGREN, J.L. Mechanical versus biological aortic hearth valve implants in the Elderly – a comparison or early and mid-term results. *Arq.Bras.Cardiol.*, São Paulo, v.77, n.5, p.395-398, 2001.

TURINA, J., HESS, O.M., TURINA, M., KRAYENBUEHL, H.P. Cardiac bioprosthesis in the 1990s. *Circulation*, Dallas, v.88, n.2, p.775-781, 1993.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 26 ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, p. 1893-1895, 2003.

WEILAND, A.P. A review of cardiac valve prostheses and their selection. *Heart and lung*, St Louis, v.12, n.5, p.498-504, 1983.

WILLIAMS, D.F. **Biocompatibility of tissue analogs.** v.1 Florida: CRC Press, 1985, 166p.

YAMAUCHI, K., TAKEUCHI, N., KURIMOTO, A., TANABI, T. Films of collagen crosslinked by S-S bonds: preparation and characterization. *Biomaterials*, Amsterdam, v.22, p.855-863, 2001.

YONEYAMA, T., SUGIHARA, K., ISHIHARA, K., IWASAKI, Y., NAKABAYASHI, N. The vascular prosthesis without pseudointima prepared by antithrombogenic phospholipid polymer. *Biomaterials*, Amsterdam, v.23, n.6, p.1455-1459, 2002.

YOSHIOKA, S.A., GOISSIS, G., ARAUJO, R.B., PAMIREZ, V.D.A., GODOY, M.F., BRAILE, D.M. Performance hidrodinâmica de biopróteses valvulares

cardíacas de pericárdio bovino tratado com acetais de glutaraldeído.
Rev.bras. eng. Biomed., Rio de Janeiro, v.15, n.12, p.5-10, 1999.