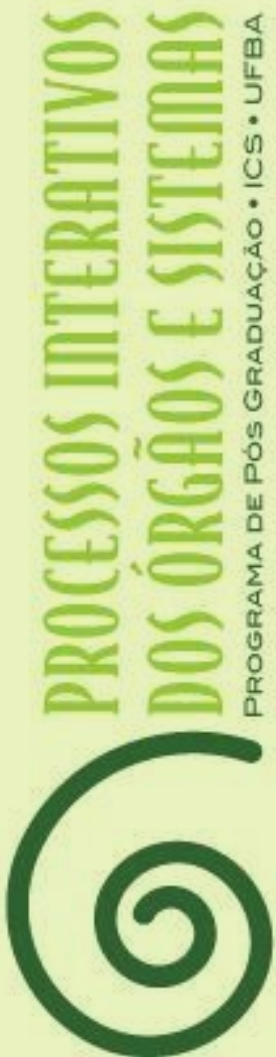


Raísa Cavalcante Dourado

**EFEITOS DA REDUÇÃO DO TEMPO DE
FIXAÇÃO EM GLUTARALDEÍDO E DA
DESCELULARIZAÇÃO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS DO PERICÁRDIO
BOVINO E SUA CALCIFICAÇÃO *IN VIVO***

Salvador
2022



RAÍSA CAVALCANTE DOURADO

**EFEITOS DA REDUÇÃO DO TEMPO DE FIXAÇÃO EM
GLUTARALDEÍDO E DA DESCELULARIZAÇÃO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS DO PERICÁRDIO BOVINO E SUA
CALCIFICAÇÃO *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, como
requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Cajazeira Aguiar

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Isabela Cerqueira Barreto

Salvador

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Dourado, Raísa Cavalcante.

Efeitos da redução do tempo de fixação em glutaraldeído e da descelularização sobre as características do pericárdio bovino e sua calcificação *in vivo* [recurso eletrônico] / Raísa Cavalcante Dourado. - Dados eletrônicos. - 2022.

1 CD-ROM : il. ; 4 ¾ pol.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Cajazeira Aguiar.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Isabela Cerqueira Barreto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2022.

1. Bioprótese. 2. Doenças das valvas cardíacas. 3. Calcificação. 4. Válvulas cardíacas artificiais. 5. Pericárdio. 6. Glutaraldeído. 7. Ácido glutâmico. I. Aguiar, Márcio Cajazeira. II. Barreto, Isabela Cerqueira. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. IV. Título.

CDD 617.412 - 23. ed.

Elaborada por Maria Auxiliadora da Silva Lopes - CRB-5/1524



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto de Ciências da Saúde



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE TESE

RAÍSA CAVALCANTE DOURADO

**EFEITOS DA REDUÇÃO DO TEMPO DE FIXAÇÃO EM
GLUTARALDEÍDO E DA DESCELULARIZAÇÃO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS DO PERICÁRDIO BOVINO E SUA
CALCIFICAÇÃO IN VIVO**

Salvador, Bahia, 11 de outubro de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA:

DocuSigned by:

Marcio Cajazeira Aguiar

D7A8D8500C348P

PROF. DR. MARCIO CAJAZEIRA AGUIAR (Examinador Interno)

DocuSigned by:

Deise Souza Vilas Bôas

3AC14B1A10F045P

PROFA. DRA. DEISE SOUZA VILAS BÔAS (Examinadora Interna)

DocuSigned by:

Eliana

7092058E01CB43P

PROFA. DRA. ELIANA DOS SANTOS CÂMARA PEREIRA (Examinadora Interna)

DocuSigned by:

Aparecida de Fátima Giglioti

D55CD8E1703E4AC

PROFA. DRA. APARECIDA DE FÁTIMA GIGLIOTI (Examinadora Externa)

DocuSigned by:

Gilberto Goissis

BR300DB1E11043P

PROF. DR. GILBERTO GOISSIS (Examinador Externo)

Dedico este trabalho

À querida Profa. Fabiana Paim Rosa, pelo seu legado ao Instituto de Ciências da Saúde/UFBA, com a fundação do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB), além de toda contribuição imaterial e intelectual na formação de tantos alunos como Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas (PPgPIOS). Memórias da senhora serão lembradas sempre com muito carinho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço todos os dias e continuo agradecendo a Deus pelo milagre da vida e pela companhia dos amigos espirituais que estão sempre presentes, abrindo e guiando meus caminhos. Aos meus pais, Aparecida e Daniel, minha eterna gratidão, por todo amor, dedicação e abdicção para que eu e meus dez irmãos tivéssemos uma boa educação, além do exemplo de como o estudo pode ser transformador. Agradeço a toda família, em especial a meus irmãos pelo carinho e pelo apoio incondicional.

Agradeço à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do projeto. Agradeço ao Prof. Márcio Cajazeira pelo acolhimento em um momento crítico para mim que foi a aposentadoria da Profa. Fabiana. O perfil do Prof. Márcio de responsabilidade, dedicação, atenção aos detalhes e competência nas ciências morfológicas foi determinante para a qualidade deste trabalho, sem citar o lado humano desse profissional. Muito obrigada por tudo, Márcio!

À Profa. Fabiana Paim Rosa, pela oportunidade de participar das atividades do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB), do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Mesmo tendo se afastado de suas atividades por motivos de saúde, foram deixados à nossa disposição uma rede de contatos firmados e os recursos ora providenciados, graças à sua competência e inteligência relacional singular. Agradeço também a todos os demais professores colaboradores do Laboratório LBTB, em especial à Profa. Isabela Cerqueira, pelo apoio em todas as fases do projeto. Agradeço à empresa Braile Biomédica e aos pesquisadores Gilberto Goissis e Aparecida de Fátima, pela parceria e colaboração sem os quais a realização deste trabalho não seria possível.

Agradeço aos professores coordenadores do Programa de Pós Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas (PPgPIOS) - Roberto Paulo Araújo e Eduardo Pondé, pelo auxílio prestado em momentos ímpares, bem como ao funcionário Carlos pela sua prestatividade e gentileza. Um agradecimento também aos colegas do PIOS e amigos do LBTB, com quem compartilhei experiências e conhecimentos. No LBTB tive a sorte de conhecer Maurício Mitsuo, uma pessoa linda e de muita generosidade, que também se tornou um grande amigo. Mau, obrigada por existir!

Agradeço a todo o Departamento de Biomorfologia, onde tive oportunidade de vivenciar uma rica experiência docente nos campos da Morfologia e Anatomia Humana, o que enriqueceu minha trajetória acadêmica e auxiliou na elucidação de importantes pontos

deste trabalho. Devo todo esse início à Professora Telma Sumie Masuko, um exemplo de dedicação e amor pelo que faz. Em tempo, agradeço aos demais professores do referido Departamento com quem muito aprendi, mesmo quando não estavam ensinando. Sinceros agradecimentos pelos conhecimentos de Anatomia e de Humanidades às Professoras Eliana Câmara, Laíse Monteiro, Juciele Valéria e Marcelle Rossi, e aos professores Alexandre Ribeiro e Bruno Linhares, tão parceiros sempre.

Não poderia deixar de agradecer ao Professor Rennan Geovanny e a Samir Hipólito, pelo apoio crucial nas análises químicas, e às Professoras Deise Vilas Boas e Rejane Santana, pelo apoio imprescindível à execução de diversas etapas do projeto, sempre muito solícitas, abriram os respectivos espaços laboratoriais e proporcionaram ambientes onde pude trabalhar de forma tranquila e prazerosa. Agradeço ao Professor e patologista Diogo Lago Morbeck, pelo tempo e paciência em examinar todas as lâminas histológicas comigo, durante seus horários de plantão. Sou imensamente grata também aos funcionários Aline Helenita e ao veterinário Felipe que tanto me ajudaram, até mesmo enquanto atravessávamos a pandemia de COVID-19. Há quatro anos atrás, havia da minha parte muita insegurança no manejo dos animais, mas a companhia e o auxílio de Felipe foram essenciais para todo o aprendizado que acumulei até aqui. Aline me deu uma grande e incansável colaboração para execução de toda parte histológica e por isso agradeço muito também!

Por fim, agradeço à Alex Alves da Paixão, meu amor e companheiro de todas as horas, um anjo que Deus colocou na minha vida.

Obrigada a todos vocês. Sozinha eu jamais teria conseguido chegar até aqui.

O amor é um mágico. Transforma o estudo em prazer. O amor transforma você em um vencedor. Não pela vaidade de vencer. Mas porque vencer faz parte de toda história de amor.

Samer Agi

DOURADO, Raísa Cavalcante. **Efeitos da redução do tempo de fixação em glutaraldeído e da descelularização sobre as características do pericárdio bovino e sua calcificação *in vivo***. 2022. Orientador: Márcio Cajazeira Aguiar. 135 f. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RESUMO

Introdução: Biopróteses valvulares cardíacas, fabricadas com pericárdio bovino fixado em glutaraldeído, são as mais utilizadas para substituir válvulas defeituosas na doença valvar cardíaca. Entretanto, requerem substituição entre 10 a 15 anos após implantação, por degeneração estrutural associada à calcificação que ocorre nos folhetos de pericárdio bovino da bioprótese. As principais estratégias para minimizar a calcificação tardia pós-implante são voltadas para o processamento químico desse pericárdio. A redução do tempo de fixação com glutaraldeído, a incubação em aminoácidos para a inativação dos aldeídos residuais de glutaraldeído e a descelularização prévia do pericárdio bovino já foram sugeridas na literatura, mas carecem de maior investigação para uma efetiva aplicação clínica. Além disso, o efeito combinado das referidas técnicas anticálcificantes ainda não foi estudado. **Objetivo:** Avaliar o efeito da descelularização e da redução do tempo de fixação com glutaraldeído sobre as propriedades físicas de pericárdios bovinos, em comparação com pericárdios certificados, bem como analisar o efeito desses tratamentos sobre a calcificação *in vivo* de pericárdios bovinos destinados ao uso em biopróteses valvulares cardíacas. **Material e métodos:** Os pericárdios bovinos foram divididos em grupos: PB10d (fixados com glutaraldeído por 10 dias), PB5d (fixadas com glutaraldeído por 5 dias) – ambos celularizados, e PB5dAC (amostras acelulares e fixadas com glutaraldeído por 5 dias). Após a fixação, todas as amostras foram tratadas em solução do aminoácido ácido glutâmico e caracterizadas por testes mecânicos e de estabilidade térmica, além da avaliação histológica por microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e análise para o teor de cálcio por espectrometria de emissão óptica, com plasma indutivamente acoplado. Os tecidos foram implantados em tecido subcutâneo de ratos e foram obtidos explantes seriados após 7, 14, 28, 60 e 120 dias foram submetidos à nova avaliação com as mesmas técnicas supracitadas. **Resultados:** A análise microscópica revelou modificações nas fibras colágenas e elásticas nos grupos de PB10d e PB5dAC, mas não houve alterações nas propriedades mecânicas e térmicas teciduais. Para todos os tempos biológicos empregados no estudo, a reação inflamatória foi similar entre PB5d e PB5dAC e menos intensa em comparação com PB10d. Os valores de calcificação foram baixos em todos os grupos, com um menor conteúdo de cálcio em PB5dAC. **Conclusão:** O tratamento combinado de descelularização, fixação com glutaraldeído por 5 dias e pós-tratamento com ácido glutâmico diminuiu a calcificação e a inflamação do pericárdio bovino em um modelo de implantação subcutânea em ratos, sem alterar as propriedades físicas e biológicas, importantes para a confecção de BVCs.

Palavras-chave: biopróteses; calcificação; pericárdio bovino; glutaraldeído; descelularização; ácido glutâmico

DOURADO, Raísa Cavalcante. **Effects of reduced glutaraldehyde fixation time and decellularization on the characteristics of bovine pericardium and its calcification in vivo**. 2022. Advisor: Márcio Cajazeira Aguiar. 135 s. Dissertation (Master in Interactive Processes of Organs and Systems) – Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2022.

ABSTRACT

Introduction: Bioprosthetic heart valves manufactured with bovine pericardium fixed in glutaraldehyde are the most used to replace defective valves in heart valve disease. However, they require replacement between 10 and 15 years after implantation, due to structural degeneration that is associated with calcification that occurs in bovine pericardium leaflets of bioprosthesis. The main strategies to minimize late post-implantation calcification are focused on the chemical processing of bovine pericardium. The reduction of fixation time with glutaraldehyde, the incubation in amino acids for the inactivation of residual glutaraldehyde aldehydes and the previous decellularization of bovine pericardium have already been suggested by literature, but they need further investigation for an effective clinical application. Furthermore, the combined effect of said anti-calcification techniques has not yet been studied. **Objective:** To evaluate the effect of decellularization and reduction of fixation time with glutaraldehyde on physical properties of bovine pericardium samples compared to bovine certified pericardium samples, as well as to analyze the effect of these treatments on in vivo calcification of bovine pericardium samples intended for use in heart valves bioprostheses. **Material and methods:** The bovine pericardium samples were divided into groups: BP10d (fixed with glutaraldehyde for 10 days), BP5d (fixed with glutaraldehyde for 5 days) - both cellularized, and BP5dAC (acellular samples and fixed with glutaraldehyde for 5 days). After fixation, all samples were treated in glutamic acid amino acid solution and characterized by mechanical and thermal stability tests, in addition to histological evaluation by light microscopy, scanning electron microscopy and analysis for the content of calcium by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. The tissues were implanted in subcutaneous tissue of rats and serial explants that were obtained after 7, 14, 28, 60 and 120 days were submitted to a new evaluation by ML, SEM and ICP-OES. **Results:** Microscopic analysis revealed changes in collagen and elastic fibers in the BP10d and BP5dAC groups, but there were no changes on tissue mechanical and thermal properties. For all biological times employed in the study, inflammatory reaction was similar between BP5d and BP5dAC and less intense compared to BP10d. Calcification values were low in all groups, with a lower calcium content in BP5dAC. **Conclusion:** The combined treatment of decellularization, fixation with glutaraldehyde for 5 days and post-treatment with glutamic acid decreased bovine pericardium calcification and inflammation in a model of subcutaneous implantation in rats, without altering physical and biological properties which are important for the manufacture of bioprosthetic heart valves.

Keywords: bioprostheses; calcification; bovine pericardium; glutaraldehyde; decellularization; glutamic acid

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1	Válvula aórtica Regent®, St. Jude medical.....	27
Figura 2	Válvula biológica Hancock®.....	29
Figura 3	Camadas do pericárdio em coração humano.....	30
Figura 4	Organização de fibras em fibrilas e estrutura tripla hélice do colágeno...	31
Figura 5	Desenho esquemático de ligações cruzadas estabelecidas entre as fibrilas de colágeno.....	33
Figura 6	Fórmula molecular e estrutural do glutaraldeído.....	36
Figura 7	Reação entre grupo amino e aldeído para formação da base de Schiff.....	37
Figura 8	Modelo esquemático da molécula de tropocolágeno com destaque para os grupamentos amínicos (A). Modelo de reticulação polimérica das cadeias da molécula de colágeno com monômeros simples de glutaraldeído (B) e com formas poliméricas deste (C).....	45

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 9	Fluxograma com as etapas do processamento tecidual das amostras dos três grupos experimentais.....	60
Figura 10	Equipamento de teste de temperatura de encolhimento (Braile Biomédica®)	62
Figura 11	Torre do dispositivo de tração modelo Qtest/1L, marca MTS, série M206170/102398, com célula de carga de 1000 N (A) e garras para fixação dos corpos de prova para os ensaios (B).....	63
Figura 12	Etapas do procedimento cirúrgico. Lavagem dos biomateriais (A), tricotomia (B), incisões cutâneas (C), divulsão para criação de bolsa subcutânea (D), implantação do biomaterial (E), e sutura (F).....	65
Figura 13	Distribuição das amostras explantadas (n=10 para cada tempo biológico), de acordo com a análise submetida	66

ARTIGO 1

Figura 1	Fotomicrografias de PB pré-implantação dos grupos PB5d e PB10d.....	78
Figura 2	Microscopia eletrônica de varredura de PB pré-implantação dos grupos PB5d e PB10d.....	79

Figura 3	Fotomicrografias de PB explantados dos grupos PB5d e PB10d após 7, 14, 28, 60 e 120 dias.....	81
Figura 4	Fotomicrografias de PBs dos grupos PB5d e PB10d explantados após 120 dias.....	82
Figura 5	Análise EDX dos pericárdios bovinos dos grupos PB5d e PB10d explantados após 120 dias.....	85

ARTIGO 2

Figura 1	Microscopia eletrônica de varredura de PB pré-implantação dos grupos PB5d e PB5dAC.....	100
Figura 2	Pericárdio bovino pré-implantação: PB5d (A, C e E) e PB5dAC (B, D e F).....	101
Figura 3	Pericárdio bovino pós-implantação: PB5d e PB5dAC explantados após 60 dias.....	103

LISTA DE GRÁFICOS

ARTIGO 1

- Gráfico 1** Diagrama de box plot para teor de cálcio em μg de Ca^{2+} /mg de tecido seco de pericárdio bovino dos grupos PB5d e PB10d, explantados após 7, 14, 28, 60 e 120 dias, pelo método do ICP-OES..... **86**

ARTIGO 2

- Gráfico 1** Diagrama de box plot para teor de cálcio em μg de Ca^{2+} /mg de tecido seco de pericárdio bovino dos grupos PB5d e PB5dAC, explantados após 14, 28 e 60 dias, pelo método ICP-OES..... **105**

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1	Tipos de PB de acordo com o tempo de fixação em GA e a presença ou não de células.....	58
Tabela 2	Distribuição dos animais de acordo com o grupo experimental e o ponto biológico.....	64

ARTIGO 1

Tabela 1	Propriedades térmicas e mecânicas de PB dos grupos PB5d e PB10d.....	79
Tabela 2	Resultados da avaliação semiquantitativa da resposta tecidual ao pericárdio bovino dos grupos PB5d e PB10d, explantado após 7, 14, 28, 60 e 120 dias.....	84

ARTIGO 2

Tabela 1	Propriedades mecânicas e térmicas de PB dos grupos PB5d e PB5dAC.....	102
Tabela 2	Resultados da avaliação semiquantitativa da resposta tecidual ao pericárdio bovino dos grupos PB5d e PB5dAC, explantado após 14, 28 e 60 dias.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

BVC	Bioprótese Valvular Cardíaca
Ca ²⁺	Cálcio ionizado
DVC	Doença Valvar Cardíaca
EDX	Espectroscopia de raios X por energia dispersiva
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GA	Glutaraldeído
GAGs	Glicosaminoglicanos
GAPB	Pericárdio Bovino fixado em Glutaraldeído
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado
ISO	International Organization for Standardization
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ML	Microscopia de Luz
PB	Pericárdio Bovino
PB10d	Pericárdio Bovino fixado por 10 dias
PB5d	Pericárdio Bovino fixado por 5 dias
PB5dAC	Pericárdio Bovino acelular fixado por 5 dias
pH	Potencial Hidrogeniônico
PO ₄ ³⁻	Fórmula química do grupo Fosfato
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
Ts	Temperatura de encolhimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 JUSTIFICATIVA.....	22
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
4.1 DOENÇA VALVAR CARDÍACA (DVC)	24
4.2 SUBSTITUTOS VALVARES PROTÉTICOS.....	25
4.3 TECIDO DE PERICÁRDIO BOVINO (PB)	30
4.4 PRÉ-TRATAMENTO LABORATORIAL DO PB (FIXAÇÃO QUÍMICA)	33
4.5 MECANISMO DE FIXAÇÃO DO PB COM GLUTARALDEÍDO (GA).....	35
4.6 FATORES QUE LIMITAM A LONGEVIDADE DAS BIOPRÓTESES VALVULARES CARDÍACAS (BVCs) FIXADAS COM GA.....	37
4.6.1 Danos por fadiga mecânica.....	37
4.6.2 Consequências da calcificação distrófica	38
4.7 FATORES QUE INFLUENCIAM A CALCIFICAÇÃO DAS BVCS.....	39
4.7.1 Idade e outros fatores individuais sobre a calcificação das BVCs..	40
4.7.2 Efeito dos fosfolipídios no PB sobre a calcificação das BVCs.....	42
4.7.3 Componentes da Matriz Extracelular (MEC) do PB como sítios nucleadores de cálcio.....	43
4.7.4 Efeito do glutaraldeído na calcificação das BVCs.....	44
4.8 ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DA CALCIFICAÇÃO DO PB EM BVCS	46
4.8.1 Pré-tratamento do PB para remoção de detritos celulares.....	47
4.8.2 Modificação do método de reticulação do PB.....	49
<i>Métodos de preparação para BVC que não utilizam o GA</i>	49
<i>Modificação na superfície do Pericárdio Bovino fixado em Glutaraldeído GAPB).....</i>	51
<i>Modificações no protocolo de fixação do PB com GA.....</i>	52

4.8.3 Pós-tratamento para inativação de grupos aldeídos livres derivados do GA.....	55
4.8.4 Combinação de métodos anticalcificantes.....	56
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
5.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	58
5.2 PREPARAÇÃO TECIDUAL.....	58
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL.....	61
5.3.1 Teste de estabilidade térmica.....	61
5.3.2 Testes mecânicos.....	62
5.4 IMPLANTE SUBCUTÂNEO EM RATOS.....	63
5.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA (PRÉ E PÓS-IMPLANTAÇÃO)	67
5.5.1 Análise por microscopia de luz (ML)	67
5.5.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	68
5.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA (PÓS-IMPLANTAÇÃO).....	68
5.7 ANÁLISE DO TEOR DE CÁLCIO (PRÉ E PÓS-IMPLANTAÇÃO).....	68
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
6 RESULTADOS.....	71
6.1 ARTIGO 1: Efeitos do tempo de fixação com glutaraldeído sobre as características do pericárdio bovino e sua calcificação in vivo: implicações para o método ideal de fixação utilizado em biopróteses valvulares cardíacas.....	71
6.2 ARTIGO 2: Estudo comparativo das propriedades físicas e calcificação do pericárdio bovino após um tratamento anticalcificante com ou sem descelularização.....	94
7 DISCUSSÃO.....	114
8 CONCLUSÃO.....	119
REFERÊNCIAS.....	120
ANEXO – Comissão de Ética no Uso de Animais	134

1 INTRODUÇÃO

Muitos pacientes com doença valvar cardíaca (DVC) se submetem a intervenções cirúrgicas para a substituição de valvas defeituosas por biopróteses valvulares cardíacas (BVC), fabricadas principalmente a partir de pericárdio bovino (PB). Outra opção de substituto valvar são as próteses mecânicas, menos utilizadas ao devido alto potencial trombogênico.¹ Um aspecto importante para garantir propriedades adequadas das biopróteses de PB é a fixação tecidual com glutaraldeído (GA), principal reagente químico utilizado na preparação do PB destinado às BVCs, para reduzir a imunogenicidade e aumentar a resistência à degradação enzimática no organismo receptor.²

O GA é um dialdeído capaz de interagir de modo permanente com a matriz colagênica, por meio de ligações cruzadas intra e interproteicas que melhoram a estabilidade mecânica e a preservação estrutural de *patches* empregados em reparos vasculares e de biopróteses de PB.³ No entanto, os dispositivos valvares preparados com o PB fixado com GA (GAPB) tem durabilidade limitada e requerem substituição no período de 10 a 15 anos após implantação, por falhas de funcionamento associadas à deterioração estrutural dos folhetos teciduais de PB. Tais falhas podem ser causadas por fadiga mecânica e por calcificação distrófica.⁴⁻⁶

O mecanismo de calcificação das biopróteses é multifatorial e pouco compreendido, mas há evidências de que fosfolipídios teciduais, provenientes de células desvitalizadas, e a presença de grupos aldeídos livres residuais, derivados do tratamento com o GA, tenham um papel importante na formação de focos de calcificação por serem sítios de alta afinidade para deposição de cálcio.⁷⁻⁹ O tecido biológico, mesmo após o tratamento químico com GA, pode conter formas residuais de aldeídos, pois em soluções de GA podem formar-se diferentes espécies químicas poliméricas relacionadas com a liberação lenta de grupos aldeídos livres no tecido fixado⁸. Além disso, a presença de grupos de aldeídos no tecido fixado também pode ser resultante da reação incompleta de GA com proteínas de tecido.¹⁰

Com intuito de melhorar as válvulas cardíacas de tecido fabricadas com PBs, existe um grande interesse em minimizar a calcificação pós-implantação. Uma bioprótese de GAPB ideal é aquela que induz o mínimo de calcificação, enquanto preserva o máximo de suas propriedades mecânicas.^{8,11-13} Ao longo das últimas décadas, várias estratégias anticalcificantes têm sido investigadas, incluindo a remoção de fosfolipídios e a redução de grupos aldeídos livres no tecido. Os métodos para diminuir os grupos de aldeídos residuais

disponíveis para a calcificação no PB incluem a redução do tempo de fixação com GA e a neutralização desses grupos funcionais por incubação do tecido em soluções com aminoácidos.

Sabe-se que a etapa de fixação com GA é essencial para reduzir a antigenicidade e melhorar a estabilidade biomecânica do GAPB pós-implantação.¹⁴⁻¹⁶ Contudo, o GA parece danificar a matriz extracelular (MEC) do GAPB, o que predispõe o tecido ao estresse mecânico e compromete a durabilidade da bioprótese em longo prazo.^{17,18} De forma promissora, há estudos que mostram a preservação de propriedades físicas de PBs submetidos a curtos períodos de incubação em GA.^{14,19-21} Sendo assim, seria possível supor que o tempo de fixação com GA de PB, destinados ao uso em biopróteses, poderia ser reduzido para diminuir os efeitos indesejáveis produzidos por esse reagente químico, com a preservação das propriedades mecânicas necessárias para seu emprego na substituição de valvas cardíacas.

A incubação de PB fixado com GA em soluções de aminoácidos é uma outra estratégia para reduzir a influência dos aldeídos residuais na calcificação do PB. Estudos com diferentes aminoácidos já demonstraram que esse procedimento reduz a calcificação de biopróteses, em comparação com materiais processados apenas com GA²²⁻²⁴, pois os aminoácidos reagem com os aldeídos livres no tecido, com a consequente inativação desses. Assim, pode-se reduzir de modo permanente a disponibilidade de grupos eletrofílicos expostos à ligação com íons cálcio. Esta técnica está associada à exposição de tecidos biológicos sob pH ácido²⁵ ou alcalino²⁶, pois, em ambos os valores de pH, as espécies poliméricas de GA podem ser despolimerizadas. Por conseguinte, os grupos aldeídos livres no tecido fixado podem ser neutralizados com um aminoácido natural que reage com esses grupos e formam ligações químicas estáveis que resistem aos processos hidrolíticos, quando expostos a condições fisiológicas.²⁷

O uso do aminoácido ácido glutâmico no processamento de GAPBs destinados à fabricação de biopróteses não tem sido amplamente relatado na literatura, mas alguns estudos já demonstraram uma alta eficácia anticalcificante desse agente em tecidos GAPB, implantados em subcutâneo de ratos²⁸⁻³⁰, sem alterar as propriedades físicas dos tecidos tratados.³¹

Outra forma de mitigar as taxas de calcificação observadas em biopróteses de PB seria submetê-lo a um processo prévio de descellularização. Esta técnica laboratorial visa à remoção de material celular e nuclear potencialmente capaz de interagir com o cálcio^{32,33}, além de diminuir a sua antigenicidade e o risco de rejeição ao enxerto.⁴ O uso clínico bem sucedido

do PB para aplicações cardiovasculares depende da preservação das suas propriedades mecânicas, como resistência à tração, módulo de elasticidade e resistência à fratura. Assim, uma técnica de descelularização ideal deve remover o material celular com mínimos danos à MEC, pois a arquitetura e o conteúdo das fibras colágenas e elásticas dos folhetos teciduais de PB são responsáveis por sustentar a resposta mecânica das próteses.^{6,34}

Contudo, alguns tratamentos de descelularização falham em preservar a estrutura original do PB, ainda que alguns trabalhos tenham demonstrado um efeito anticalcificante com boa preservação da estrutura colagênica de PBs, após o seu processamento.^{17,33,35,36} Assim, estudos adicionais *in vivo* são necessários para determinar se a descelularização produziria materiais mais biocompatíveis e com propriedades anticalcificantes e biomecânicas superiores às biopróteses comercialmente disponíveis.

O processo de descelularização emprega métodos físicos, biológicos e químicos e muitos protocolos têm sido desenvolvidos com diferentes substâncias químicas, concentrações e tempos de exposição.^{36,37} Os agentes químicos mais utilizados são os detergentes iônicos (Triton X-100), não iônicos (desoxicolato de sódio, dodecilsulfato de sódio - SDS) e agentes enzimáticos biológicos (DNase, RNase, tripsina).³⁷⁻³⁹ No entanto, muitas das propriedades mecânicas, estruturais ou biológicas são alteradas no processo de descelularização.⁴⁰⁻⁴²

Recentemente, a Braile Biomédica® desenvolveu um protocolo para descelularização de PB a base de surfactantes iônico dodecil sulfato de sódio (SDS) e neutro (Triton X-100) que não altera a carga eletrostática da molécula de colágeno, o que é importante para manutenção da sua estrutura. O material processado pela técnica apresentou biocompatibilidade adequada em ensaios *in vitro* (ISO 10993-3, 10993-4, 10993-5, 10993-6, 10993-10, 10993-11) e *in vivo*, em modelos animais de queimadura⁴³ e como matriz transdérmica sobre implantes de prótese mamária.⁴⁴ Para o uso em cirurgia cardiovascular, novas pesquisas são aguardadas.

Com base no exposto, considerando os resultados alcançados por estudos que avaliaram a influência de algumas técnicas laboratoriais sobre o material GAPB, seria relevante a realização de um estudo experimental com base na união das técnicas de descelularização, a redução do tempo de fixação com GA e o pós-tratamento com ácido glutâmico, a fim de avaliar a sua influência sobre a calcificação e a respostas inflamatória. Nesse sentido, existem evidências de que a combinação de estratégias anticalcificantes pode resultar em um efeito sinérgico vantajoso para aumentar a durabilidades das BVCs.^{10,23,24,45}

Sabendo-se que algumas estratégias anticalcificantes podem danificar a MEC do PB e causar distorções em suas propriedades mecânicas - as quais podem interferir no funcionamento e na durabilidade deste material, quando empregado como substituto valvar - a caracterização física do material é essencial para avaliar o impacto dessas estratégias sobre o pericárdio, particularmente quando essas técnicas estão associadas.

O presente trabalho avaliou os efeitos da descelularização e da redução do tempo de fixação de PB nas características físicas do material antes da implantação e na calcificação, após a implantação em tecido subcutâneo de rato. Para avaliar o efeito da união de diferentes técnicas anticalcificantes, elas foram combinadas entre si e com o pós-tratamento em ácido glutâmico para inativação de aldeídos residuais. As interações com o meio fisiológico, induzidas após a implantação, foram observadas por meio de avaliação histológica dos tecidos explantados, com base em parâmetros como o grau de calcificação, a resposta inflamatória, neovascularização e preservação da estrutura original de colágeno e elastina.

2 JUSTIFICATIVA

O GAPB continua sendo o material de escolha para a fabricação de BVC, por apresentar características histológicas semelhantes ao de valvas cardíacas humanas naturais, além de ter maior biocompatibilidade e menor trombogenicidade em relação aos materiais de origem sintética. No entanto, a obtenção de materiais biocompatíveis, com menor potencial calcificante e com características físicas adequadas, continua sendo um desafio para aumentar a longevidade clínica dos substitutos valvares.

Muitas estratégias anticalcificantes vêm sendo investigadas, tais como a redução do tempo de fixação do PB em GA, a descellularização tecidual prévia e o tratamento com ácido glutâmico. Diferentes experimentos envolvendo essas técnicas foram realizados e demonstraram resultados preliminares promissores. Contudo, novos estudos sob diferentes conjuntos de condições experimentais são aguardados para uma efetiva aplicação. Para iniciar a fabricação de biopróteses de PB, o material deve, além de apresentar taxas mínimas de calcificação, sustentar uma performance mecânica adequada ao uso clínico e atender aos requisitos de biocompatibilidade previstos (ISO 10993-6, 2016).

Nesse sentido, a metodologia da presente pesquisa foi planejada de forma que as suas descobertas pudessem ter efeitos diretos no desenvolvimento de novas biopróteses. Para isso, estudaram-se os efeitos das referidas técnicas de processamento sobre a resposta biológica, mediante modelo de implantação do material em animal e analisaram-se também as propriedades físicas do material, que são altamente dependentes da condição de processamento e têm efeitos diretos no desenvolvimento de novas BVCs. Além disso, sabendo-se que a performance clínica de uma bioprótese de PB pode ser ampliada pela união de várias técnicas anticalcificantes, este estudo avaliou de forma inédita o efeito combinado das diferentes estratégias anticalcificantes supracitadas.

3 OBJETIVOS

Esta seção apresenta os objetivos estabelecidos para este estudo, segundo o tipo de pesquisa adotado.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da redução do tempo de fixação com GA e da descelularização sobre as propriedades físicas do PB e a calcificação *in vivo* do tecido em um modelo de implantação subcutânea em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar as propriedades físicas (térmicas e mecânicas) do PB fixado com GA por 5 dias e compará-lo com tecidos de PB fixados por 10 dias;
- ✓ Comparar a resposta inflamatória e a calcificação induzida por tecidos de PB fixados em GA, sob tempo reduzido e tempo padrão;
- ✓ Caracterizar as propriedades térmicas e mecânicas do PB acelular fixado com GA por 5 dias e compará-lo com tecidos de PB não descelularizados;
- ✓ Comparar a resposta inflamatória e a calcificação induzida por tecidos de PB acelular fixado com GA por 5 dias e PBs não descelularizados fixados por 5 dias;
- ✓ Avaliar, por análise de teor de cálcio, os efeitos de um protocolo combinado de descelularização, fixação com GA por 5 dias e tratamento com ácido glutâmico para evitar a calcificação de PB para confecção de BVC;

4 REVISÃO DE LITERATURA

Esta seção apresenta a base teórica que deu sustentação a esta pesquisa, dividida em oito subseções.

4.1 DOENÇA VALVAR CARDÍACA (DVC)

A doença valvar cardíaca (DVC) abrange um conjunto de entidades clínicas que afetam o funcionamento das valvas cardíacas, estruturas compostas de tecido conjuntivo denso e endotélio que auxiliam no fluxo unidirecional do sangue pelo coração. Existem quatro valvas cardíacas: (1) a valva atrioventricular esquerda (mitral) ou bicúspide, que apresenta duas cúspides e possibilita o fluxo sanguíneo entre átrio e ventrículo esquerdos; (2) a valva atrioventricular direita ou tricúspide, que apresenta três cúspides e possibilita o fluxo sanguíneo entre átrio e ventrículo direitos; (3) a valva do tronco pulmonar, localizada na saída do ventrículo direito para o tronco pulmonar; (4) e a valva da aorta, localizada na saída do ventrículo esquerdo para a artéria aorta.

As alterações valvares podem ser congênitas ou adquiridas por condições sistêmicas ou locais. Os fatores causais mais conhecidos são a febre reumática, endocardites, doenças autoimunes, doença coronariana, cardiomiopatia, calcificação degenerativa associada com a idade, tabagismo, hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes *mellitus*, síndrome metabólica e alterações locais sem fatores de risco conhecidos, como prolapso da valva mitral.⁴⁷ Outras causas emergentes incluem a doença valvar induzida por radiação e medicamentos.³⁸ Sabidamente, fatores socioeconômicos influenciam nos padrões epidemiológicos da DVC, pois a morbimortalidade dessa doença em países de baixa renda relaciona-se, muitas vezes, com a febre reumática, enquanto a maioria dos casos de DVC nos países de alta renda está associada ao processo de calcificação degenerativa, sobretudo da valva aórtica.⁴ De forma geral, em todo o mundo, há uma crescente prevalência de valvopatias e a demanda por intervenções deverá atingir 850 mil pessoas até 2050.⁴⁸

Sabe-se que a incidência de DVCs aumenta com a idade e a estimativa global é de que aproximadamente 40% das pessoas acima de 75 anos apresentem algum grau de calcificação valvar, sem efeito hemodinâmico ou com estenose aórtica grave, que requer substituição valvar.³⁸ Dados do *Euro Heart Survey on Valve Heart Disease* indicaram uma incidência de

6% de DVC para doença mitral e aórtica em pacientes com idade ≥ 75 anos, enquanto a incidência foi inferior a 1% nos pacientes mais jovens (idade < 64 anos).⁴⁹ Em estudo prospectivo, Nkomo e colaboradores (2006) observaram os resultados de exames ecocardiográficos em 11.911 adultos, em três grandes estudos epidemiológicos de base populacional. Ao final do estudo, 615 pacientes (5,1%) apresentaram alterações valvares moderadas ou graves. Não houve diferenças quanto ao sexo dos indivíduos acompanhados, mas a prevalência de doença valvar aumentou significativamente com a idade, de 0,7% no grupo composto de 18 a 44 anos para 13,3% no grupo de 75 anos ou mais.⁵⁰

O aumento da prevalência de DVCs relaciona-se, portanto, com o progressivo envelhecimento da população mundial e com o surgimento de fatores de risco associados à novos estilos de vida em países industrializados, como é o caso das valvopatias relacionadas a fármacos supressores do apetite e ao tratamento da enxaqueca.¹ De acordo com um estudo de coorte populacional no Reino Unido, o número de idosos com DVC deve dobrar até 2056⁵¹, motivo pelo qual a DVC já foi descrita como a “próxima epidemia cardíaca”.³⁸ Embora a prevalência de DVC seja menor quando comparada a doenças cardíacas coronárias, as anormalidades valvares representam um importante problema de saúde pública, com altas taxas de morbimortalidade, necessidade de acompanhamento de longo prazo, grande complexidade e altos custos de tratamento e impactos aos sistemas de saúde.^{1,38}

Até o momento, não existe nenhuma terapia médica comprovada para tratar ou reverter a deterioração das valvas cardíacas e a evolução do quadro pode levar a disfunções, como estenose ou regurgitação. Nesses casos, a sua substituição representa a única opção, sempre que a valvoplastia estiver contraindicada.^{52,53} A cirurgia para tal substituição é um procedimento usual, que consiste na excisão das valvas nativas e sua substituição por próteses valvulares.⁵⁴ O implante de prótese valvular é o tratamento de escolha para DVCs em todo o mundo, mesmo em pacientes idosos. Estima-se que sejam realizadas anualmente cerca de 300 mil cirurgias de substituição da valva aórtica e esse número cresce anualmente na maioria dos países⁴⁸, sobretudo após o advento de dispositivos percutâneos para tratamento cirúrgico de substituição valvar.^{33,48}

4.2 SUBSTITUTOS VALVARES PROTÉTICOS

Com o desenvolvimento de sistemas de circulação extracorpórea na década de 1950, o escopo das cirurgias de valvas cardíacas pôde ser ampliado, permitindo-se reverter ou

minimizar os danos funcionais cardíacos causados pelas valvopatias. As substituições de valvas aórticas tornaram-se possíveis à época e próteses valvulares do tipo mecânicas foram os primeiros substitutos valvares utilizados em larga escala.⁵⁵

O prognóstico das primeiras cirurgias de substituição das valvas cardíacas era ruim, visto que os primeiros modelos de válvulas mecânicas apresentavam problemas de integridade estrutural e estavam relacionados à alta incidência de trombos, eventos tromboembólicos e baixo desempenho hemodinâmico. Esse panorama estimulou o desenvolvimento de estudos que buscassem próteses valvulares com resultados clínicos mais favoráveis, menor trombogênicidade, melhor hemodinâmica e maior durabilidade. Na década de 1960, o desenvolvimento de substitutos valvares com novos desenhos e confeccionados com materiais mais resistentes aumentou a performance das próteses mecânicas. A evolução dos modelos seguiu das primeiras válvulas mecânicas, do tipo “bola e gaiola” (montada em um anel circular de onde saem dois arcos em “U” formando uma gaiola, em cujo interior existe uma esfera que excursiona passivamente), para a segunda geração de válvulas em monodisco (formadas por um anel metálico e um disco basculante único que se abre perpendicularmente ao anel) e, por último, à terceira geração de válvulas, a válvula de duplo hemidisco, montada em um anel metálico, onde existem dois hemidiscos basculantes presos ao anel.⁵⁶

Nenhum desses desenhos se assemelha às valvas naturais, mas permitiram uma hemodinâmica adequada, sendo que as válvulas de duplo hemidiscos se tornaram o modelo mais utilizado dentre as válvulas mecânicas. Durante seu funcionamento, os hemidiscos se abrem de forma quase total (85 graus) e esta grande abertura causa pouca resistência ao fluxo, fato que as torna menos restritiva. A Figura 1 mostra uma prótese mecânica atual para substituição da valva aórtica, com formato de duplo hemidisco de carvão pirolítico. O *design* das válvulas mecânicas mais modernas promoveu melhorias ao fluxo sanguíneo e consequente diminuição dos eventos tromboembólicos em relação aos modelos anteriores. No entanto, ainda há problemas de tromboembolismo e hemorragias relacionadas com o tratamento anticoagulante obrigatório nos pacientes portadores de dispositivos valvares mecânicos.⁵⁷

Apesar do avanço alcançado nas últimas décadas, o principal desafio para utilização das válvulas mecânicas continua sendo o alto potencial tromboembólico dos materiais utilizados para sua preparação, seja titânio, liga de cromo-cobalto, aço carbono ou carbono pirolítico.^{58,59} As próteses valvulares mecânicas estão associadas a um risco substancial de tromboembolismo sistêmico e oclusão trombótica, em grande parte devido a superfícies não

fisiológicas e a anormalidades de fluxo criado por um ou mais oclusores rígidos. A disfunção obstrutiva dessas próteses pode decorrer de trombose da prótese, desenvolvimento de tecido fibroso (“*pannus*”) na presença de microtrombos ou uma associação das duas entidades citadas.

Para minimizar esses riscos, a terapia de anticoagulação é necessária em todos os pacientes portadores de válvulas mecânicas, de forma permanente. No entanto, esse tratamento torna os pacientes vulneráveis a complicações hemorrágicas, potencialmente graves. Assim, o risco combinado de complicações tromboembólicas e hemorragias constitui a principal desvantagem das válvulas mecânicas.⁶⁰ Outra desvantagem é que a implantação de válvulas desse tipo em crianças requer reoperação em médio prazo porque esses substitutos são incapazes de expandir proporcionalmente com o crescimento do paciente.⁶¹ Além disso, apresentam ruído audível em funcionamento e não apresentam flexibilidade para serem acomodadas em dispositivos para implantação percutânea - modalidade cirúrgica que mais cresce na atualidade para substituição de valvas defeituosas.^{1,60}

Figura 1. Válvula aórtica Regent®, St. Jude Medical



Fonte: St. Jude Medical.*

* Disponível em: <https://healthmanagement.org/products/view/aortic-valve-prosthesis>. Acesso em 01 jun. 2022

Paralelamente ao desenvolvimento das válvulas mecânicas, ocorreu o desenvolvimento das BVCs preparadas a partir de tecidos biológicos. As BVCs têm sido usadas desde o início da década de 1960 e podem ser obtidas a partir de tecido próprio do indivíduo, denominadas autógenas; referem-se a tecido proveniente de outros doadores da mesma espécie, alógenas, e a partir de espécies diferentes, denominadas xenógenas.⁵⁶

O mais antigo substituto valvar biológico foi a valva aórtica alógena “fresca”, extraída do coração de um doador e suturada diretamente ao anel valvar e à parede aórtica do receptor.⁶² Outros enxertos valvares alógenos consistiram de valvas aórticas criopreservadas coletadas de cadáveres humanos.⁵⁶ Porém, a dificuldade na obtenção de tecidos naturais humanos e as complicações decorrentes de seu uso, tais como as infecções cruzadas, levaram os pesquisadores a desenvolver técnicas que permitissem o uso de outros tecidos biológicos.

Atualmente, as biopróteses cardíacas são fabricadas a partir de tecidos xenógenos. Essas próteses podem ser desenvolvidas a partir de valvas naturais inteiras ou montadas a partir de folhetos de tecidos não valvares. O primeiro caso se aplica às valvas aórticas porcinas, utilizadas em sua forma original, costuradas sobre um anel semirrígido de suporte (model *stent*) ou sem armação de suporte (*stentless*), cuja implantação se torna tecnicamente mais complexa. As três cúspides da valva natural são mantidas na confecção da prótese para garantir perfeita coaptação e distribuição de tensões.⁶³

Outra alternativa mais comum envolve a construção de valvas a partir de tecidos não valvares, geralmente de pericárdio bovino ou suíno. Quanto à origem desse tecido, alguns estudos já demonstraram que pericárdio de avestruz e canguru tem propriedades histológicas superiores em comparação ao de outros animais, mas devido à baixa disponibilidade, os pericárdios de origem suína e bovina são os mais indicados.⁶⁴

O pericárdio suíno é adequado para bioprótese valvular aórtica, pois apresenta propriedades viscoelásticas mais próximas da valva aórtica humana nativa.⁶⁵ Por outro lado, o PB é mais versátil, sendo indicado para a substituição da valva mitral, aórtica, tricúspide ou pulmonar e, por isso, é o tecido mais empregado para a confecção de biopróteses.¹ Além dessas, o PB também é utilizado como matéria-prima para enxertos arteriais tubulares, próteses padronizadas, próteses reconstrutivas geométricas e *patches* ou retalhos cirúrgicos no âmbito da cirurgia geral, cardiovascular, torácica, urológica e neurocirurgia.⁴¹

Nas próteses valvulares de PB, os fragmentos de tecido são cortados em forma de folhetos personalizados para montagem das cúspides, em um anel periférico de suporte (*stent*), feito de plástico flexível ou metal de titânio.⁴ A Figura 2 mostra uma bioprótese confeccionada a partir de folhetos flexíveis de PB, que compõem as cúspides valvares e um anel de poliacetal revestido de PB. Essa estrutura permite que os tecidos se assemelhem às valvas cardíacas nativas em geometria e estrutura^{63,66}, com os folhetos funcionando de forma similar aos de

uma valva cardíaca humana original, unindo-se uns aos outros para garantir o fluxo sanguíneo unidirecional.¹⁶

Figura 2. Valva biológica Hancock®



Fonte: Hancock.*

* Disponível em: <http://biocath.com.br/cirurgia-cardiaca/hancock-ii>. Acesso em 01 jun. 2022.

As opções atuais de substitutos valvares são, portanto, as próteses mecânicas e as próteses biológicas. Diferente das valvas mecânicas, que apresentam grande resistência à degradação, as valvas biológicas têm maior tendência à degradação estrutural, principalmente relacionada a um processo de calcificação degenerativa. A deposição de cristais de cálcio reduz o relaxamento e aumenta a dureza dos folhetos valvares, levando a falhas de funcionamento do implante, como estenose, regurgitação ou fratura das cúspides. Como consequência, decorridos 10 a 15 anos de seu implante, as próteses valvulares podem tornar-se defeituosas, levando à necessidade de sua substituição.^{4,48} Por outro lado, em contraste com as válvulas mecânicas, as válvulas teciduais mantêm uma baixa taxa de tromboembolismo, sem terapia anticoagulante. Suas cúspides são compostas de tecido animal não valvar, que é tipicamente mais resistente à formação de trombos e mais biocompatível do que materiais sintéticos.

Por exibir adicionalmente melhor geometria de abertura/fechamento e perfis hemodinâmicos semelhantes àqueles da valva cardíaca nativa, as BVCs são a primeira opção dos cirurgiões cardiovasculares, com um padrão central de fluxo próximo ao de valvas cardíacas naturais. Além disso, as BVCs têm baixa antigenicidade, boa estabilidade e podem ser utilizadas em implantação percutânea, técnica cirúrgica atualmente mais utilizada para tratamento de estenose aórtica grave, devido à previsibilidade e ao menor risco cirúrgico.^{45,52,57}

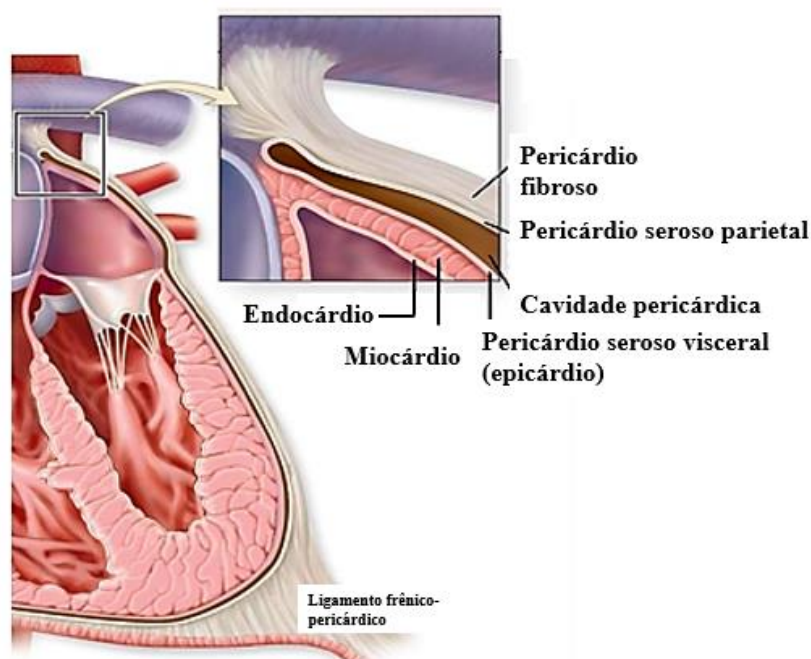
Por conta das características superiores exibidas pelas próteses biológicas em relação às mecânicas, as BVCs, especialmente de PB, são as mais empregadas em operações de substituição valvar e estima-se que esse tipo responda por aproximadamente 80% dos

implantes de válvulas aórticas.⁴⁸ A partir das primeiras décadas do século XXI, mais da metade de todas as cirurgias de valva aórtica compreendeu a substituição de próteses mecânicas feitas de carbono para biopróteses de PB, numa taxa aproximada de 85 mil implantações anuais nos Estados Unidos e 275 mil em todo o mundo, o que sugere uma mudança para um uso cada vez maior de válvulas de tecido.⁶⁷

4.3 TECIDO DE PERICÁRDIO BOVINO (PB)

O pericárdio é uma membrana fibrosserosa que envolve externamente o coração. Conforme ilustrado pela Figura 3, esse tecido é constituído por uma túnica fibrosa externa, o pericárdio fibroso, e uma túnica interna bilaminada, o pericárdio seroso. Este é um saco fechado, constituído por uma lâmina designada visceral ou epicárdio, que é a camada intimamente aderida à superfície do músculo cardíaco, enquanto a lâmina parietal é a camada mais externa do pericárdio seroso, que reveste a superfície interna do pericárdio fibroso, estando unida a ele. As lâminas visceral e parietal do pericárdio seroso ficam separadas por uma cavidade virtual, preenchida por líquido pericárdico.⁶⁸ O pericárdio fibroso de origem bovina tem a mesma disposição e a estrutura histológica dos tecidos cardíacos humanos e é o tecido mais utilizado para a confecção de BVCs.

Figura 3. Camadas do pericárdio em coração humano



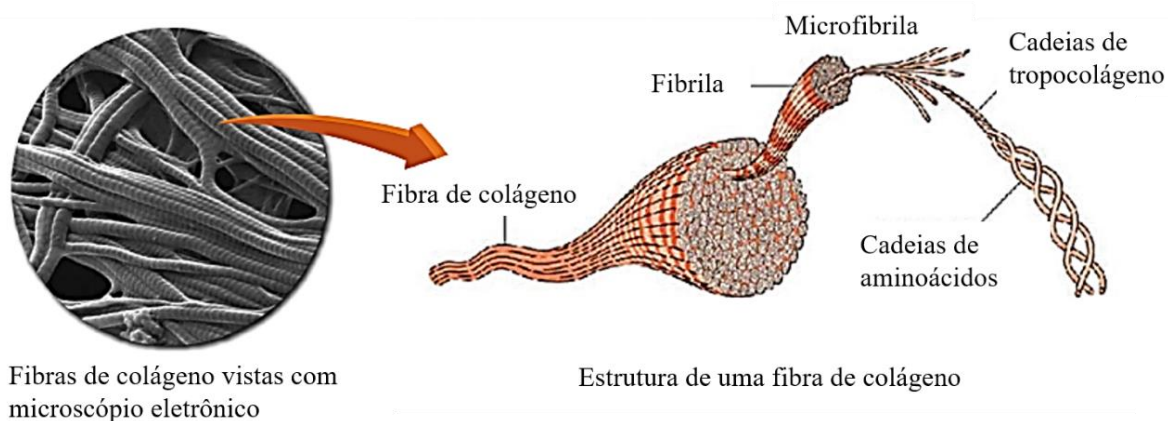
Fonte: Adaptado de Silverthorn (2003).⁶⁹

O pericárdio fibroso é constituído por um tecido conjuntivo denso, cuja MEC é composta por elementos fibrilares e não fibrilares. A matriz afibrilar é constituída basicamente por

glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos e glicoproteínas, enquanto a porção fibrilar compreende uma camada densa de feixes multidirecionais de fibras colágenas do tipo I, entrelaçadas com uma rede de fibras elásticas.⁷⁰

O colágeno é um polímero natural e não se apresenta na forma de moléculas isoladas no espaço extracelular. Ao invés disso, forma fibras constituídas por fibrilas colágenas, com comprimento indeterminado e diâmetro variável, de acordo com o tecido e idade. A unidade proteica que se polimeriza para formar as fibrilas colágenas é uma molécula alongada denominada tropocolágeno, que consiste em três cadeias polipeptídicas arranjadas em uma configuração helicoidal (Figura 4). As fibras de colágeno são construídas a partir de moléculas de tropocolágeno consecutivas e, entre elas, existem pequenas lacunas de 40 nm, também conhecidas como "zonas de *gap*". As diferenças nas estruturas químicas dessas cadeias são responsáveis pelos vários tipos de colágeno.^{71p}

Figura 4. Organização de fibras em fibrilas e estrutura tripla hélice do colágeno.



Fonte: Adaptado de Lawrence (1974).⁷²

O colágeno engloba uma família de proteínas multifuncionais com características estruturais únicas. Dentre os vários tipos existentes, destaca-se o colágeno tipo I, a proteína mais abundante do corpo humano, cujo papel relaciona-se com funções biomecânicas cruciais para a pele, os ossos, tendões, ligamentos e dentes. Formam, juntamente com as fibras elásticas, os arcabouços naturais de praticamente todos os tecidos do corpo humano.⁷³

As biopróteses são feitas de folhetos de pericárdio suíno ou bovino, compostos por células desvitalizadas intersticiais ou fibroblastos, embutidos em uma MEC de colágeno, elastina e GAGs. O colágeno e a elastina são os dois principais componentes dos tecidos do PB, a partir do qual é produzida a maioria das BVCs comercialmente disponíveis. A elastina confere ao

tecido a capacidade de resistir à deformação permanente e o colágeno fornece força tênsil às cúspides cardíacas.⁷⁴ No PB, essa propriedade do colágeno tipo I confere resistência e integridade estrutural às biopróteses e aos demais dispositivos protéticos preparados com esse tecido.⁷⁵ Além disso, as fibras de colágeno são alinhadas em camadas multidirecionais e esse livre arranjo das fibras permite o tecido deformar-se em todas direções, o que confere boas propriedades viscoelásticas para suportar as tensões mecânicas exercidas nos folhetos valvulares durante seu funcionamento.^{65,76}

Outra característica do colágeno é que, após sua implantação *in vivo*, esta proteína pode degradar-se devido à ação de enzimas, especialmente as collagenases.⁷⁴ Ao contrário de tecidos vivos, onde as células renovam de forma contínua, o colágeno, no PB implantado para renovação de elementos da MEC, é dependente de células do hospedeiro que invadem o tecido implantado. Assim como existe uma tendência natural dos tecidos biológicos não vivos entrarem em decomposição, materiais cuja matriz é colagênica podem sofrer degradação, inviabilizando o seu uso como substituto tecidual.⁷⁷

A fixação tecidual do PB é uma etapa importante para seu uso como substituto valvar, a fim de reduzir a imunogenicidade, prevenir a rejeição e a degradação de sua estrutura e, portanto, visam à manutenção do implante no organismo receptor.⁷⁸ Sabe-se que as proteínas derivadas da MEC podem interagir com células do sistema imune e, portanto, desencadear uma resposta imunológica indesejada. Dessa forma, é esperado que implantes de PB não fixados sejam mais suscetíveis à inflamação e à degradação tecidual.⁷⁹

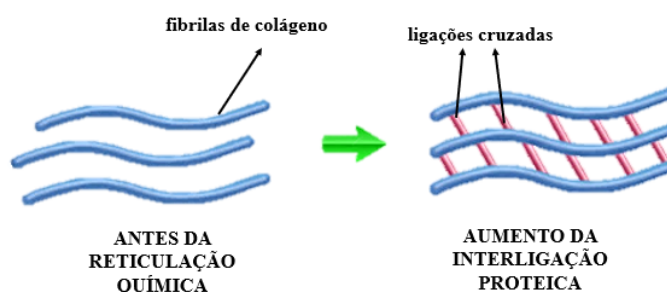
As técnicas de fixação visam estabilizar o tecido, de forma que eles mantenham suas características o mais próximo possível do tecido vivo. Compreendem os tratamentos físicos, como irradiação ultravioleta ou fotorreticulação, e os tratamentos com substâncias químicas. Os agentes fixadores mantêm uma relação adequada entre componentes celulares e o meio extracelular, com a manutenção da estabilidade de componentes teciduais, como as proteínas, que são o principal alvo para estabilização. O uso de reagentes químicos para este processo é comum, sendo os agentes classificados de acordo com o tipo de ação coagulante (álcool, sais de zinco, cloreto de mercúrio, trióxido de cromo, ácido pícrico) e fixadores não coagulantes (formaldeído, GA, tetróxido de ósmio, ácido acético). Dentre esses reagentes, o formaldeído e o GA são utilizados extensamente como agentes de ligação proteína-proteína e, por consequência, para a fixação.^{80,81}

4.4 PRÉ-TRATAMENTO LABORATORIAL DO PB (RETICULAÇÃO QUÍMICA)

Dentre os tratamentos existentes para estabilização de matrizes colagênicas, destaca-se a exposição do tecido a um ou mais fixadores químicos, a fim de impedir a decomposição ou alteração estrutural da prótese biológica. A fixação química elimina qualquer reação bioquímica em andamento, além de aumentar a resistência mecânica dos tecidos tratados.⁸¹

A reticulação é um processo que ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por ligações covalentes, conhecidas como ligações cruzadas, estabelecidas entre os grupos de aminoácidos funcionais. A malha colagênica tecidual tem ligações cruzadas intramoleculares e intermoleculares, necessárias para a estabilidade da molécula de tropocolágeno. A digestão e a quebra dessas ligações peptídicas são responsáveis pela degradação da sua estrutura. Embora o PB possa ser utilizado no campo da cirurgia geral, na sua forma nativa, esse tecido não dispõe do grau de resistência mecânica desejado à utilização em BVCs. Assim, para ajudar na preservação da matriz colagênica original e para melhorar as propriedades mecânicas teciduais, a fim de prevenir alterações estruturais, novas ligações cruzadas podem ser introduzidas no PB, em um processo de reticulação química.⁷⁷ Esse mecanismo intra e intermolecular de ligação cruzada de macromoléculas altera de forma considerável as características do tecido, com a produção de polímeros tridimensionais com alta massa molar.⁸ A reticulação (Figura 5) do PB, portanto, aumenta a sua resistência contra a destruição enzimática e reduz as suas propriedades antigênicas, com aumento da permanência do biomaterial no organismo receptor.^{15,16}

Figura 5. Desenho esquemático de ligações cruzadas estabelecidas entre as fibrilas de colágeno.



Fonte: Elaboração da autora.

Exemplos de agentes fixadores químicos, utilizados para reticulação de matrizes colagênicas, incluem: formaldeído, GA, diisocianato de hexametileno, compostos à base de

poliepóxi^{8,82} e, mais recentemente, polifenóis, incluindo a curcumina, com um sugestivo efeito inibidor sobre a calcificação do PB.⁸³

O formaldeído é o mais abundante e importante aldeído no ambiente, caracterizado como um gás incolor de forte odor irritante, muito solúvel em água e que apresenta alta reatividade química a vários grupos de macromoléculas biológicas, por meio de ligações cruzadas com proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos, com a formação de pontes de metileno. Uma importante característica do processo de fixação com formaldeído é que, devido ao tamanho pequeno da molécula, esse reagente penetra rapidamente no tecido, porém, a formação das pontes de metileno ocorre lentamente e uma adequada fixação pode levar dias ou semanas, sendo que as ligações formadas podem ser reversíveis, o que exige tratamentos mais prolongados e com maiores concentrações. Ainda, os compostos fixadores com formaldeído apresentam a formação espontânea de ácido fórmico em exposição à luminosidade e ao oxigênio atmosférico, bem como têm alta toxicidade. O formaldeído é classificado como carcinogênico para humanos e essa é a principal desvantagem relacionada ao uso dessa substância. Devido aos seus efeitos genotóxicos em trabalhadores expostos a esse reagente, existem valores máximos recomendados como limites de exposição, determinados por autoridades de saúde ocupacional e pela Organização Mundial da Saúde.⁸¹

No início do desenvolvimento das biopróteses, muitos processos falharam devido a uma reticulação inadequada de tecidos. Em parte, as falhas ocorriam pelo emprego do formaldeído, pois esta substância fixadora produzia ligações cruzadas instáveis e reversíveis na rede de colágeno.¹⁴ Por esse motivo, o uso de formaldeído ficou restrito somente à manutenção da esterilidade, após a reticulação preliminar das biopróteses com outro agente reticulante.⁸⁴ Uma opção alternativa que se estabeleceu para a reticulação das biopróteses foi então a utilização do GA.

Tal como o formaldeído, o GA também tem sido utilizado de forma usual como um agente de ligação proteína-proteína e, por consequência, para a fixação. Dentre os agentes fixadores, o GA tem sido o agente químico mais utilizado ao longo das últimas décadas para a confecção de BVCs.^{84,85} O GA é um líquido oleoso e miscível em água, álcool e benzeno, de baixo custo e de fácil disponibilidade, muito utilizado como desinfetante e esterilizante em ambulatórios e hospitais.¹⁵ A molécula de GA, maior do que a de formaldeído, penetra de forma mais lenta nos tecidos. Porém, o GA se rearranja de maneira a formar uma estrutura permanente por meio de ligações cruzadas intramoleculares, intermoleculares e até mesmo intrafibrilares. O GA é

capaz de introduzir mais ligações cruzadas do que outros tipos de aldeídos como o formaldeído, além do que as ligações covalentes estabelecidas entre os aminoácidos das cadeias de colágeno e o grupo aldeído terminal do GA são mais estáveis e irreversíveis, o que é essencial para uma reticulação adequada, mesmo quando o tecido fixado está submetido a valores de pH e de temperaturas extremos.¹⁴

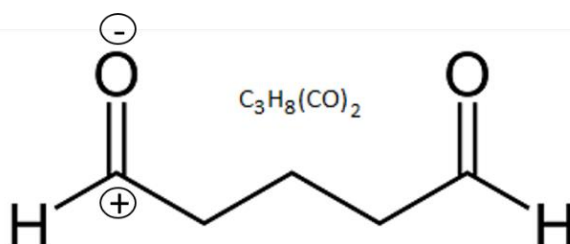
Introduzida por Carpentier e colaboradores, em 1969¹⁶, a reticulação do PB com GA representa um método simples e conveniente, extensamente utilizado em imobilização e reticulação de proteínas, sobretudo o colágeno, desde o advento das primeiras BVCs, a partir da década de 1970.⁸⁶ Outro efeito do tratamento do PB com GA é a redução da imunogenicidade do tecido⁸⁷⁻⁸⁹, que não torna o tecido imunologicamente inerte, mas altera alguns sítios antigênicos do tecido, de forma a dificultar o seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro.⁹⁰ A reticulação do PB com GA também altera as propriedades mecânicas do PB porque modifica permanentemente a malha de colágeno com maior interligação proteica. As cadeias poliméricas reticuladas de colágeno perdem a sua fluidez, além do que sua estrutura se torna mais rígida. As matrizes de colágeno do tecido reticulado passam a formar uma rede tridimensional insolúvel e termorrígida, com maior peso molecular.⁹¹

Por outro lado, o sucesso do GA como agente de reticulação pode também depender da gama de diferentes espécies químicas presentes em simultâneo na solução de fixação. Em meio aquoso, o GA livre pode formar polímeros e formas monoméricas mono-hidratados ou di-hidratados, que, por sua vez, também podem polimerizar.⁸¹

4.5 MECANISMO DE FIXAÇÃO DO PB COM GLUTARALDEÍDO (GA)

O GA contém o grupo funcional carbonila (C=O). Uma vez que o átomo de oxigênio da carbonila é mais eletronegativo do que o átomo de carbono desse grupo, ele atrai elétrons do carbono, adquirindo uma carga negativa parcial. O carbono, por sua vez, adquire uma carga positiva parcial, tornando-se deficiente em elétrons (Figura 6). Assim, a presença do carbono eletrofílico da carbonila atribui ao GA a característica de reagir com nucleófilos, a exemplo de grupos amínicos que dipõem de elétrons livres. Uma das principais reações de aldeídos envolve a adição de um elemento químico rico em elétrons (como o grupo amino de proteínas) ao carbono com carga positiva.⁷¹

Figura 6. Fórmula molecular e estrutural do glutaraldeído.



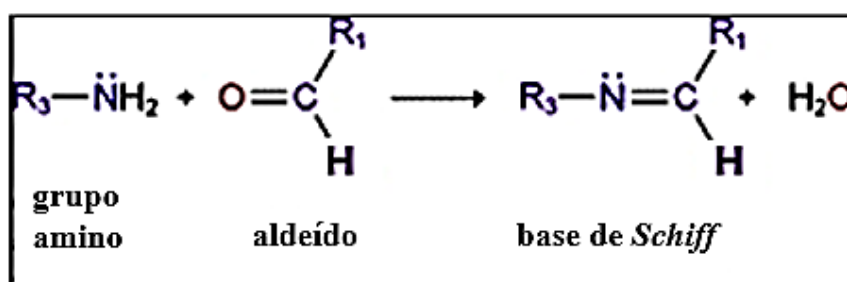
Fonte: Elaboração da autora.

O GA é considerado um agente bifuncional porque é um dialdeído, capaz de interagir com o colágeno em dois sítios diferentes. A reticulação proteica acontece devido às ligações cruzadas que ocorrem entre os aldeídos presentes em cada extremidade da molécula de GA e os grupamentos amínicos das moléculas de colágeno. Cada cadeia polipeptídica da proteína de colágeno contém, aproximadamente, mil resíduos de aminoácidos, sequenciados como unidades repetitivas que contêm glicina (Gly), denominadas tripletes do tipo (Gly-X-Y)_n, onde os resíduos X e Y, frequentemente, são os aminoácidos prolina, hidroxiprolina, lisina e hidroxilisina.⁸⁸

Na reação de reticulação do colágeno tipo I, a interação química se dá entre a carbonila (C=O) do grupo aldeídico do GA e o grupamento amina (-NH₂) das cadeias polipeptídicas do colágeno, mais precisamente com os resíduos de lisina e hidroxilisina.^{88,92} Essa interação introduz ligações cruzadas intermoleculares, por meio de uma ligação dupla carbono-nitrogênio em cada molécula de colágeno (reticulações intramoleculares) ou entre moléculas de colágeno adjacentes (reticulações intermoleculares).⁹¹

O nitrogênio nucleofílico reage com o carbono do aldeído, o qual desloca o oxigênio do aldeído e resulta na perda da molécula de água formando a ligação C=N, que caracteriza o grupo funcional imina. Mais especificamente, a reação resulta em uma base de *Schiff* (-CH=N-), uma imina estável obtida da reação de condensação do grupamento amínico com o grupo carbonila dos aldeídos (Figura 7) que forma conjugados proteína-GA de elevada estabilidade.⁹³

Figura 7. Reação entre grupo amino e aldeído para formação da base de *Schiff*.



Fonte: Elaboração da autora.

4.6 FATORES QUE LIMITAM A LONGEVIDADE DAS BIOPRÓTESES VALVULARES CARDÍACAS (BVCs) FIXADAS COM GA

A reticulação permitiu uma ampla utilização do GAPB para cirurgia cardíaca reconstrutiva, como as BVCs.^{3,86} No entanto, as BVCs têm durabilidade limitada a um prazo aproximado de 10 a 15 anos, por falhas de funcionamento, associadas aos folhetos teciduais de PB. Existem duas principais causas dessa falha, que podem ocorrer de maneira independente ou sinérgica: a fadiga mecânica e a calcificação distrófica, onde o tratamento com GA é conhecido por acelerar a calcificação.⁴⁻⁶

4.6.1 Danos por fadiga mecânica

As valvas cardíacas abrem e se fecham por aproximadamente 3 bilhões de vezes durante a vida de um indivíduo normal. Durante esses ciclos, as cúspides suportam tensões mecânicas intermitentes, com alterações de pressão hemodinâmica e atrito tecidual pelo fluxo sanguíneo, que podem produzir eventuais danos estruturais.⁴ Quando o PB é implantado *in vivo* na forma de folhetos valvulares, sobre esse material atuam cargas que variam ao longo do tempo. Sabidamente, esse tipo de carregamento (cíclico) produz tensões e deformações que leva o dispositivo à falência mecânica pelo mecanismo denominado fadiga. Este é um processo de modificações estruturais permanentes, progressivo e localizado em um material que pode culminar em trincas ou fratura, após um número de ciclos.⁹⁴

A degradação estrutural dos implantes de PB é um dos fatores que resultam em falha mecânica da bioprótese e vários autores já destacaram o papel significativo da arquitetura das fibras de colágeno sobre o comportamento mecânico do GAPB. Como resposta à constante solitação mecânica ao qual esses materiais são submetidos, as microtrincas podem surgir pela ruptura de fibras colágenas do PB, em pontos de concentração de estresse. Isso tem

implicações importantes para os folhetos de GAPB, onde a ausência de fibras alinhadas ao longo das direções principais de carregamento aumenta a fadiga do material e reduz significativamente a vida útil das BVCs.^{95,96} Além disso, danos mecânicos exacerbam a calcificação em GAPB, onde o grau de calcificação varia de acordo com o grau de severidade desses danos, pois fibras rompidas e danificadas da MEC se apresentam como sítios de ligação ao cálcio.⁶

Além do colágeno, rupturas, alterações de orientação e alterações degenerativas induzidas por fadiga também têm sido correlacionadas com a degeneração de outros componentes da MEC, como a elastina (4) e os GAGs (2). Consequentemente, o controle da arquitetura da MEC em PB processados para o uso em BVCs pode minimizar as causas de falha em pacientes portadores de BVCs. Idealmente, os tratamentos pelos quais os PBs são submetidos na confecção de BVCs devem ao máximo preservar as propriedades originais do tecido. Em trabalho experimental *in vitro*, Dalglish e colaboradores (2019) constataram que o GAPB, quando submetido a tensões mecânicas intrínsecas, passam por mudanças significativas na estrutura, na composição e na função mecânica do material. Por outro lado, o PB não fixado sofre tensão mínima e mantém sua estrutura, composição e integridade mecânica. No entanto, a degradação enzimática e a imunogenicidade limitam o uso do PB fresco e inviabilizam o desempenho dos folhetos da valva bioprotética.¹⁷

Também foi demonstrado o papel do estresse oxidativo sobre a degradação estrutural dos folhetos de PB que compõem as cúspides das biopróteses. Em avaliação de próteses de PB explantadas de 47 pacientes, os folhetos de PB mostraram níveis aumentados de aminoácidos oxidados, com aumento concomitante de cálcio, e se correlacionavam com a disfunção da biopróteses.^{20,67} Apesar disso, a calcificação tardia pós-implante prevalece como o fator mais significativo que limita a durabilidade das BVCs.⁴⁸

4.6.2 Consequências da calcificação distrófica

A calcificação de valvas naturais ou bioprotéticas pode ser classificada em calcificação metastática, ou seja, calcificação difusa devido ao desequilíbrio de minerais sistêmicos, geralmente afetando indivíduos urêmicos; e calcificação distrófica, ou seja, calcificação ectópica causada por lesão tecidual, envelhecimento e/ou existência de outras comorbidades, ocorre tipicamente em indivíduos não urêmicos. Entre essas, a calcificação distrófica é a principal causa de falha de valvas oriundas de xenoenxertos de PB.⁴

A calcificação distrófica valvar tem sido considerada uma alteração degenerativa. Inicia-se a partir de uma pequena deposição de fosfatos de cálcio que, progressivamente, enrijecem os folhetos de PB. Isso reduz sua mobilidade e flexibilidade, impactando negativamente no funcionamento da valva e no seu desempenho hidrodinâmico. Como consequência, os danos estruturais podem levar ao aparecimento de disfunções como regurgitação e estenose.⁹⁷ A incapacidade dos folhetos para abrir totalmente aumenta o gradiente sistólico através da valva, reduzindo a área de orifício efetiva da valva e, portanto, o volume de sangue ejetado do coração, caracterizando a estenose valvar. Na diástole, a incapacidade de coaptar totalmente resulta em regurgitação, causando insuficiência valvar. Essas ocorrências caracterizam uma degeneração valvar e uma BVC clinicamente disfuncional, levando à necessidade de substituição em até sete anos pós-implante e ao aumento do risco de óbito. Em pacientes jovens esse problema é ainda pior, pela necessidade de sucessivas cirurgias ao longo da vida.⁹⁸

Assim, mais pesquisas para melhorar a durabilidade de biopróteses são absolutamente necessárias. Para atingir esse objetivo, é importante a obtenção de mais informações precisas e confiáveis sobre os mecanismos e fatores que controlam e influenciam a degeneração e calcificação nas biopróteses atuais. A calcificação de BVCs tem determinantes relacionados a: 1) metabolismo do hospedeiro; 2) estrutura e química do implante; e 3) fatores mecânicos, havendo muitas interações entre esses fatores.^{4,48}

4.7 FATORES QUE INFLUENCIAM A CALCIFICAÇÃO DAS BVCs

Mecanismos e fatores que regulam a mineralização óssea fisiológica podem ser idênticos ou muito semelhantes aos que regulam a calcificação ectópica. Depósitos teciduais mineralizados, fisiológicos ou patológicos, são formados por sais de fosfato de cálcio, apresentando-se na forma de hidroxiapatita, cuja fórmula molecular é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A deposição de compostos mineralizados, constituídos por hidroxiapatita, ocorre em duas fases diferentes: nucleação e propagação.^{4,99,100} A nucleação é a fase mais importante e crítica, porque as concentrações de cálcio e o fosfato em fluidos corporais normais são insuficientes para permitir a precipitação espontânea.

Tanto na formação óssea normal, como na calcificação patológica, deve estar presente um sítio de nucleação, definido como um microambiente localizado no qual cálcio e fosfato inorgânicos podem interagir em circunstâncias e concentrações ideais, permitindo formação de um cristal de fosfato de cálcio amorfo inicial e precipitação espontânea. Uma vez que a

nucleação ocorreu, a concentração de cálcio e fosfato nos fluidos corporais é suficiente para propagação e crescimento.⁹⁹

Assim, como não há precipitação espontânea do cristal de hidroxiapatita, é necessário um substrato que sirva como nucleador para a precipitação. Uma vez que a precipitação inicial tenha ocorrido, haverá crescimento e expansão de mais cristais. Embora necessite de maior investigação, as principais causas de calcificação de biopróteses feitas com GAPB são fatores individuais do organismo receptor, a saber: as áreas localizadas de estresse¹⁰¹, a retenção de células mortas ou de detritos celulares em sua estrutura⁸⁷, presença de componentes danificados da MEC, como fibras de colágeno e elastina¹⁰² e a presença de grupos aldeídos livres derivadas da fixação com GA.⁷⁹ Outros fatores associados ao tecido já foram identificados, como adsorção de proteínas ligantes de cálcio, porosidade superficial e retenção de água e detritos celulares aderidos à superfície.¹⁰³

4.7.1 Idade e outros fatores individuais sobre a calcificação das bvcs

A evolução da calcificação das biopróteses é diferente em indivíduos de faixas etárias distintas. É precoce em pacientes jovens e mais tardia nos pacientes idosos, podendo também estar relacionada com diferenças no metabolismo do cálcio no organismo. Assim, uma determinada prótese biológica pode durar cerca de 18 ou 20 anos em um paciente idoso, mas apenas 10 a 12 anos em um indivíduo mais jovem.⁴⁷ Existem relatos de calcificação valvar em crianças menores de 15 anos até mesmo dentro de 2 anos, devido ao metabolismo de cálcio estar mais ativo.¹⁰⁴

A correlação entre pouca idade e aumento de calcificação é bem conhecida, mas a sua causa não é totalmente compreendida.^{6,47} O consenso atual é que pacientes mais jovens apresentam maior solitação mecânica da valva e maior renovação de cálcio. No entanto, após a adolescência, os indivíduos não crescem rápido o suficiente para ter alta renovação de cálcio, suas frequências cardíacas são provavelmente semelhantes às dos adultos mais velhos e as pressões geradas dentro de seus corações (abertura e fechamento de suas cúspides) são provavelmente semelhantes ou menores do que os adultos mais velhos, com pressão alta e hipertrofia do músculo cardíaco.¹⁰⁵ Além disso, como os pacientes mais jovens provavelmente têm um sistema imunológico mais robusto do que os adultos mais velhos¹⁰⁶, alguns pesquisadores têm questionado se existe outro processo para explicar a maior taxa de calcificação em jovens.

Há alguma evidência que sugere um processo de rejeição (infiltrado celular e ligação de anticorpos) às BVCs implantadas, mas muitas dessas evidências vêm de próteses explantadas que falharam.¹⁰⁷ Isso não permite um estudo aprofundado do processo e atualmente, não se dispõe de uma tecnologia para estudar *in vivo* de forma não invasiva se uma BVC implantada em um paciente humano passa por rejeição. Além disso, cirurgiões cardíacos e cardiologistas entendem que a falha da bioprótese é dependente da calcificação e comumente refutam a hipótese de rejeição do xenoenxerto.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

O fator principal relacionado ao hospedeiro é a idade, mas outros fatores individuais ainda estão relacionados. É possível que a presença de agentes pró-coagulantes, dislipidemias e inflamação também induzam o desenvolvimento de placas superficiais com fosfato de cálcio sobre a bioprótese.¹¹ Acúmulo de material lipídico pode estar associado ao aumento da precipitação de cristais de hidroxiapatita na mineralização de tecidos moles e duros, tanto no processo fisiológico, quanto patológico de calcificação. Curiosamente, lipídios acumulados nos tecidos calcificados de valva cardíacas frequentemente sofrem oxidação, adquirindo assim maior afinidade para íons de cálcio.¹⁰⁸

Outros fatores individuais que influenciam na calcificação das BVCs incluem a hipercalcemia, diabetes, dieta, infecção, administração de cálcio parenteral, desidratação, respostas imunológicas e áreas localizadas de estresse.^{109,110} Sobre esse último fator, sabe-se que a calcificação das BVCs é mais pronunciada em regiões sujeitas à deformação mecânica devido ao movimento intenso, como os pontos de flexão nas valvas cardíacas. A calcificação, por sua vez, resulta em concentrações de estresse ainda maior.^{101, 111}

Pesquisas em BVCs explantadas mostram que as regiões de alto estresse mecânico estão associadas a níveis aumentados de calcificação, mas o mecanismo subjacente a essa relação não é completamente conhecido.¹¹² Provavelmente, a sobrecarga mecânica em pontos de estresse induz distorção *in situ* na bioprótese por deterioração do colágeno, sendo que a perda de integridade estrutural da MEC tem relação com a exposição de componentes danificados da MEC, que são sítios de nucleação mineral, como será discutido adiante no tópico 4.7.3.^{6,17,113}

Embora o estresse dinâmico seja um fator importante, o mecanismo patológico da calcificação de biopróteses não pode ser explicada unicamente com base nesse ponto, pois

também envolve outros fatores independentes do hospedeiro, como a presença de células desvitalizadas no tecido e de grupos aldeídos livres derivadas da fixação com GA.^{79,114}

4.7.2 Efeito dos fosfolipídios no PB sobre a calcificação das BVCs

A formação de hidroxiapatita *in vivo*, induzida por fosfolipídios, é demonstrada tanto em processos fisiológicos normais de formação óssea, como em processos patológicos de calcificação ectópica, como no caso da calcificação em implantes de GAPB. O mecanismo de calcificação no pericárdio tratado com GA não é bem entendido por conta da sua complexidade. Não obstante, há evidência de que esse processo é iniciado principalmente em células desvitalizadas e seus resíduos no PB⁶⁷ ou em células do hospedeiro não viáveis que se infiltraram no implante. Tais células se constituem em locais com alta afinidade ao cálcio, podendo atuar como nucleadores precoces de hidroxiapatita. As camadas eletrodensas (com alta densidade de cargas negativas) de membranas celulares representam um ótimo substrato para a precipitação cristalina que, por sua vez, pode promover deposição mineral autocatalítica adicional.⁴

A calcificação relacionada à retenção de células não viáveis no implante decorre de um influxo passivo de cálcio para o interior das células mortas, pela perda da regulação transmembrana.¹¹⁵ As etapas do processamento, como lavagem e fixação do PB coletado de um animal, resultam na morte irreversível das células intersticiais do tecido conjuntivo. Nas células desvitalizadas que permaneceram com a membrana plasmática íntegra, íons Ca^{2+} que estão 10 mil vezes mais concentrados no meio extracelular entram na célula passivamente, a favor do gradiente de concentração, enquanto mecanismos para remoção de Ca^{2+} (bombas de Ca^{2+} que requerem energia ligadas à membrana) não estão mais ativos. A seguir, o Ca^{2+} livre, massivamente liberado na célula, reage com fosfato intracelular (PO_4^{3-}), abundante em toda a célula, mas altamente prevalente em organelas e membranas plasmáticas, na forma de fosfolipídios, proteolipídeos e sistemas enzimáticos. Por meio dessa ligação, há a formação inicial de espécies de fosfato de cálcio cristalino, com consequente formação de hidroxiapatita.^{99,116}

Adicionalmente, a presença de restos celulares no tecido também favorece sítios de calcificação, pois esses restos servem como centros de nucleação mineral de cálcio extracelular que formam agregados cristalinos no tecido.^{67,117} A morte celular leva à presença de células desvitalizadas intactas, mas também à presença de detritos celulares membranosos,

provenientes do núcleo ou de organelas da célula. Esses remanescentes foram identificados como um potencial local de nucleação para calcificação inicial.^{116,118}

Os mecanismos responsáveis para essa calcificação não são totalmente compreendidos, mas envolvem fosfolipídios de membrana com cargas negativas que podem atrair eletrostaticamente íons de cálcio do fluido extracelular. A partir daí, ocorre a formação inicial de espécies de fosfato de cálcio cristalino e de hidroxiapatita.^{11, 71, 119}

4.7.3 Componentes da Matriz Extracelular (MEC) do PB como sítios nucleadores de cálcio

Alguns elementos da MEC do PB também podem atuar como nucleadores de cálcio, a exemplo de proteoglicanos, que são também carregados negativamente e podem atrair íons cálcio e fosfato.^{97,120} Os locais iniciais dessa calcificação, na estrutura molecular do colágeno, ficam nas regiões de *gap* e *overlap*, onde são encontrados os proteoglicanos.^{92, 97, 120} Também há evidências de deposição mineral sobre as fibras de colágeno tipo I e elastina. No entanto, a contribuição desses elementos para a calcificação é secundária, pois a calcificação das válvulas é principalmente iniciada em células desvitalizadas.^{4,6,99}

Diferentes mecanismos já foram descritos para explicar a nucleação de cristais calcificados na matriz de colágeno, de forma diferente e independente das células. No tecido da bioprotése, metaloproteinases de matriz e outras enzimas proteolíticas são capazes de degradar os proteoglicanos protetores ligados ao colágeno, expondo locais no colágeno propensos à calcificação. Outro ponto envolve o estresse mecânico repetitivo, que pode danificar a integridade estrutural do colágeno. Dentro das fibras de colágeno danificadas, os espaços entre as moléculas de tropocolágeno se tornam mais amplos, facilitando a deposição de cálcio e, por último, devido à afinidade do colágeno por proteínas de ligação ao cálcio, como aquelas contendo ácido gamacarboxiglutâmico (Gla). Dentre outras, essas proteínas contendo Gla são conhecidas por sua capacidade para atrair e ligar o cálcio e podem se originar do sangue ou serem secretadas por linfócitos e macrófagos infiltrados na bioprótese.^{99,121}

O papel das fibras elásticas na calcificação da valva bioprotética também tem sido estudado. As evidências apontam que a elastina tem apenas contribuição limitada, atuando provavelmente em estágios mais avançados de calcificação, quando o processo de calcificação de BVCs já foi iniciado pelos fragmentos celulares retidos.¹²¹ Ao exame ultraestrutural, as fibras elásticas dispõem de um núcleo composto por elastina e um revestimento externo de

microfibrilas e proteoglicanos. A reatividade entre o GA e a elastina é muito baixa, de forma que a elastina não é fixada por GA, sendo mais suscetível à atividade da elastase, podendo desintegrar-se e tornar-se calcificada.¹²²

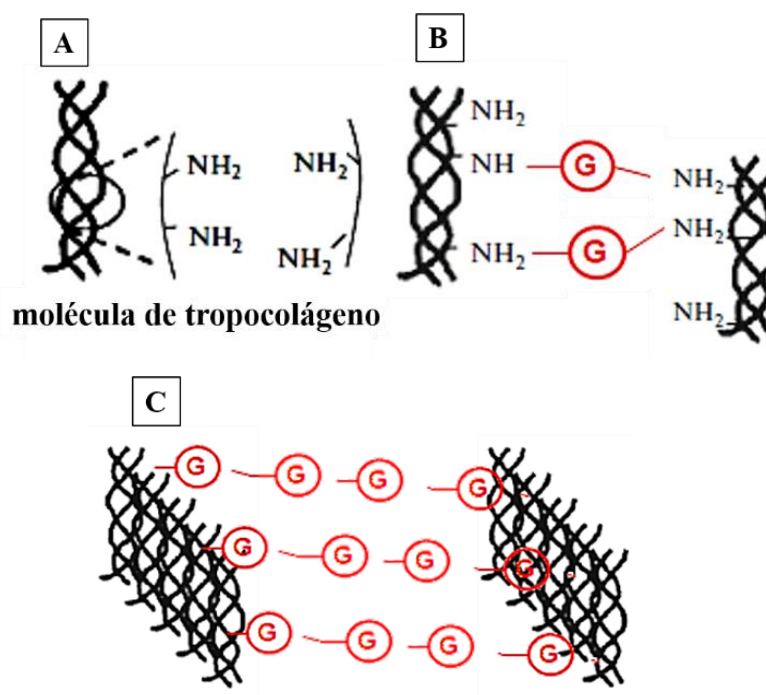
A calcificação acontece pela exposição de vários locais de ligação da molécula de elastina aos cátions Ca^{2+} , quando o revestimento de microfibrilas é rompido.^{99,123} A calcificação das fibras elásticas também pode estar relacionada com alterações na composição de seus aminoácidos. Com o seu envelhecimento, a fibra elástica apresenta uma diminuição de suas proteínas estruturais, um aumento de aminoácidos polares (aspártico e glutâmico ácido) e uma adição de grupos carbonila em resíduos de aminoácidos. Esses resíduos polares são carregados negativamente e podem atrair íons de cálcio.¹²⁴

4.7.4 Efeito do GA na calcificação das BVCs

Sabe-se que o GA desempenha um papel importante na reticulação do PB, sendo considerado um reagente essencial para melhorar a estabilidade biomecânica do tecido. No entanto, nos últimos anos, as investigações sobre a calcificação bioprotética têm explorado o papel dos grupos livres de aldeídos, residuais do GA. Em combinação com cálcio circulante e fosfolipídios de membrana, resultam em um processo de calcificação das próteses biológicas.^{20, 23, 67, 125,126}

Apesar de todo conhecimento acumulado, a composição molecular precisa do GA em solução não é completamente compreendida. Soluções de GA contém moléculas ativas do monômero linear simples do GA, mas através de complexas vias de reação podem formar-se diferentes espécies químicas em meio aquoso, tais como as formas mono e dihidratadas, hemiacetais monoméricos e polímeros (Figura 8).

Figura 8. Modelo esquemático da molécula de tropocolágeno com destaque para os grupamentos amínicos (A). Modelo de reticulação polimérica das cadeias da molécula de colágeno com monômeros simples de GA (B) e com formas poliméricas deste (C).



Fonte: Adaptado de Rezvova (2018).⁸

O GA monomérico pode ainda, por reação de condensação aldólica, polimerizar-se em vários polímeros α , β -insaturados, com concentrações dependentes de temperatura e pH. As estruturas poliméricas formadas direta ou indiretamente estão relacionadas com a liberação lenta de grupos aldeídos livres no tecido fixado, um fator inconveniente relacionado à calcificação.^{8,127}

Desse modo, o tecido biológico, mesmo após o tratamento químico com GA, pode conter formas residuais de aldeídos; sua presença pode ser resultante da reação incompleta de GA com proteínas de tecido¹⁰, bem como da liberação lenta, a partir de ligações cruzadas com GA na forma polimérica¹²⁸ (Figura 8). Devido à química complexa do GA em soluções aquosas e às distinções do tecido, as ligações de reticulação não ocorrem de maneira homogênea.⁸⁸ A heterogeneidade química das ligações cruzadas estabelecidas, por sua vez, pode gerar locais de alta afinidade para deposição de cálcio.²³

Após a implantação, os grupamentos aldeídos representam, junto com fosfolipídios e resíduos antigênicos, sítios importantes para deposição de cálcio porque as moléculas de GA monomérico são de grande polaridade e capazes de atrair íons cálcio. Além disso, a liberação gradual do GA monomérico pós-implante, a partir das rupturas de ligações de GA polimérico,

tem um conhecido efeito citotóxico local que predispõe a superfície do tecido implantado da BVC à calcificação.^{67,129}

Já foi demonstrado que os monômeros de GA alteram os mecanismos de adesão e proliferação de células endoteliais na bioprótese, de tal modo que impedem o processo de reendotelização do GAPB.^{67,129,130} O endotélio tem ação protetora contra a calcificação, trombose, inflamação e desgaste mecânico, ao fornecer uma superfície bioativa que modula o equilíbrio hemostático, a coagulação e o comportamento local das plaquetas e leucócitos, mediante interações entre células endoteliais e células musculares lisas, fibroblastos e células imunes.^{18,131} Devido à citotoxicidade do GA, GAPBs podem não ser adequados para o crescimento e proliferação de células endoteliais e, assim, a incapacidade de repopularização endotelial dos folhetos valvares torna-se um problema porque faz com que as BVCs percam a proteção da camada endotelial.¹³¹ Estudo realizado com valvas biológicas explantadas mostrou que apenas 23% delas, no período de 12 a 60 meses, apresentavam algum revestimento endotelial, em geral restrito à base das valvas.¹³²

A ausência de endotélio expõe o tecido conjuntivo à adsorção de proteínas do plasma (albumina, globulina e fibrinogênio, entre outras) e de fluidos intersticiais, agregação de células imunes e de músculo liso, adesão e ativação de plaquetas. Como consequência, há indução de coagulação/trombose¹³¹ e nucleação de sais que, posteriormente, levam à calcificação. Embora o mecanismo para explicar o envolvimento de trombos plaquetários na calcificação não seja bem compreendido, sabe-se que a deposição mineral envolve plaquetas sanguíneas aderentes e proteínas plasmáticas ligantes do cálcio como o fibrinogênio. Além disso, sem endotélio, um grande número de leucócitos se agrega e libera fatores de crescimento e citocinas que estimulam a calcificação.^{131,132}

Adicionalmente, o efeito citotóxico do GA gera outros focos de calcificação no tecido que compõe as BVCs, quando há morte de células nativas do hospedeiro e o acúmulo de resíduos celulares ricos em fosfolípidios, que comprovadamente funcionam como sítios primários do processo de calcificação.^{29,67,79}

4.8 ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DA CALCIFICAÇÃO DO PB EM BVCs

Em síntese, a degeneração distrófica do PB em BVCs é multifatorial e não completamente compreendida. A calcificação depende da interação dos componentes teciduais com o fluido extracelular, contendo cálcio, sendo que vários fatores estão implicados no processo de

nucleação mineral, incluindo o estresse durante a abertura e o fechamento dos folhetos, os componentes químicos gerados pela reticulação do PB com o GA¹³³, componentes da MEC^{67,134} a presença de detritos celulares e células não viáveis no tecido, que estão relacionados com um alto teor de fosfolipídios no tecido.^{32,116,135}

As estratégias empregadas, a fim de mitigar a calcificação de BVCs, podem ser reunidas em dois grupos: (1) terapia sistêmica com agentes anticalcificantes como disfosfonatos, álcoois, tensoativos ou terapia local, com dispositivos implantáveis de entrega de drogas; e (2) modificações no biomaterial. Em revisão sobre o tema, Rezvova e Kudryavceva (2018) classificaram os métodos anticalcificantes em três grupos: (1) pré-tratamento químico de tecidos doadores para eliminação de detritos celulares; (2) modificação do método de reticulação; (3) e pós-tratamento dos tecidos fixados com agentes químicos para inativação de grupos aldeídos livres do GA.⁸

4.8.1 Pré-tratamento do PB para remoção de detritos celulares

A descelularização tem sido proposta como um método para diminuir a antigenicidade tecidual, levando a uma melhor compatibilidade, remodelação e durabilidade em longo prazo.¹³⁶ Embora a fixação do material xenogênico em GA seja capaz de reduzir a antigenicidade tecidual, uma ênfase recente tem sido colocada no papel imunológico dos epítopos alpha-gal e sua associação com calcificação distrófica.⁵⁵ A presença desses epítopos em tecidos bovinos e suínos provoca uma resposta imunológica em humanos que podem desencadear e potencializar o processo degenerativo.¹³⁷ A ausência desses antígenos, portanto, torna-se um requisito em um protocolo de descelularização, devido ao seu papel importante para mitigar a calcificação.¹³⁸

A descelularização é uma técnica de engenharia de tecidos que visa à remoção de material celular e nuclear e, por isso, pode comprovadamente evitar a calcificação do PB, resultando em um potencial aumento de durabilidade das BVCs. Isso porque evidências mais recentes têm destacado o papel de fosfolipídios de membrana como principais focos de agregação mineral.^{4,6,32,45} A ausência de células e gatilhos antigênicos, promovidos por esse tratamento, também reduzem o risco de rejeição e a manutenção da integridade da MEC, após o tratamento, é um fator importante para permitir a mitogênese celular, quimiotaxia, diferenciação e remodelação tecidual favorável.^{4,139,140}

Os métodos de extração celular utilizados no pré-tratamento do PB incluem o uso de detergentes, a extração enzimática ou tratamento físico do tecido.¹⁴¹ Os agentes químicos atuam por meio da extração parcial ou completa dos fosfolipídios ácidos das membranas de células e das organelas, a fim de inibir a calcificação.^{8,12} Dentre esses tratamentos, citam-se a pré-incubação em etanol, éteres, surfactantes aniônicos como dodecil sulfato de sódio (SDS), surfactantes não iônicos, como Triton X-100, tripsina, derivados do ácido amido oleico, ácido desoxicólico e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).⁴⁰

Uma técnica ideal de descelularização deve remover os detritos celulares, estimular a remodelação tecidual, reduzir as propriedades imunogênicas e manter a integridade estrutural da matriz colagênica, visando à preservação das propriedades mecânicas do tecido tratado (resistência à tração, elasticidade e resistência à fratura). Por fim, a carga eletrostática não deve ser alterada, pois mudanças nas interações eletrostáticas entre as moléculas de colágeno modificam a estrutura de fibrilas colágenas, com impacto sobre a estrutura tecidual. A manutenção do ponto isoelétrico do colágeno é importante também para não favorecer a deposição de íons de cálcio e de fosfato, como ocorre em matrizes de colágeno com característica aniônica.^{142,143}

Assim, um protocolo de remoção de células idealmente deve preservar a morfologia e as propriedades bioquímicas e biomecânicas originais da MEC tecidual.³⁴ Diferentes protocolos de descelularização de pericárdio suíno e bovino já foram descritos como métodos eficazes para reduzir a calcificação e, ao mesmo tempo, preservar as propriedades estruturais e biomecânicas do tecido, determinadas experimentalmente *in vitro*.^{17,33,35,36,41}

Porém, outros estudos com modelos de implantação animal mostram que os protocolos empregados, apesar de reduzirem significativamente a calcificação, não garantiram uma total preservação das propriedades mecânicas do tecido, mostrando que a morfologia tecidual, particularmente a estrutura da matriz colagênica, é afetada pelo processo de extração celular. De forma geral, algum grau de desarranjo na estrutura colagênica original invariavelmente ocorre, independentemente da técnica de processamento.^{32,42,43} Nesse sentido, muitos autores afirmam que, na prática, ainda que existam muitas substâncias disponíveis para descelularização, nenhuma delas é capaz de eliminar completamente as células do tecido xenogênico sem provocar pequenos danos ao arranjo geral da MEC.^{32,40-42,110, 143,144}

Quanto às propriedades biológicas, é desejável que o biomaterial das BVCs não estimule a formação de tecido cicatricial (conhecido como *pannus*), nem processo inflamatório duradouro, não seja pró-coagulante e se integre ao hospedeiro no local de implantação para que haja uma remodelação tecidual favorável, do tipo construtiva, em vez de degenerativa. Para BVCs, a remodelação tecidual desse modo ainda é um desafio a ser alcançado.¹⁷

Diante do exposto, a técnica de descelularização para as biopróteses cardíacas deve ser criteriosamente escolhida. Recentemente, a Braile Biomédica® desenvolveu um protocolo para descelularização de PB a base de surfactantes iônico (SDS) e neutro (Triton X-100), que não altera a carga eletrostática da molécula de colágeno tipo I, mantendo o seu ponto isoelétrico em torno de 7,00. O material para implante obtido pela técnica apresentou adequada biocompatibilidade *in vitro* (conforme parâmetros da ISO10993) e *in vivo*, além de adequada biointegração com o organismo receptor, quando testado em um modelo animal de tratamento de queimaduras⁴³ e como matriz transdérmica sobre o implante de prótese mamária.⁴⁴ Para o uso em cirurgia cardiovascular, são aguardados novos estudos voltados à caracterização físico-química do material, para compará-los com os demais pericárdios comercialmente disponíveis, bem como a resposta biológica voltada à biocompatibilidade e à calcificação.

4.8.2 Modificação do método de reticulação do PB

Métodos de preparação para BVC que não utilizam o GA

Algumas alternativas ao tratamento com GA para reduzir a calcificação têm sido propostas. Os métodos físicos de radiação γ , radiação ultravioleta e foto-oxidação têm demonstrado um menor grau de calcificação tecidual, em comparação com os tecidos tratados com GA, mas parecem estar relacionados com uma maior degradação estrutural de colágeno que compõem o material.^{8,82}

Os métodos de fixação química consistem no tratamento de tecidos por substâncias iniciadoras, como carbodiimida, compostos bi e polifuncionais e agentes tanantes naturais. Cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etil-carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) também já foram utilizados para reticulação do PB. As BVCs reticuladas com métodos alternativos podem exibir boa estabilidade da MEC e propriedades semelhantes ao tratamento com GA.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Contudo, o alto custo dos reagentes e a complexidade das técnicas necessárias para iniciar as interações químicas diminuem a sua aplicação prática. Além disso, mais estudos

são necessários para avaliar os efeitos clínicos desses agentes químicos alternativos, em longo prazo sobre as propriedades do material PB.¹³

Outro ponto importante é que os métodos de preparação do PB destinados ao seu uso em cirurgia cardiovascular, bem como em retalhos e enxertos provisórios, sejam biocompatíveis e permitam o povoamento do implante com células do hospedeiro. Isso é importante para que o colágeno, eventualmente degradado, seja renovado num processo de remodelação construtiva. Tipicamente, a reticulação reduz o espaço para reconhecimento celular e repovoamento, alterando o tempo de remodelação. Assim, para utilizar plenamente os benefícios do PB, as técnicas a serem seguidas devem manter o PB o mais próximo possível de sua estrutura original.⁷⁸ Há indícios que o efeito citotóxico do GA torne o tecido fixado com essa substância incompatível com o repovoamento, com a remodelação e com o crescimento construtivo das células receptoras.¹⁷ Assim, alguns trabalhos mais recentes propõem suprimir a utilização do GA, por meio do uso do PB acelular não fixado.

O uso de matrizes acelulares de PBs não fixados vem aumentando como estratégias de medicina regenerativa. Esses materiais têm sido usados para a reconstrução de vasos sanguíneos (arterioplastia), como enxertos temporários, a fim de permitir o repovoamento do tecido implantado pelas células do próprio paciente, funcionando como *scaffolds* biocompatíveis.^{33,113} O trabalho de Botes e colaboradores (2022) com esse tecido resultou em uma boa recelularização, maior resistência à calcificação, maior reendotelização e resistência mecânica adequadas após 180 dias de implantação vascular e por isso consideraram como uma alternativa os *patches* de GAPB.⁴² Outros estudos também atribuíram resultados promissores a tecidos xenogênicos acelulares para superar as limitações de materiais similares desenvolvidos com GAPBs, considerado ainda padrão na indústria cardiovascular.^{17,36,41} No entanto, para a aplicação específica desse material em BVCs, ainda é necessária maior investigação, pois materiais construídos apenas com as proteínas da MEC podem se degradar rapidamente ou tornarem-se fracos, inviabilizando a substituição de tecidos.⁷⁸

Alguns estudos apontam que válvulas acelulares e não fixadas podem apresentar desempenho funcional superior em relação às de tecido fixado em GA. Esses autores defendem que a fixação tecidual é uma etapa que pode ser prescindida, pois o que garante a biointegração e o funcionamento da valva é a utilização da MEC intacta, com características originais mantidas.^{17,35,36} Para isso, o tecido xenogênico precisaria estar desprovido de toda

carga antigênica que causa a degradação por proteólise, após a implantação ou rejeição aguda do xenoinxerto, fenômenos que são minimizados quando a fixação química é realizada.

A utilização de tecidos naturais não fixados é inviável para utilização em biopróteses, devido à biomecânica deficiente e à rápida degradação no hospedeiro.⁴⁵ A técnica de descélularização tem sido proposta para reduzir a imunogenicidade e a calcificação do tecido PB pós-implantação^{32,41}, mas não substitui o tratamento fixador com o GA, pois a etapa de fixação é necessária para proteger o tecido da resposta inflamatória que leva à degradação tecidual e à consequente calcificação.^{32,45,78,135,147} Entre os agentes fixadores, o GA ainda é o mais utilizado para prover o PB de estabilidade mecânica, esterilização e preservação ideais à sua utilização em BVCs, embora tenha sido apontado como causa de calcificação.^{20,23,67,89,125,126}

Assim, a modificação química obtida por meio da reticulação em GA tem sido realizada para uma boa durabilidade do GAPB. A ISO 5840 atualmente determina que as BVCs devem permanecer funcionais após 400 milhões de ciclos em um testador de desgaste acelerado, o que corresponde a 5 anos de utilização clínica. É improvável que esse critério seja aplicável a biomateriais de tecidos não fixados e, por isso, mais estudos sobre o tema se fazem necessários.¹⁴⁸ À medida que esse campo continua a evoluir, será necessária uma compreensão mais concreta do delicado equilíbrio entre reparo *in vivo* e a remodelação de tecidos não fixados em comparação com a taxa de deterioração do material induzida por deformação cíclica.¹⁷

Modificação na superfície do pericárdio bovino fixado em glutaraldeído (GAPB)

Devido à dificuldade de reendotelização espontânea completa dos folhetos valvares após sua implantação, materiais GAPB perdem o efeito protetor contra a calcificação.^{17,149} Estudos mais recentes têm investido estratégias para melhorar a reendotelização, incluindo valvas cardíacas projetadas com tecido acelular semeado com células endoteliais antes da implantação¹⁵⁰ e preparações com GAGs, cujas propriedades incluem alta carga negativa, efeito anticoagulante e atividade anti-inflamatória, que fazem dos GAGs um potencial solução para o problema da calcificação. Métodos com ácido hialurônico, um GAG linear com repetidas unidades de dissacarídeos, tiveram efeitos benéficos comprovados *in vitro*, mas com muitas limitações que tornam a aplicação clínica ainda distante. A modificação da superfície de GAPB com a incorporação desse polímero de alto peso molecular visa ao preenchimento

de espaços pró calcificantes, prevenindo a nucleação mineral.¹⁵¹ O desenvolvimento desse GAPB híbrido, revestido com hidrogel a base de ácido hialurônico, demonstrou efeito promissor em biocompatibilidade, efeito antitrombótico e aumento da reendotelização, com consequente redução da calcificação, mas em ensaios mecânicos realizados por outros autores mostra aumento da rigidez dos folhetos de PB, com maior risco de ruptura e falha da bioprótese, o que poderia ser compensado com novos desenhos de valva que aumentassem a resistência da prótese.¹⁸ Em outro trabalho similar, o GAPB foi embebido em hidrogel de heparina e demonstrou resultados promissores quanto ao seu comportamento mecânico e potencial anticalcificação *in vitro*, mas assim como em preparações com ácido hialurônico os resultados biomecânicos após a implantação *in vivo* são incertos.¹⁵²

Outras estratégias anticalcificantes já foram desenvolvidas, revestindo a superfície do GAPB com agentes que pudessem interferir na adsorção superficial, reduzindo a nucleação de cálcio. Entre esses agentes, já foram testados difosfonatos, dodecilsulfato de sódio, sulfato de protamina, íons de alumínio e de ferro, ácido 2-amino oleico ou polietilenoglicóis.¹⁰³ Outros estudos indicaram que mediadores plasmáticos, como certas vitaminas, antibióticos, medicamentos anti-hipertensivos, antiplaquetários e anestésicos, podem modular a ligação de proteínas plasmáticas a um substrato artificial, inibindo a adesão plaquetária e posteriormente reduzindo a calcificação das superfícies pericárdicas *in vitro*.^{103,153} Como as plaquetas humanas têm receptores de membrana para uma ampla variedade de materiais, incluindo fibrinogênio e colágeno¹⁵⁴, é concebível que as drogas antiplaquetárias modifiquem, mascarem ou impeçam a expressão de sítios de ligação para proteínas adesivas e causem uma redução das densidades plaquetárias na superfície. Isso por si só pode ser uma das razões para a redução observada na calcificação pericárdica, devido às inibições celulares dos agentes antiplaquetários. Apesar da extensa pesquisa no desenvolvimento dessas estratégias anticalcificação, nenhum método completamente satisfatório para aplicação clínica está disponível.

Modificações no protocolo de fixação do PB com GA

Ainda que o GA apresente desvantagens consideráveis, as suas vantagens o tornam uma referência padrão para o processamento laboratorial do PB para a confecção de biopróteses cardíacas, desde a década de 1970^{8,12}, muito embora seja necessário aumentar a compreensão do seu comportamento químico em solução aquosa.

Tendo em vista que as características do tecido reticulado dependem do controle de variáveis envolvidas no processo de reticulação, uma das estratégias para prevenção da calcificação tem sido a introdução de modificações nos protocolos de fixação com GA.^{19,47,155} Apesar da técnica de tratamento químico da biopróteses com GA não ser recente, os protocolos para o pré-tratamento das próteses valvulares com GA, especialmente com relação às concentrações da solução fixadora e aos tempos de fixação, não estão padronizados.¹⁵⁵

Um protocolo ótimo de tratamento do tecido PB reticulado por GA é aquele capaz de induzir a um mínimo de calcificação, enquanto assegura a sua estabilidade mecânica, dois aspectos que influenciam a durabilidade das biopróteses, após a sua implantação em humanos. Portanto, uma estratégia para reduzir o grau de calcificação, sem comprometer o grau de estabilidade do material, seria ajustar cuidadosamente o tempo de fixação com GA.^{19,155}

A reação do GA com o grupamento amino das proteínas de colágeno do PB depende de vários fatores, dentre os quais: espessura do tecido⁷¹, concentração do agente reticulador, tempo de fixação, temperatura e pH da reticulação.^{71,77,144} O pH da solução de reticulação deve permanecer entre 7 e 8, devido ao ponto isoelétrico da molécula de colágeno. Valores inferiores a 7 limitam a reação, enquanto valores maiores favorecem a formação de polímeros na solução fixadora e reduzem a eficácia da reação de reticulação do GA.⁷⁷

Em relação à concentração do GA, estudos têm demonstrado que as baixas concentrações podem ser mais adequadas para implantes de PB^{71,156} e a maioria das biopróteses atuais são fixadas em concentrações de GA, variando de 0,5% a 0,625%¹². Soluções com baixas concentrações de aldeídos derivados do GA produzem menor resposta inflamatória e elevada estabilidade térmica do pericárdio. Alguns autores compararam a temperatura de encolhimento em tecidos tratados por diferentes concentrações do agente fixador para o mesmo tempo de processamento e não encontraram diferenças significativas entre os dois materiais. A temperatura de encolhimento se refere à temperatura necessária para produzir um encurtamento do tecido estudado, sendo uma estimativa da quantidade de ligações cruzadas entre o fixador e as fibras colágenas.^{10,157,158}

O tempo de tratamento em GA pode variar de acordo com a espessura do material.⁷¹ Quando as ligações são estabelecidas entre GA e os resíduos de lisina e hidroxilisina, ocorre uma impermeabilização superficial que pode retardar a penetração do GA no interior do material.^{71,159} Dessa forma, inicialmente admitiu-se um protocolo de reticulação mais longo

como necessário para a formação de um maior número de ligações cruzadas no interior do material. Isso favoreceria a permanência do PB no sítio de implantação, uma vez que a degradação é inversamente proporcional ao número de ligações cruzadas estabelecidas.¹⁶⁰ Para Human e Zila (2001), a redução da calcificação pode ocorrer com tempos de exposição prolongados, o que poderia reduzir a antigenicidade residual do tecido xenógeno.⁵⁵ No entanto, o papel potencial da resposta imune do hospedeiro na calcificação degenerativa já havia sido refutado por estudos de Levy e colaboradores (1983), ao observarem calcificação de pericárdio porcino em modelo experimental *in vitro* e de forma independente de células imunológicas.¹⁶¹

Evidências sugerem que tempos prolongados de imersão em GA não são necessários à reticulação do tecido e que uma fixação adequada do PB pode ser alcançada com menores tempos de incubação, como mostram os estudos com base em temperaturas de encolhimento. Lee e colaboradores (2017) submeteram amostras de PB à reticulação em GA sob diferentes concentrações (0,3 0,4, 0,5 e 0,6%) e diferentes tempos de exposição (10 e 20 minutos) e encontraram, para concentrações fixas de GA, resultados superiores na extensibilidade, resistência à degradação enzimática e estabilidade térmica do material em tempos relativos maiores²⁰. Contudo, em referência aos achados de outro estudo prévio, advertiram que o tempo de fixação significativo para manutenção da estabilidade do tecido são os primeiros 20 minutos, que produzem 94% das ligações cruzadas obtidas em duas semanas de tratamento.¹⁰ Em outro trabalho, Hofferberth e colaboradores (2019) fixaram espécimes de pericárdio autólogo por 10 minutos em solução de 0,6% de GA e encontraram valores de estiramento satisfatórios para uso clínico.²¹

Estudo prévio realizado por outro autor sugere que 15 minutos de fixação no GA poderia fazer 80% do total das ligações cruzadas alcançadas em duas semanas de tratamento para a mesma concentração utilizada.¹⁹ Esses achados confirmaram os resultados de Woodroof e colaboradores (1978), de que a reação de reticulação ocorre de maneira rápida e se mostra quase completa após uma hora em tecidos fixados com soluções de GA, em baixas concentrações, entre 0,1 e 5%.¹⁴ Quanto maior o tempo de fixação em GA, mais estável tende a ser o PB implantado e mais resistente à destruição pelo organismo receptor. No entanto, Liao (1995), ao investigar o uso do PB em implantes subcutâneos de animais, observou que a calcificação era dependente do tempo de tratamento com GA e não da antigenicidade residual, já que enxertos de PB frescos (não processados com GA), apesar de exibirem intensa reação

inflamatória, não apresentaram calcificação. Quando tratadas com GA, as amostras de PB apresentaram calcificação, que aumentava com a elevação do tempo de exposição ao GA.¹⁹

Posteriormente, nos experimentos de Sinha e colaboradores.¹⁵⁵ e Lee e colaboradores²⁰, a análise quantitativa do teor de cálcio das amostras revelou uma tendência ao decréscimo da calcificação nos grupos com menor tempo de imersão em GA. Assim, a redução do tempo de tratamento poderia minimizar a calcificação tecidual pós implantação, por meio da eliminação ou redução de grupos aldeídos livres ou formas polimerizadas residuais de GA citotóxicos nos tecidos processados.^{10,19,67,155}

Diante do exposto, a influência do tempo de fixação em GA sobre o grau de calcificação do PB permanece controversa e os achados experimentais necessitam de maior investigação. Novos estudos são necessários para avaliar o efeito da redução do tempo de tratamento em GA, a fim de aprofundar o conhecimento de reticulação do PB com GA e propor protocolos que otimizem a reação de reticulação e preservem a integridade estrutural e biocompatibilidade das biopróteses bovinas.

4.8.3 Pós-tratamento para inativação de grupos aldeídos livres derivados do GA

Algumas substâncias químicas podem inativar os aldeídos tóxicos produzidos pela reticulação com GA. As substâncias empregadas são diaminas⁵⁵, aminoácidos, como o ácido glutâmico^{10,12,24,28,29,32}, e ácido alfa-linoleico.²² Também foi relatado o uso de agentes desintoxicantes, como etanol isolado ou associado ao ácido glutâmico e ao ácido cítrico.¹⁶²

Entre os agentes estudados, os aminoácidos são os elementos que parecem ter uma ação comprovadamente anticalcificante, por meio das ligações covalentes estabelecidas entre seus grupamentos amínicos com os aldeídos livres no tecido da bioprótese.^{12,20,32,109} A utilização de aminoácidos está associada à exposição de tecidos biológicos sob pH ácido^{10,25,163,164} ou alcalino¹⁶⁵, pois em ambos os valores de pH as ligações cruzadas de GA podem ser despolimerizadas.^{166,167} Por conseguinte, os grupos carbonílicos livres, remanescentes de uma reticulação incompleta no tecido processado, podem ser inativados com um aminoácido natural que reage com esses grupos e forma ligações químicas estáveis que resistem aos processos hidrolíticos quando expostos a condições fisiológicas. Esse efeito se relaciona com a redução da calcificação porque neutraliza de modo permanente os grupos aldeídos eletrofílicos que estavam expostos à ligação com íons cálcio.³⁰

Já foi demonstrado que o tratamento do PB com o ácido glutâmico, previamente fixado em GA, melhora sua biocompatibilidade e reduz a calcificação por inativar resíduos do GA. O pH ácido é utilizado nesses casos porque favorece a despolimerização do GA polimérico, de modo a facilitar a remoção de moléculas monoméricas não ligadas do tecido.^{67,163,164} Braile-Sternieri e colaboradores (2020) empregaram um protocolo de reticulação de PB com GA a 0,5% por dez dias e neutralização das amostras com uma solução de ácido glutâmico saturado em pH ácido de 3,5 por 24 horas. Após implantação *in vivo*, o tratamento com ácido glutâmico mostrou alta eficiência anticalcificante em ambos modelos experimentais utilizados, tanto o de implantação em tecido subcutâneo de ratos, quanto o modelo de implantação intracardíaca em ovelhas. O referido tratamento alterou a estrutura das fibras elásticas na MEC tecidual, mas não promoveu alterações indesejáveis nas propriedades térmicas e mecânicas dos PBs modificados.²³ Em outro estudo recente, Jiang e colaboradores (2022), ao utilizarem PB fixado em GA e modificado com o aminoácido glicina, conseguiram reduzir em 80% o nível de calcificação do PB, sem afetar suas propriedades biomecânicas.²⁴ Embora os tratamentos atuais não evitem completamente a deposição de cálcio nos implantes de PB, eles podem contribuir para uma maior durabilidade das BVCs pós-implante.

4.8.4 Combinação de métodos anticalcificantes

Convém ressaltar que, até o momento, nenhum tratamento prévio evita completamente a calcificação das biopróteses em condições clínicas.¹¹ Considerando a complexidade dos mecanismos envolvidos na calcificação das biopróteses tratadas com GA, uma solução seria a combinação de estratégias anticalcificantes, a fim de maximizar seus efeitos sobre a longevidade do xenoenxerto de PB. O emprego sinérgico e simultâneo de múltiplos tratamentos anticalcificantes parece ser a estratégia mais promissora e, por isso, devem ser examinados em futuros estudos clínicos, incluindo as estratégias de fixação de GA em baixas concentrações, a remoção de fosfolipídios e/ou resíduos de GA não ligados nos tecidos fixados e as modificações imunológicas com adição de agentes exógenos.^{10,23,24,32,45}

Novas metodologias incluem terapias medicamentosas para atenuar a calcificação de BVCs após a implantação *in vivo*, como o carbonato de sevelâmero, um aglutinante de fosfato sérico^{13,168} ou a fenitoína¹⁶⁹, que, ao promover mudanças no metabolismo do cálcio, podem ser capazes de atuar na inibição da calcificação distrófica. Ambos os fármacos, quando administrados na dieta, demonstraram potencial efeito anticalcificante de GAPBs implantados em tecido subcutâneo de ratos.

Sabe-se que um método desejável de reticulação do PB está relacionado com a prevenção da calcificação tecidual, mas também com a preservação das características biomecânicas essenciais à estabilidade das biopróteses, após um longo tempo de implantação.^{12,19} Válvulas acelulares têm demonstrado uma alternativa atraente para BVC, uma vez que parecem permitir o repovoamento pelas próprias células do hospedeiro, com consequente remodelação, crescimento e reparo de tecidos associados, além de apresentar menor propensão à calcificação e ao desempenho hemodinâmico adequado.⁴ Vale ressaltar, no entanto, que após a descelularização, o tratamento para fixação do tecido modificado é uma etapa essencial para sua aplicação em cirurgia cardiovascular, visto que os produtos naturais não reticulados apresentam biomecânica pobre e rápida degradação e, por isso, são inadequados sem a reticulação.^{32,45,78,135,147}

Por ser essencial à reticulação do PB, ajustes no tempo de fixação com GA podem ser sugeridos para a redução da calcificação, além do uso de aminoácidos e outros métodos. Tendo em vista ainda que os tempos ideais de tratamento do PB em GA aplicáveis clinicamente para biopróteses cardíacas não são conhecidos, são necessários estudos que avaliem os efeitos da redução do tempo de tratamento em GA para aumentar o conhecimento da reticulação do PB em GA e para propor protocolos que melhorem as propriedades biológicas e mecânicas das biopróteses.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção detalha dos procedimentos metodológicos em oito itens.

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

As amostras teciduais de pericárdio bovino com 1 cm², fornecidas pela Braile Biomédica (São José do Rio Preto – SP, Brasil), foram divididas em três grupos, de acordo com o tempo de fixação em GA e com a presença ou não de células no tecido. O grupo PB10d compreendeu os tecidos celularizados e fixados com soluções de GA por 10 dias. O grupo PB5d consistiu em tecidos celularizados e fixados com GA durante 5 dias. O grupo PB5dAC abrangeu as amostras teciduais acelulares fixadas com solução de GA por 5 dias (Tabela 1). As avaliações das características dos pericárdios bovinos foram realizadas antes e depois de sua implantação em tecido subcutâneo de ratos para todos os grupos. Os testes mecânicos e de estabilidade térmica foram realizados apenas na etapa pré-implantação, a caracterização química foi realizada apenas na etapa pós-implantação e as avaliações morfológicas por ML e MEV, bem como a análise do conteúdo de cálcio, foram realizadas nas etapas de pré e pós-implantação em tecido subcutâneo de ratos.

Tabela 1. Tipos de PB de acordo com o tempo de fixação em GA e a presença ou não de células.

Grupo	Tempo de fixação	Células
PB10d	10 dias	Sim
PB5d	5 dias	Sim
PB5dAC	5 dias	Não

Fonte: Elaboração da autora.

5.2 PREPARAÇÃO TECIDUAL

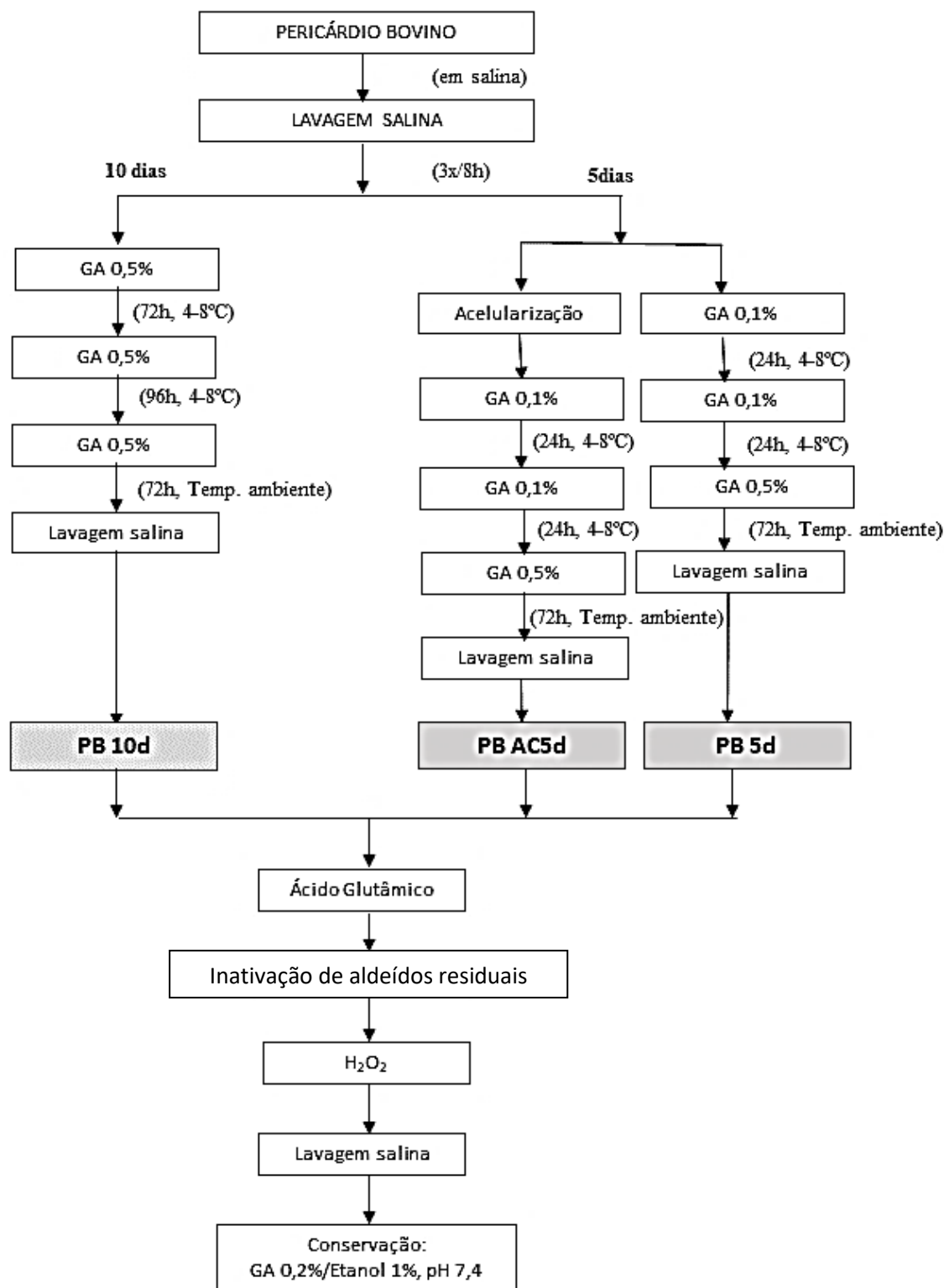
A obtenção do PB ocorreu em um frigorífico certificado, de forma imediata ao abate do animal previamente examinado pelo Serviço de Inspeção Federal e com até 36 meses de idade. O material seguiu armazenado em solução tamponada (pH 7,4) de cloreto de sódio e cloreto de magnésio, mantido a uma temperatura de 2°C a 15°C sendo imediatamente transportado para o laboratório da Braile Biomédica. O material biológico recebido é enxaguado em solução salina, passa por um processo de remoção da camada lipídica e de impurezas e, a

seguir, sofre inspeção quanto à homogeneidade. Para fins de controle de qualidade, são descartados possíveis infiltrados anormais, espessamentos, fenestrações ou defeitos de qualquer natureza. Após a etapa de seleção, é realizado o corte do material em fragmentos de 1cm².

A seguir, as amostras foram distribuídas aleatoriamente nos três grupos experimentais (PB10d, PB5d e PB5dAC). Todas as amostras foram imersas em solução de GA (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), cujo tempo de permanência e concentração da solução variou para cada tipo de processamento. Previamente à fixação com GA, as amostras do tipo PB5dAC foram submetidas a um tratamento de descelularização, com soluções de glicerol, ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), Triton X-100, ázida sódica e etanol, conforme o protocolo padronizado pela Braile Biomédica. Após esse processo, os pericárdios foram tratados com GA, conforme descrito a seguir.

As amostras dos grupos PB5d e PB5dAC foram fixadas com solução de GA, pH 7,4 por 5 dias (duas trocas com solução de GA a 0,1% e uma última troca com solução de GA a 0,5%), enquanto as amostras do grupo PB10d foram fixadas com solução de GA a 0,5%, pH 7,4, por 10 dias. A seguir, todos os materiais após fixação com GA passaram por tratamento com solução anticalcificante à base de ácido glutâmico e foram enxaguados com solução de cloreto de sódio 0,9%, em seguida armazenados em uma solução de GA a 0,2% e solução de etanol 1%, pH 7,4. As principais etapas de processamento do PB estão demonstradas no fluxograma a seguir (Figura 9).

Figura 9. Fluxograma com as etapas do processamento tecidual das amostras dos três grupos experimentais.



Fonte: Braile Biomédica Indústria Comércio e Representações Ltda.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

As propriedades térmicas e mecânicas das amostras foram avaliadas mediante testes físicos realizados no Laboratório de Ensaaios Físicos da Braille Biomédica. A caracterização física compreendeu a seleção aleatória de seis amostras pré-implantação dos grupos PB5d e PB10d e três amostras do grupo PB5dAC.

5.3.1 Teste de estabilidade térmica

O teste de estabilidade térmica avaliou a eficácia da substância fixadora sobre os componentes do pericárdio bovino, em especial sobre as fibras colágenas do tipo I, ao mensurar a temperatura de encolhimento ou “Ts” (*shrinkage temperature*), determinada em °C. A Ts é a temperatura necessária para produzir um encurtamento do tecido estudado, sendo diretamente proporcional à quantidade de ligações cruzadas formadas entre o fixador e as fibras colágenas, representando o ponto em que as proteínas teciduais são desnaturadas pelo calor. Dessa forma, quanto mais bem fixada estiver uma amostra de pericárdio bovino, maior será a sua estabilidade térmica, o que implicaria em uma maior Ts. O teste foi realizado em amostras de pericárdios com 2,00 cm x 0,8 cm, rejeitando-se aquelas que estivessem fora das proporções desejadas. A Ts corresponde à temperatura na qual a amostra apresenta um encolhimento igual ou superior a 20% em relação ao seu tamanho original, ao expô-la a uma variação térmica de 1°C por minuto.

Em geral, o pericárdio bovino fresco (não fixado) sofre retração em torno de 64°C, enquanto o pericárdio bovino fixado somente se deforma quando é submetido a temperaturas mais elevadas. Uma amostra imersa em GA estará adequadamente fixada quando a sua Ts estiver acima de 83°C, ou seja, as fibras colágenas do tipo I de sua MEC só se deformam quando submetidas a temperaturas acima de 83°C.

O ensaio foi realizado em equipamento validado e desenvolvido especialmente para esse fim (Braille Biomédica, SP, Brasil). Construído em aço inox, o equipamento comporta um sistema de aquecimento de água em banho-maria controlado eletronicamente, com resistências de 1 Kw para o aquecimento necessário de 1°C por minuto com quatro compartimentos, onde as amostras foram colocadas. Cada compartimento tem um sensor de temperatura (pastilha sensora PT-100), um sensor *hall*, um termômetro calibrado para a faixa entre 60 e 95°C, garras para fixação das amostras e *display* (Figura 10).

Figura 10. Equipamento de teste de temperatura de encolhimento (Braile Biomédica®).

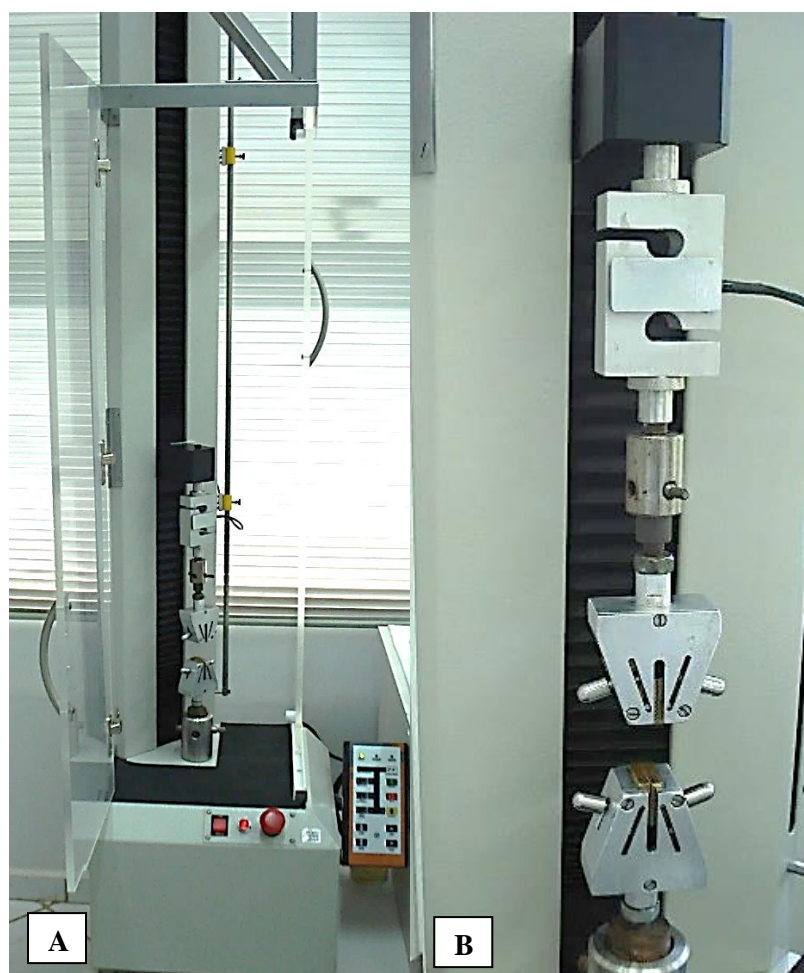


Fonte: Braile Biomédica Indústria Comércio e Representações Ltda.

5.3.2 Testes mecânicos

O estudo das propriedades mecânicas dos materiais tratados com GA foi realizado com os corpos de prova em conformidade com ASTM-D-638 (*Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics*). O equipamento utilizado (Figura 11) foi o Q-TEST (MTS Systems Corporation, número de série M206170/102398), equipado com medidor digital de força que opera a uma taxa de extensão de 100 mm/min. As propriedades avaliadas foram espessura (mm), resistência à tração (τ , kgf/mm²), alongação ($\epsilon\%$) e índice de tenacidade (calculado pelo produto da tração pela alongação, dividido por dois).

Figura 11. Torre do dispositivo de tração modelo Qtest/1L, marca MTS, série M206170/102398, com célula de carga de 1000 N (A) e garras para fixação dos corpos de prova para os ensaios (B).



Fonte: Braile Biomédica Indústria Comércio e Representações Ltda.

5.4 IMPLANTE SUBCUTÂNEO EM RATOS

Todos os procedimentos em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA), do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sob o protocolo nº 9262310518 (Anexo). Oitenta ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, machos, de três a quatro semanas de idade, com massa corpórea entre 80 e 90 gramas, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde. Os ratos foram nutridos com ração sólida peletizada (Nuvilab CR- 1, Nuvital Agropecuária Ltda.), hidratados *ad libitum* e em espaço climatizado, com ciclos claro-escuro de 12:12h.

Todos os animais receberam dois implantes subcutâneos de PB na sua região dorsal lateral. Alguns foram implantados com materiais dos grupos PB5d e PB10d, enquanto outros animais o foram com os materiais dos grupos PB5d e PB5dAC (Tabela 2).

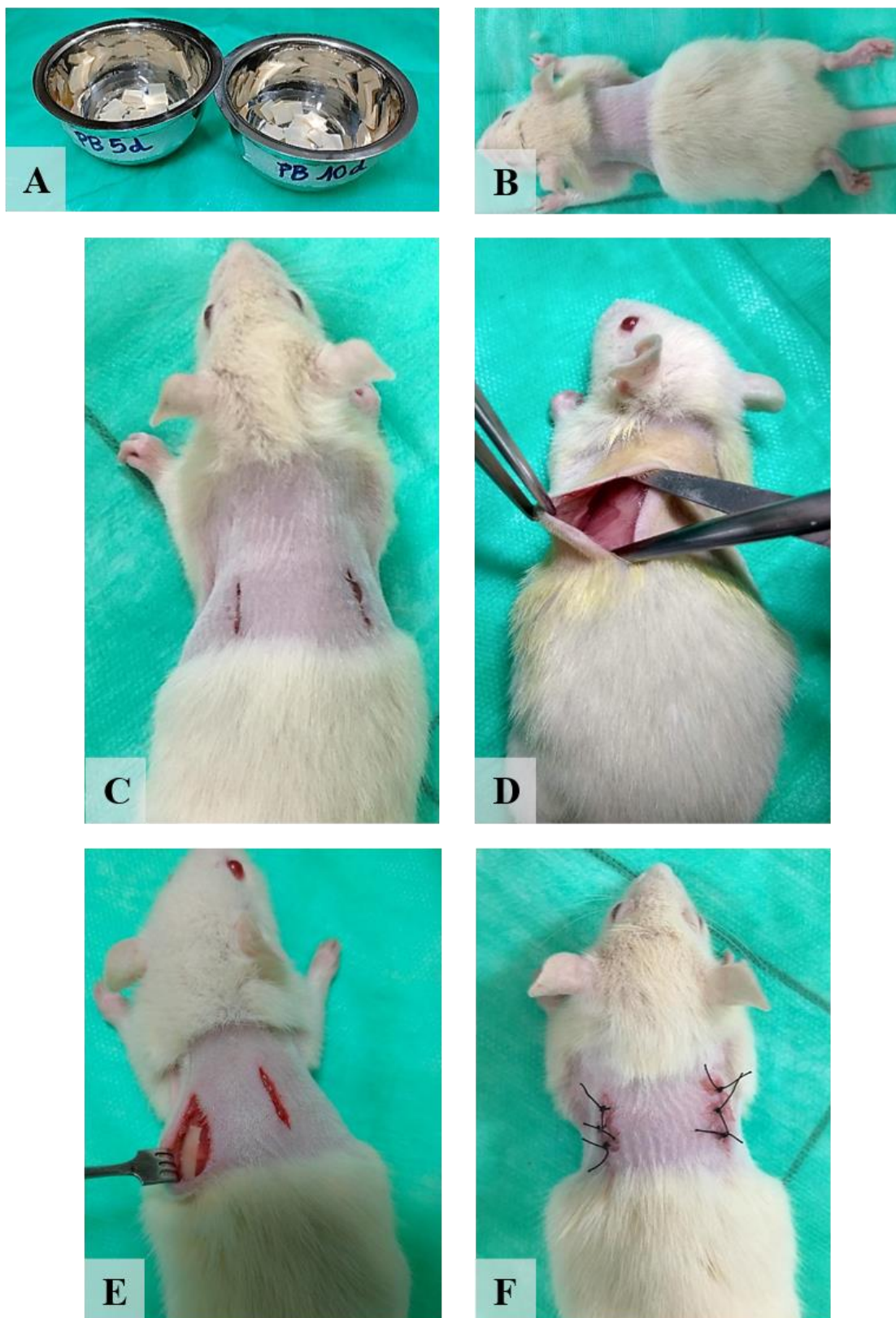
Tabela 2. Distribuição dos animais de acordo com o grupo experimental e o ponto biológico.

Períodos/grupos	PB5d/PB10d	PB5d/PB5dAC	Total
7 dias	10	-	10
14 dias	10	10	20
28 dias	10	10	20
60 dias	10	10	20
120 dias	10	-	10
Total	50	30	80

Fonte: Elaboração da autora.

Os animais foram anestesiados com injeções intraperitoneais de solução contendo cloridrato de quetamina (Dopalen®, Ceva Santé Animale), na proporção de 7,0 mg/100 g, e cloridrato de xilazina (Anasedan®, Ceva Santé Animale), na proporção de 0,8 mg/100 g. Após tricotomia e antissepsia com solução aquosa de polivinilpirolidona-iodo (PVPI tópico), realizaram-se duas incisões lineares paravertebrais na pele da região dorsal, abaixo da linha de fixação do membro superior, em ambos os lados - direito e esquerdo de cada animal. As incisões tinham aproximadamente 1,5 cm de comprimento, eram paralelas entre si, afastadas em cerca de 5,0 cm e aproximadamente equidistantes em relação ao longo do eixo da coluna vertebral. Utilizou-se uma tesoura com ponta romba para divulsão do tecido da tela subcutânea subjacente à pele (hipoderme), a fim de criar duas bolsas subcutâneas na área dorsal de cada rato (Figura 12). Após duas lavagens de quinze minutos em água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA), as amostras de PB com dimensões de 1 cm² foram implantadas nas bolsas subcutâneas e as suturas realizadas com fio de seda 4-0.

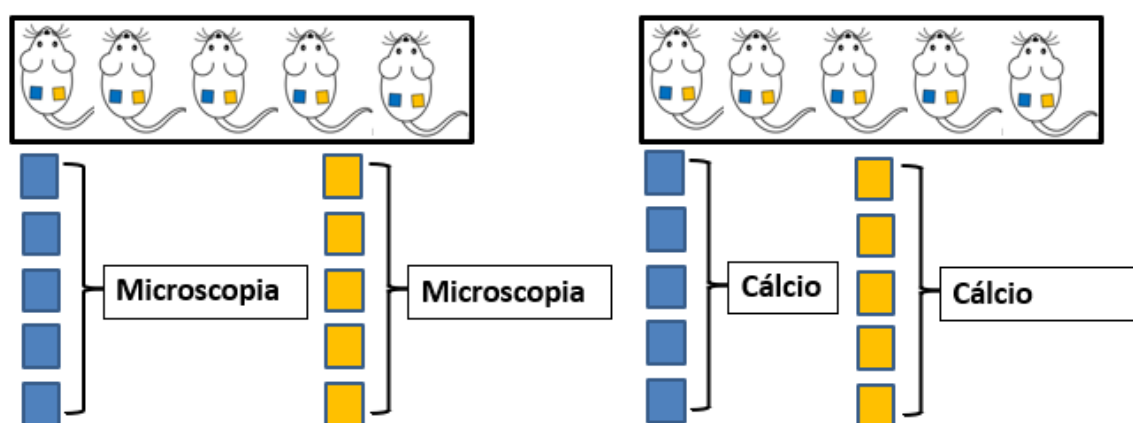
Figura 12. Etapas do procedimento cirúrgico. Lavagem dos biomateriais (A), tricotomia (B), incisões cutâneas (C), divulsão para criação de bolsa subcutânea (D), implantação do biomaterial (E), e sutura (F).



Fonte: Elaboração da autora.

Os materiais foram explantados de forma seriada, decorridos 7, 14, 28, 60 e 120 dias da intervenção cirúrgica. Os pontos biológicos foram determinados em conformidade com a ISO 10993 e a etapa cirúrgica consistiu em eutanásia com sobredosagem de uma solução com cloridrato de quetamina (18 mg/100g) e cloridrato de xilazina (3 mg/100g), via intraperitoneal, seguida da retirada dos materiais. O acesso aos implantes ocorreu pela realização de incisões bilaterais e paravertebrais de 4,0 cm e delicada dissecação. Os implantes foram localizados por inspeção visual e palpação, sendo cuidadosamente removidos com pinças histológicas e pinças cirúrgicas de dissecação. Do número total de explantes, metade foi destinada à avaliação histológica e a outra metade submetida à dosagem de cálcio (Figura 13).

Figura 13. Distribuição das amostras explantadas (n=10 para cada tempo biológico), de acordo com a análise submetida



Fonte: Elaboração da autora.

Nos explantes destinados à avaliação histológica, uma porção marginal de tecido (mínimo de 2 mm de área adjacente) foi mantida para exame microscópico, enquanto nos explantes destinados à avaliação quantitativa do teor de cálcio, os tecidos orgânicos do hospedeiro aderentes ao explante foram removidos da superfície, a fim de não interferir na mensuração quantitativa de cálcio nesse material. A seguir, todas as amostras foram lavadas em água ultrapura e armazenadas em frascos estéreis contendo solução fixadora de formaldeído a 4%, tamponada em fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2).

5.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA (PRÉ E PÓS-IMPLANTAÇÃO)

O estudo morfológico foi realizado em amostras pré e pós-implantação, por microscopia de luz no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do ICS/UFBA e por microscopia eletrônica de varredura, na Plataforma de Microscopia Eletrônica da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-BA).

5.5.1 Análise por microscopia de luz (ML)

As amostras fixadas em solução tamponada de formaldeído a 4% foram lavadas em tampão fosfato 0,05M por dez minutos, desidratadas em soluções com concentração crescente de etanol e diafanizadas. As amostras teciduais foram incluídas em parafina para permitir a obtenção de secções transversais e longitudinais do PB com 4 µm de espessura. Em seguida, as lâminas histológicas foram coradas por hematoxilina-eosina (HE), orceína, *Von Kossa* e Tricômico de *Masson*.

As amostras representativas de cada grupo foram examinadas e fotografadas em sistema digital de aquisição de imagem com microscópio Nikon Eclipse E-200 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) posicionado em objetiva de 40X, acoplado a uma câmera Tucsen TrueChrome Metrics (International Stemmer Imaging, Puchheim, Germany). O *software* utilizado para captura e análise das imagens foi o TUCSON Tcapture (International Stemmer Imaging, Puchheim, Germany).

Os resultados foram descritos com base na presença, natureza e intensidade da inflamação, fibrose, necrose, formação de cápsula, neovascularização e tipos celulares inflamatórios predominantes, em análise semiquantitativa, adaptada a partir de Thampi e colaboradores (2013).⁴⁶ Os achados foram categorizados segundo graus de intensidade em ausente (0), discreto (1), moderado (2) e severo (3), considerando-se como discreto todo parâmetro que comprometia o espécime em no máximo 25%; moderado, até 50%; e intenso, acima de 50% da lâmina observada. A análise foi realizada por dois avaliadores de forma independente e as eventuais discrepâncias foram discutidas até alcançar o consenso.

5.5.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O estudo das amostras pré e pós-implantação em MEV observou a integridade tecidual e as diferenças ultra estruturais existentes entre os materiais PB5d/PB10d e PB5d/PB5dAC. As amostras pré-implantação, que estavam conservadas em solução de GA 0,2% e etanol 1%, foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4), pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% tamponado com cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,4) por 30 minutos, novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M e desidratadas em uma série de soluções com concentração crescente de etanol. A secagem final das amostras foi realizada na câmara de ponto crítico (Leica Geosystems, Switzerland). Por último, os espécimes foram montados sobre *stubs* de alumínio, colocados no aparelho Bal-Tec SCD 050 (Liechtenstein) para pulverização superficial com ouro e examinados no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV (Jeol Ltd, Tóquio, Japão), operado em 10–15 kV.

5.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA (PÓS-IMPLANTAÇÃO)

Alguns fragmentos de amostras aleatórias, explantadas de 120 dias dos grupos PB5d e PB10d, foram encaminhados para a análise da composição química elementar semiquantitativa por meio de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX) em detector (Thermo Fisher Scientific™) devidamente calibrado e acoplado a microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV (Jeol Ltd, Tóquio, Japão), utilizando energia de aceleração de elétrons de 15kV e ponto de detecção no ângulo de 35°. O preparo das amostras foi similar ao protocolo de processamento de amostras para MEV, excetuando-se as etapas de pós-fixação em tetróxido de ósmio e metalização em ouro.

5.7 ANÁLISE DO TEOR DE CÁLCIO (PRÉ E PÓS-IMPLANTAÇÃO)

A avaliação quantitativa para detecção do teor de cálcio tecidual foi realizada em amostras pré e pós-implantação, no Laboratório de Química Analítica do Instituto de Química (IQ/UFBA), por meio da Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES).

A análise em tempo zero foi realizada por amostragem aleatória, a fim de confirmar se as amostras de PB fixadas em GA estavam isentas de calcificação antes da implantação *in vivo*.

O grau de calcificação tecidual dos materiais explantados também foi quantificado para comparação com as amostras iniciais da etapa pré-implantação.

Para preparo das amostras, as massas foram pesadas, empregando uma balança analítica (modelo Toledo AB 204-05, Mettler-Toledo, *Polaris Parkway*, Columbus, EUA), e transferidas para frascos de politetrafluoretileno. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL de HNO₃ 65% destilado (mm⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha), 1,0 mL de H₂O₂ (% m m⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha) e 4,0 mL de água deionizada. As soluções foram preparadas com água deionizada com resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹, purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Em seguida, os frascos foram fechados e submetidos a aquecimento em um bloco digestor (modelo TE007-A, TECNAL, São Paulo-SP, Brasil), a uma temperatura de 180 °C, por 120 minutos. Após o período de digestão das amostras, os frascos foram abertos depois de total esfriamento, para não ocorrer perda e riscos de projeção do material no momento de sua abertura. Em seguida, toda a solução foi pesada e transferida para tubos de centrífuga (Falcon) e avolumados para 10,0 mL com água deionizada.

A análise química foi realizada com um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo E720, Agilent, Mulgrave, Austrália), utilizando as condições operacionais padrão do fabricante para espectrômetro, como, potência de radiofrequência de 1,2 kW e a vazão de gás de nebulização de 0,8 L min⁻¹. O gás argônio foi utilizado como gás de nebulização e geração do plasma com pureza mínima de 99,9999% (White Martins, São Paulo, Brasil). Um nebulizador pneumático do tipo Sea Spray com uma câmara de duplo passo foi usado para introdução da amostra. As concentrações de cálcio foram determinadas utilizando o comprimento de onda em 317,933 nm.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo *software* “R” (versão 4.1.2), onde se realizou análise descritiva (mediana e quartis), com a finalidade de identificar as características gerais e específicas da amostra estudada. A normalidade da distribuição dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk e análise de simetria e achatamento. Para identificar a existência de diferenças significativas quanto às propriedades térmicas e mecânicas dos materiais não implantados, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes. Para identificar a existência de diferenças significativas nos parâmetros estabelecidos após a implantação entre os diferentes grupos, a cada tempo de

sacrifício, utilizou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon para dados emparelhados e entre os diferentes tempos de sacrifício no mesmo material, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguindo pelo teste *a posteriori* de Dunn. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

6 RESULTADOS

Os resultados desta pesquisa estão documentados sob a forma de dois artigos científicos, conforme indicação a seguir.

6.1 ARTIGO 1

Efeitos do tempo de fixação com glutaraldeído sobre as características do pericárdio bovino e sua calcificação *in vivo*

Raísa Cavalcante Dourado^{1,4*}, Aparecida de Fátima Giglioti², Gilberto Goissis², Rennan Geovanny Oliveira Araujo³, Isabela Cerqueira Barreto¹, Márcio Cajazeira Aguiar⁴

¹Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

²Braile Biomédica Indústria Comércio e Representações Ltda., São José do Rio Preto, Brasil

³Laboratório de Química Analítica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

⁴Laboratório de Histotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

*Email: raisadourado@yahoo.com.br

Resumo

Introdução: O pericárdio bovino (PB) fixado em glutaraldeído (GA) é o material mais utilizado para a fabricação de biopróteses valvulares cardíacas. O tratamento com GA, ao proporcionar a reticulação do colágeno, garante uma adequada estabilidade biomecânica ao tecido, porém é um dos principais fatores envolvidos na calcificação e deterioração do PB, limitando a longevidade clínica das biopróteses. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da redução do tempo de fixação com GA sobre as propriedades físicas do PB e calcificação *in vivo* do tecido em um modelo de implantação subcutânea em rato. **Material e métodos:** Os PBs foram divididos em dois grupos: PB10d (fixados com GA por 10 dias) e PB5d (fixadas com GA por 5 dias). Após a fixação, todas as amostras foram tratadas com ácido glutâmico para neutralização de grupos aldeídos residuais do GA no tecido e avaliadas por testes mecânicos e de estabilidade térmica, além de caracterizadas histologicamente por microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após 7, 14, 28, 60 e 120 dias de implantação, as amostras foram submetidas à nova avaliação histológica por ML e MEV, além de analisadas quanto ao teor de cálcio, por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). **Resultado:** A redução do tempo de fixação em GA não alterou de forma significativa as propriedades físicas do PB e resultou em efeitos benéficos ao tecido, pois as amostras do grupo PB5d exibiram um padrão de matriz extracelular mais organizada e uma resposta inflamatória mais branda. Os valores de calcificação foram baixos em ambos os grupos pelo efeito do ácido glutâmico, com um menor teor de cálcio no grupo PB5d. **Conclusão:** A fixação do PB em GA por 5 dias e o tratamento em ácido glutâmico demonstraram um grande poder anticalcificante, adequada biocompatibilidade e boa preservação das propriedades físicas de tecidos PB, constituindo-se em uma opção de protocolo para o desenvolvimento de novas biopróteses.

Descritores: pericárdio bovino; calcificação; reticulação; glutaraldeído; ácido glutâmico.

1 INTRODUÇÃO

Há uma crescente prevalência de valvopatias em todo o mundo, onde a demanda deverá atingir 850 mil intervenções cirúrgicas até 2050.¹ A substituição valvar cirúrgica tem sido a principal opção terapêutica para o tratamento de pacientes sintomáticos com valva cardíaca estenótica ou regurgitante. As opções disponíveis para substitutos valvares são as próteses mecânicas e as próteses biológicas, estas denominadas de biopróteses valvulares cardíacas (BVCs). As valvas mecânicas apresentam grande resistência à degradação, mas o alto potencial trombogênico requer terapia anticoagulante permanente.² Comparativamente, as BVCs têm melhor biocompatibilidade e ótimo desempenho hemodinâmico, além de dispensar terapia anticoagulante. As BVCs podem ser preparadas a partir de tecidos xenogênicos, como aqueles derivados de cúspides de valva aórtica porcina e de pericárdio bovino (PB) tratado com glutaraldeído (GA) para sua reticulação química e consequente fixação tecidual.^{3,4}

O PB fixado em glutaraldeído (GAPB) é o material de escolha para a fabricação de biopróteses valvulares. Folhetos desse material são montados em um anel periférico de suporte, oferecendo geometria e perfis hemodinâmicos semelhantes aos das valvas cardíacas nativas.⁵ No entanto, as BVCs preparadas com GAPB têm durabilidade limitada de 10 a 15 anos, devido a falhas de funcionamento dos folhetos de PB.^{1,6} Danos teciduais por fadiga mecânica e calcificação distrófica são as principais causas dessa falha, onde o tratamento com GA é conhecido por acelerar a calcificação.⁶⁻⁸

A calcificação se inicia com a deposição de fosfatos de cálcio sobre o implante, o que causa um enrijecimento estrutural das BVCs, resultando em uma união imperfeita entre as cúspides durante o fechamento da bioprótese e em uma redução do seu desempenho hemodinâmico. Como consequência do seu mau funcionamento, surgem disfunções como regurgitação, estenose e fraturas⁹, levando à necessidade de sua substituição cirúrgica. Em alguns casos, essa cirurgia pode ser requerida em até 7 anos pós-implante, com cerca de 50% dos casos de reoperação resultando em óbito.¹⁰ Diante do exposto, as implicações clínicas da calcificação sobre a durabilidade de biopróteses de PB têm estimulado uma extensa investigação sobre o tema nos últimos anos.

A fim de prevenir ou retardar a calcificação do PB, muitas estratégias anticálculo têm sido desenvolvidas, como a diminuição dos fosfolípidios teciduais por meio de técnicas de descelularização^{11,12}, adição de compostos a base de ácido hialurônico^{13,14}, de glicosaminoglicanos sulfatados¹⁵ e redução dos grupos de aldeídos residuais provenientes do tratamento com o GA.¹⁶⁻¹⁸ Desafios ao desenvolvimento de novas estratégias compreendem o fato de, muitas vezes, o pré-tratamento das biopróteses interferir nas suas propriedades biomecânicas e, além disso, o mecanismo de calcificação é complexo, multifatorial e pobremente entendido. As estratégias para diminuir os grupos de aldeídos residuais disponíveis para a calcificação no PB incluem a redução do tempo de fixação com GA e a neutralização desses grupos funcionais por incubação do tecido em soluções com aminoácidos.

Sabe-se que a etapa de reticulação com GA é essencial para reduzir a antigenicidade e melhorar a estabilidade biomecânica do tecido GAPB pós-implantação.^{3,4,19} Contudo, o tratamento com GA parece danificar a matriz extracelular (MEC) do GAPB, além de torná-

lo citotóxico a células nativas do hospedeiro, o que dificulta a reendotelização.²⁰ De forma promissora, há estudos que mostram a preservação de propriedades físicas de PB submetidos a curtos períodos de incubação em GA.^{19,21-23} Sendo assim, seria possível supor que o tempo de reticulação com GA dos PBs poderia ser reduzido para diminuir os efeitos indesejáveis produzidos por esse reagente químico, preservando as propriedades mecânicas necessárias para o seu emprego na substituição de valvas cardíacas.

Embora os tratamentos atuais não evitem completamente a deposição de cálcio nos implantes de PB, eles podem aumentar a durabilidade das BVCs pós-implante. Uma forma de maximizar a redução da calcificação pós-implante e aumentar a longevidade dos xenoinxertos de PB seria associar diferentes estratégias anticalcificantes.^{11,17,18,24} Já foi demonstrado que a técnica de incubação do GAPB com aminoácidos é capaz de melhorar a biocompatibilidade desse tecido e reduzir a sua calcificação *in vivo*, em comparação com materiais processados apenas com GA. A interação de aminoácidos com o PB fixado permite a formação de ligações covalentes estáveis entre os grupamentos amínicos dos aminoácidos e os aldeídos livres no tecido da bioprótese, de modo a inativar de modo permanente os grupos aldeídos eletrofílicos disponíveis para ligação com os íons cálcio.¹⁶⁻¹⁸ O efeito do tratamento com aminoácido ácido glutâmico sobre o GAPB implantado *in vivo* já foi apontado por alguns estudos como uma estratégia anticalcificante eficaz^{25,26} e que não promove alterações indesejáveis nas propriedades térmicas e mecânicas dos PBs processados.¹⁷ Esses resultados encorajam a utilização dessa substância no processamento de PBs, a fim de maximizar o efeito anticalcificante obtido pela estratégia de redução do tempo de fixação.

Considerando que os tempos ideais de tratamento do PB em GA, indicados para o preparo de biopróteses valvulares cardíacas, não são conhecidos e que a combinação de múltiplos tratamentos anticalcificantes pode ser uma estratégia promissora para aumentar a durabilidade de BVCs, o presente trabalho investigou os efeitos da redução do tempo de fixação com GA e do tratamento com ácido glutâmico sobre as propriedades físicas do PB e, mediante um modelo de implantação em tecido subcutâneo de ratos, avaliou a biocompatibilidade e a calcificação dos PBs.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação dos tecidos

As amostras teciduais de PB foram preparadas na empresa Braile Biomédica (São Paulo – Brasil), obtidas de animais de até 36 meses em um frigorífico certificado, armazenadas em uma solução tamponada (pH 7,4) de cloreto de sódio e cloreto de magnésio e mantidas a uma temperatura de 2°C a 15°C. Após a dissecação, os PBs foram lavados em solução salina, seccionados em fragmentos de 1 cm² e fixados.

As amostras foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais de acordo com o tempo de fixação em GA (*Sigma Chemical Company*, EUA). O grupo PB10d compreendeu os tecidos fixados com soluções a 0,5% de GA por 10 dias, enquanto o grupo PB5d consistiu em tecidos fixados com GA durante 5 dias (solução a 0,1% por 2 dias + solução a 0,5% por 3 dias). Após a fixação, todas as amostras foram imersas em uma solução anticalcificante de ácido glutâmico, lavados com solução a 0,9% de cloreto de sódio e depois armazenadas em uma mistura de uma solução a 0,2% de GA e solução a 1% de etanol, pH

7,4.

2.2 Caracterização dos materiais

Para caracterização dos materiais, testes mecânicos e de estabilidade térmica foram realizados na empresa Braile Biomédica (São Paulo, Brasil). Para o teste de estabilidade térmica, foi empregado o método hidrotérmico com um extensômetro customizado, a fim de avaliar o grau de reticulação das fibras colágenas no processo de preservação do pericárdio. As análises foram realizadas tomando como parâmetro medidas de temperatura de encolhimento ou “Ts” (*shrinkage temperature*), determinada em °C. A Ts corresponde à temperatura na qual a amostra apresenta um encolhimento igual ou superior a 20% em relação ao seu tamanho original. Os corpos de prova moldados medindo 2,0 cm x 0,8 cm foram mantidos em extensão constante ao longo do eixo em um sistema de banho-maria controlado eletronicamente, com resistências de 1 Kw para o aquecimento necessário de 1°C por minuto.

O estudo das propriedades mecânicas dos materiais dos grupos PB5d/PB10d foi realizado com corpos de prova moldados em conformidade com ASTM-D-638 (*Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics*). As propriedades avaliadas foram espessura (mm), resistência à tração (τ , kgf/mm²), alongamento na ruptura ($\epsilon\%$) e índice de tenacidade (calculado pelo produto da tração pela elongação, dividido por dois). A espessura do tecido foi medida em três pontos usando um medidor de espessura (Mitutoyo, Japão) e as propriedades de tração foram avaliadas utilizando uma máquina de teste de tração Q-TEST (MTS *Systems Corporation*) equipada com medidor digital de força que opera a uma taxa de extensão de 100 mm/min. A resistência à tração, alongamento e tenacidade foram avaliados a partir de parâmetros de referência aceitos para GAPB destinado à fabricação de próteses valvulares biológicas.

2.3 Implantação subcutânea em ratos

Todos os procedimentos em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Brasil (protocolo nº 9262310518), onde essa etapa experimental foi realizada. Foram utilizados 50 ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, machos, com 3-4 semanas de idade e massa de 80-90 gramas, obtidos de uma colônia de reprodução local, saudáveis e sem patógenos estritos. Os animais foram mantidos em 24°C com um ciclo de claro/escuro de 12/12h

Cada animal recebeu dois implantes subcutâneos de PB, sendo um em região ântero-lateral dorsal esquerda (PB10d) e outro em região ântero-lateral dorsal direita (PB5d). A anestesia foi realizada com uma combinação de quetamina (7,0 mg/100g) e xilazina (0,8 mg/100 g), via intraperitoneal. Após a tricotomia e antisepsia na região dorsal de ambos os lados, a pele do dorso foi aberta com duas incisões separadas (cada uma de 1,5cm), paralelas à coluna vertebral. Imediatamente antes da implantação, todas as amostras de tecido foram lavadas em água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). As amostras de PB foram implantadas em bolsas subcutâneas que foram posteriormente fechadas com fio de seda 4-0.

Os explantes seriados foram realizados após 7, 14, 28, 60 e 120 dias (n=10 para cada tempo biológico). Os animais foram sacrificados com sobredosagem de uma solução de

quetamina (18 mg/100g) e xilazina (3 mg/100g), via intraperitoneal. O acesso aos materiais implantados ocorreu pela realização de incisões bilaterais e paravertebrais, seguida de delicada dissecação. Do número total de amostras explantadas do mesmo grupo, metade foi destinada à avaliação histológica e a outra metade submetida à dosagem de cálcio. Os explantes destinados à avaliação histológica foram removidos, com preservação de 2 mm de tecido além da borda do implante. Todas as amostras foram lavadas em água ultrapura e armazenadas em solução a 10% de formalina tamponada (pH 7,2).

2.4 Avaliação histológica (pré e pós-implantação)

O estudo morfológico foi realizado em amostras pré e pós-implantação, por microscopia de luz (ML) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras indicadas para ML foram fixadas em solução tamponada de formaldeído a 4%, lavados em tampão fosfato 0,05M por dez minutos, desidratadas em uma série crescente de etanol, diafanizadas com xilol e incluídas em parafina de forma a obter secções semi-seriados de 4 µm, paralelas e transversais. Em seguida, as amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), Tricômico de *Masson*, Orceína e *Von Kossa*.

As imagens foram capturadas com auxílio de um sistema digital de aquisição de imagem contendo microscópio Nikon Eclipse E-200 (*Nikon Instruments Inc.*, Melville, NY, USA) com magnificação de 400X, acoplado a uma câmera *Tucsen TrueChrome Metrics (International Stemmer Imaging, Puchheim, Germany)*. O software utilizado para captura e análise das imagens foi o *TUCSON Tcapture (International Stemmer Imaging, Puchheim, Germany)*.

O estudo morfológico compreendeu a avaliação da organização e integridade das fibras colágenas e fibras elásticas e para a presença de depósitos calcificados. Os resultados após a implantação foram descritos com base na presença, natureza e intensidade da inflamação, fibrose, necrose, formação de cápsula, neovascularização e tipos celulares inflamatórios predominantes, em análise semiquantitativa adaptada a partir de *Thampi et al. (2013)*.²⁷ Os achados foram categorizados segundo graus de intensidade em ausente (0), discreto (1), moderado (2) e intenso (3), considerando-se como discreto todo parâmetro que comprometia o espécime até 25%, moderado 26% até 50% e intenso $\geq 51\%$ da lâmina observada.

As amostras indicadas para MEV foram fixadas em uma solução contendo 2% de GA e 2,5% de formaldeído (estudo morfológico) tamponada em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4), pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% tamponado por 30 minutos, novamente lavadas em cacodilato de sódio 0,1 M e desidratadas em uma série crescente de etanol. Após secagem em ponto crítico (*Leica Geosystems, Switzerland*), os espécimes foram montados sobre stubs de alumínio, colocados no aparelho Bal-Tec SCD 050 (*Liechtenstein*) para pulverização superficial com ouro e examinados em microscópio JEOL JSM-6390LV (*Jeol Ltd, Japão*), operando em 10–15 kV.

2.5 Quantificação do cálcio (pré e pós-implantação)

O teor de cálcio nos materiais explantados foi determinado por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES). A análise em tempo zero

foi também realizada para controle negativo, por amostragem aleatória. Para preparo das amostras, as massas foram pesadas em balança analítica (Mettler-Toledo, EUA) e transferidas para frascos de politetrafluoretileno. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL de HNO₃ 65% destilado (Merck, Alemanha), 1,0 mL de H₂O₂ (Merck, Alemanha) e 4,0 mL de água deionizada. As soluções foram preparadas com água deionizada com resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹, purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). Os frascos foram então fechados e submetidos a aquecimento em um bloco digestor (TECNAL, Brasil) a uma temperatura de 180 °C, por um tempo de 120 minutos. Em seguida, toda a solução foi pesada e transferida para tubos de centrífuga (Falcon) e avolumados para 10,0 mL com água deionizada.

A análise química foi realizada com um Espectrômetro de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (Agilent, Austrália) utilizando as condições operacionais padrão do fabricante para espectrômetro como, potência de radiofrequência de 1,2 kW e a vazão de gás de nebulização de 0,8 L min⁻¹. O gás argônio foi utilizado como gás de nebulização e geração do plasma com pureza mínima de 99,9999% (White Martins, Brasil). Um nebulizador pneumático do tipo Sea Spray com uma câmara de duplo passo foi usado para introdução da amostra. As concentrações de cálcio foram determinadas utilizando o comprimento de onda em 317,933 nm.

A análise da composição química elementar semiquantitativa foi realizada apenas após implantação, por meio de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX) em detector (*Thermo Fisher Scientific*TM) calibrado e acoplado ao microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV (Jeol Ltd, Tóquio, Japão), com energia de aceleração de elétrons de 15kV e ponto de detecção no ângulo de 35°. Utilizou-se fragmentos de amostras aleatórias explantadas de 120 dias dos grupos PB5d e PB10d, processados de forma similar a amostras encaminhadas para MEV, excetuando-se as etapas de pós-fixação em tetróxido de ósmio e metalização em ouro.

2.6 Análise estatística

Todos os dados foram apresentados com mediana e quartis. Após o teste de *Shapiro-Wilk* para normalidade, os grupos foram comparados utilizando análises paramétricas de *Wilcoxon* para dados emparelhados. Comparações entre tempos biológicos foram realizadas utilizando teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste post-hoc de Dunn. A análise estatística foi realizada com o software livre “R” (versão 4.1.2). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando for $p < 0,05$.

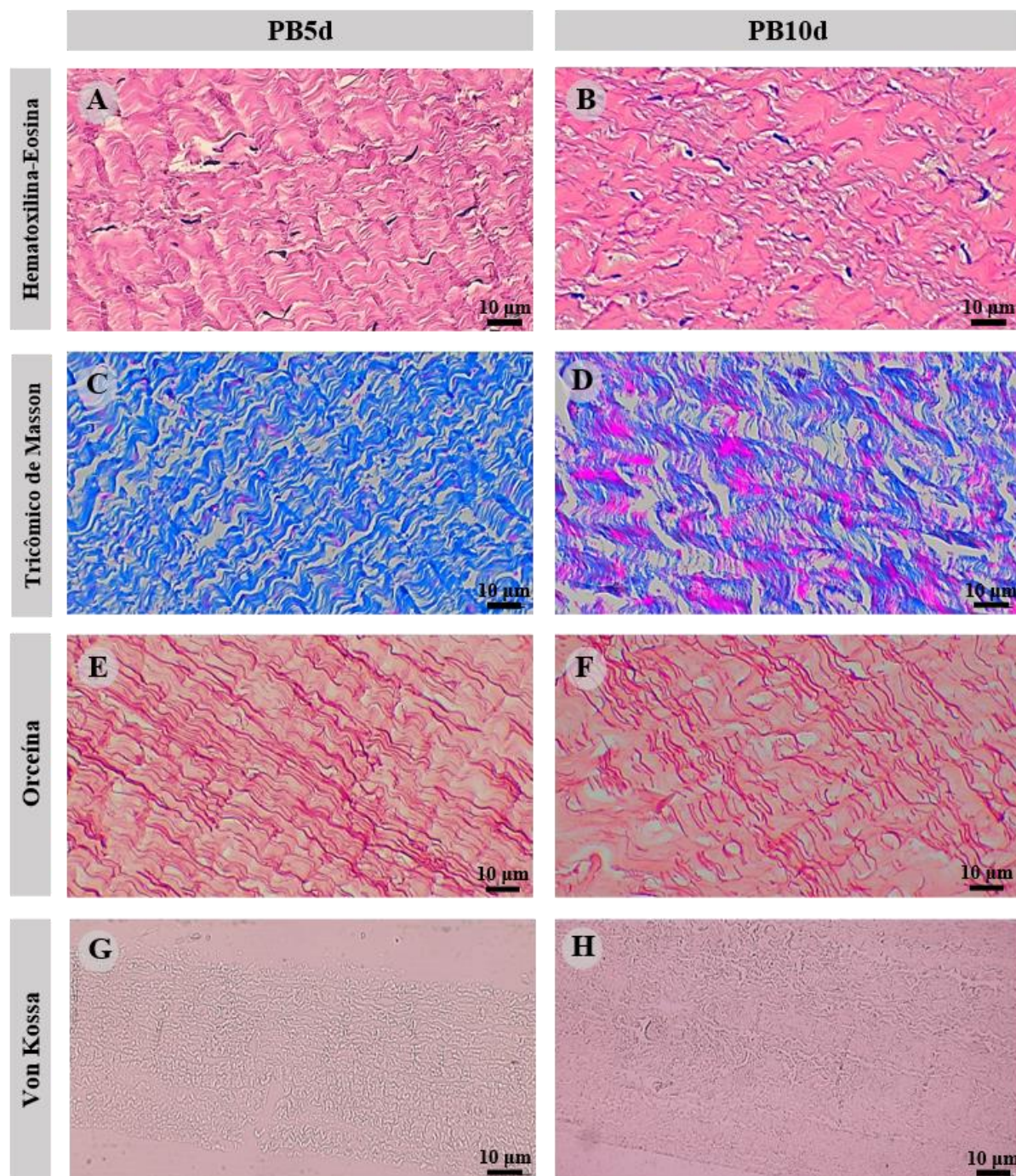
3 RESULTADOS

3.1 Análise histológica (pré-implantação)

A análise microscópica de PB5d e PB10d não implantados revelou uma matriz vascularizada com muitos fibroblastos. Contudo, diferenças importantes foram observadas no arranjo e estrutura das fibras colágenas e fibras elásticas entre os grupos. Na análise por ML, as amostras do grupo PB5d exibiam uma matriz organizada, com fibras colágenas de aspecto ondulado (Figura 1A, C) e fibras elásticas bem preservadas, com distribuição

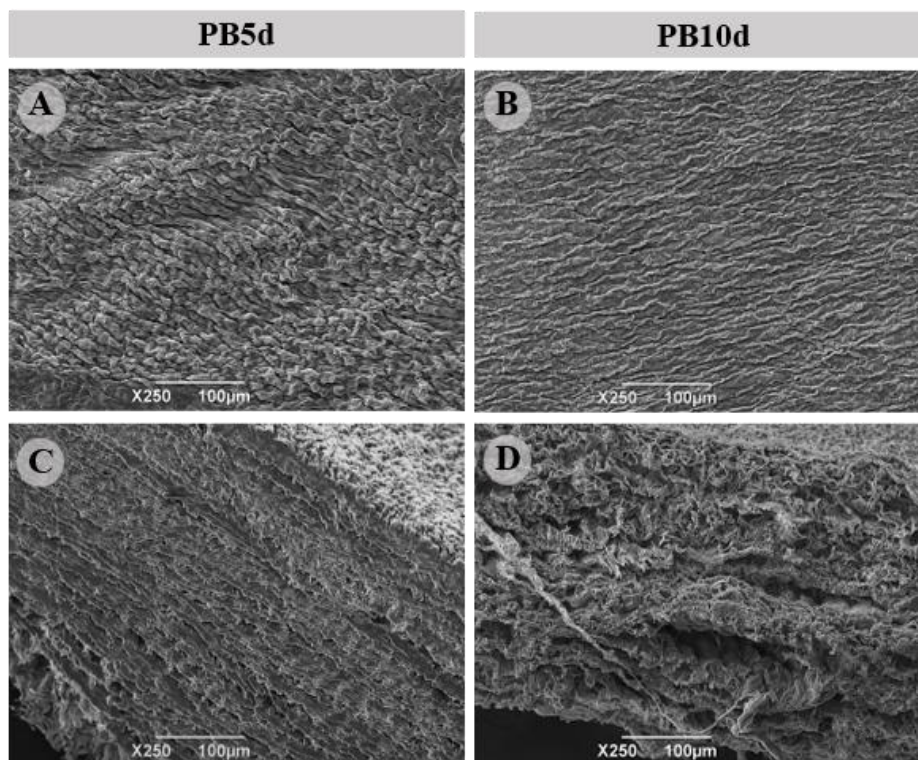
uniforme (Figura 1E). As amostras do grupo PB10d apresentavam comparativamente uma malha de colágeno mais eosinófila e desorganizada (Figura 1B), fibras colágenas menos onduladas (Figura 1D) e fibras elásticas rompidas (Figura 1F). A análise por Von Kossa não detectou presença de calcificação em nenhuma amostra de ambos os grupos (Figura 1G, H). O estudo ultraestrutural por MEV de ambos os materiais revelou uma maior integridade estrutural das fibras colágenas em PB5d (Figura 2A, C), enquanto as amostras do grupo PB10d mostravam a presença de fibras colágenas mais retificadas e compactadas (Figura 2B, D).

Figura 1 Fotomicrografias de PB pré-implantação dos grupos PB5d e PB10d. As amostras de PB5d mostram uma matriz com feixes colágenos organizados e fibras elásticas preservadas (A, C, E) e o grupo PB10d exibe feixes colágenos menos organizados e fibras elásticas fragmentadas distribuídas irregularmente pela matriz (B, D, F). Colorações com Hematoxilina-Eosina, Tricrômio de *Masson*, Orceína e *Von Kossa*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 2 Análise por MEV em amostras de PB pré-implantação dos grupos PB5d e PB10d. A e B: imagens da superfície e C e D: espessura. Matriz colágena organizada em camadas e com sua ondulação característica preservada nas amostras de PB5d (A,C) e em PB10d, a matriz colágena é mais compactada com perda da ondulação (B,D).



Fonte: Dados da pesquisa.

3.2 Testes mecânicos e de estabilidade térmica

O estudo comparativo intergrupos indicou valores semelhantes para as propriedades temperatura de encolhimento, resistência à tração, alongamento e tenacidade. Contudo, a espessura das amostras de PB10d foi significativamente maior do que aquela das amostras PB5d ($p = 0,026$) (Tabela 1).

Tabela 1 Propriedades térmicas e mecânicas de PB dos grupos PB5d e PB10d.

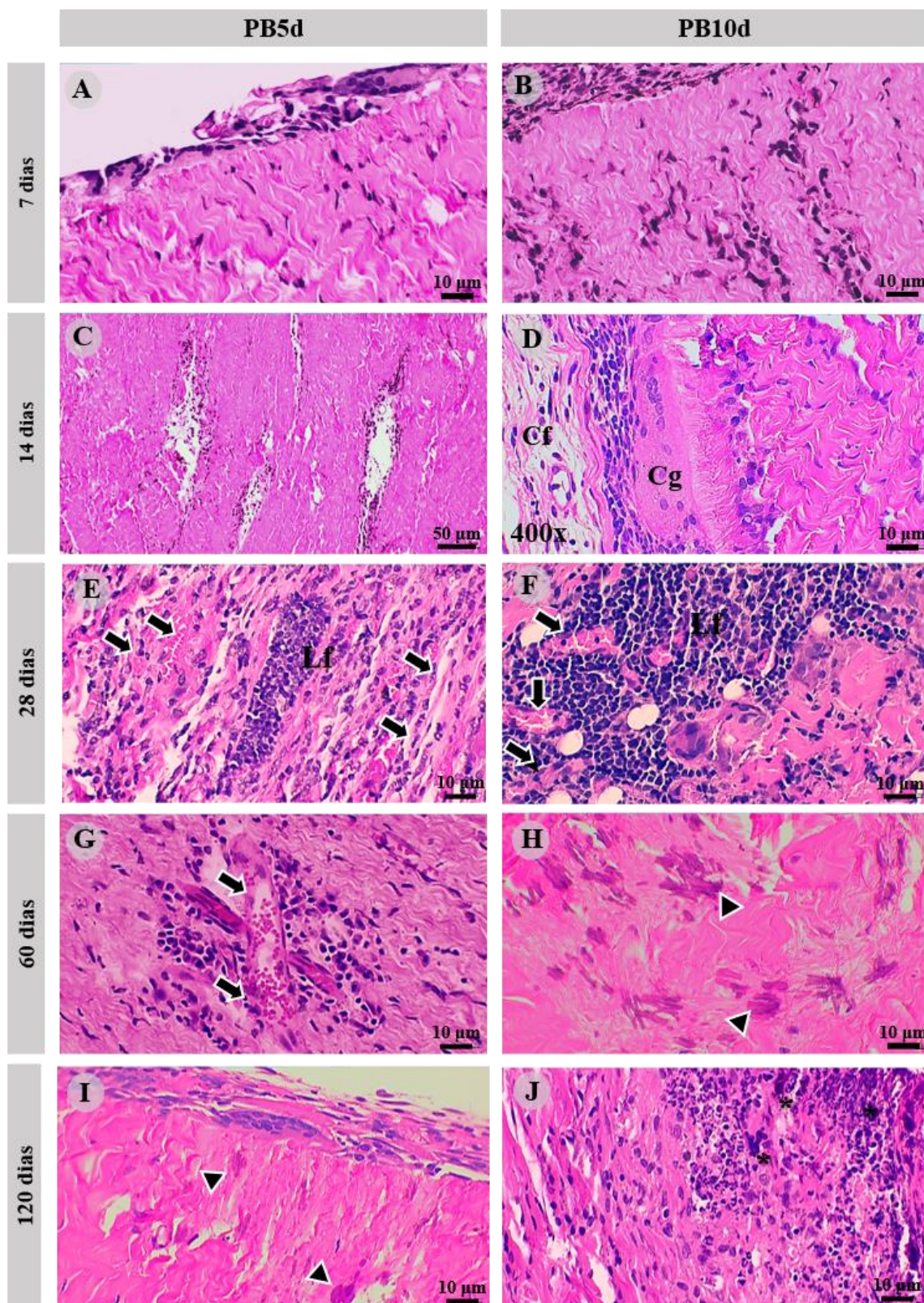
Parâmetros	Material				
	PB5d		PB10d		p-valor
	Mediana	q1-q3	Mediana	q1-q3	
Temperatura de encolhimento (°C)	86,80	86,0-90,13	86,60	85,85-89,00	0,937
Espessura (mm)	0,40	0,35-0,50	0,54	0,47-0,59	0,026
Resistência à tração (kgf/mm ²)	1,29	1,06-1,94	1,34	1,07-1,61	1,000
Alongamento (%)	53,05	48,4-68,25	63,10	56,70-84,03	0,093
Índice de tenacidade	40,60	32,53-51,95	47,75	34,90-54,68	0,394

Fonte: Dados da pesquisa.

3.3 Análise histológica (pós-implantação)

O estudo em ML mostrou uma resposta inflamatória crônica mais branda e menor formação de cápsula nas amostras do grupo PB5d, para todos os tempos analisados. Imagens ilustrativas dos períodos experimentais mostram aos 7 dias, alguns macrófagos às bordas do material implantado em PB5d (Figura 3A), enquanto mais macrófagos foram observados nas amostras do grupo PB10d, infiltrando profundamente o implante (Figura 3B). Aos 14 dias, ambos os grupos mostravam áreas de colágeno degradado (Figura 3C), com uma deterioração mais expressiva no grupo PB10d, coincidindo com um intenso infiltrado inflamatório com células fagocíticas (Figura 3D). Aos 28 dias, a neovascularização progredia da periferia ao centro da matriz degradada de colágeno nas amostras implantadas de PB5d e PB10d (Figura 3E, F). Nos últimos períodos, os vasos sanguíneos eram mais desenvolvidos, sendo mais frequentes nas amostras de PB5d (Figura 3E, G). Em 60 e 120 dias, as amostras de PB10d mostravam uma inflamação crônica moderada ou intensa, presença ainda marcante de macrófagos, algumas áreas de necrose tecidual e presença de áreas granulares, amorfas e basofílicas, compatíveis com focos de calcificação distrófica (Figura 3H, J), enquanto a maioria das amostras de PB5d exibiu uma matriz colágena com inflamação discreta, sem áreas de necrose e raros focos de calcificação (Figura 3I).

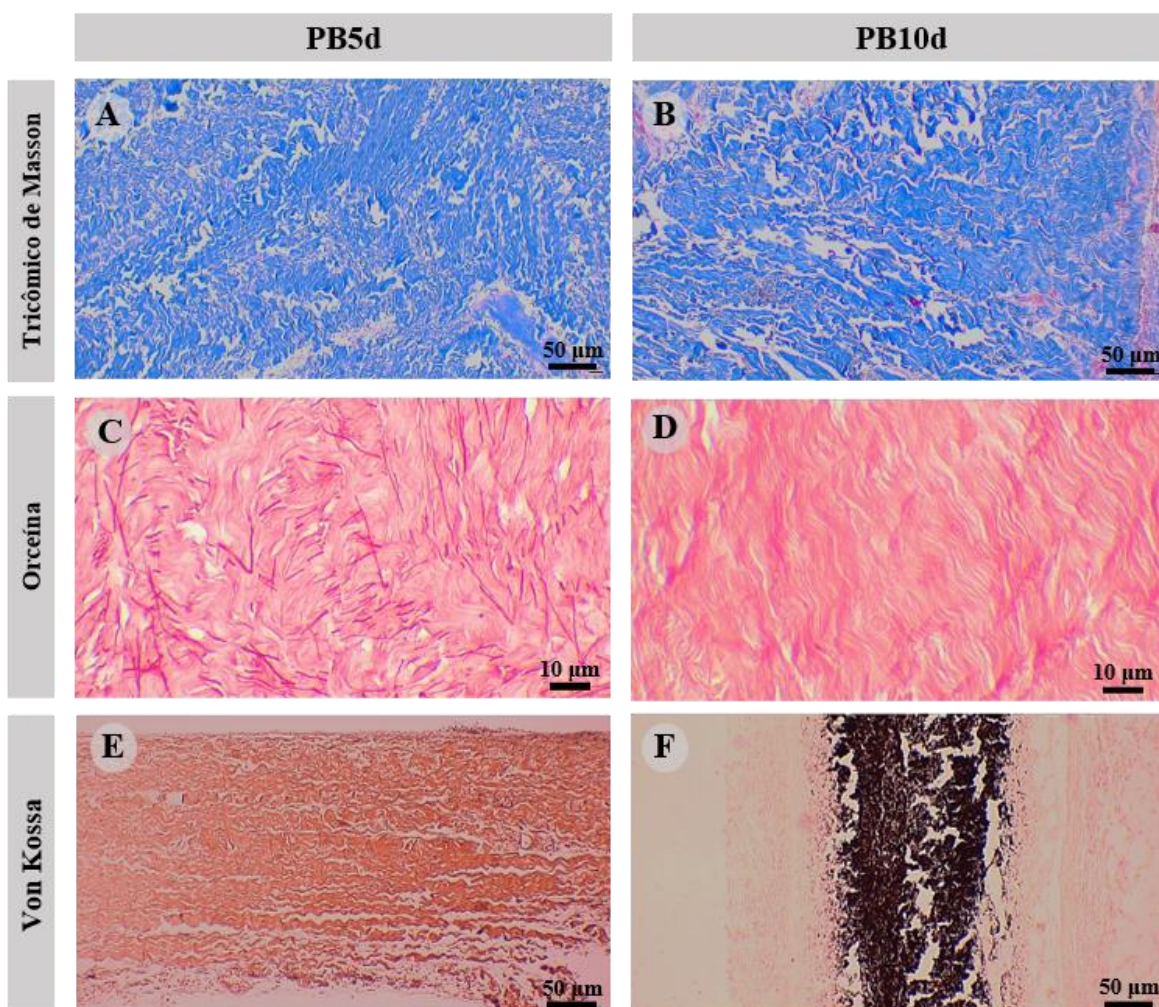
Figura 3 Fotomicrografias de PB explantados dos grupos PB5d e PB10d após 7, 14, 28, 60 e 120 dias de implantação. Maior infiltrado inflamatório crônico é observado nas amostras de PB10d em todos os tempos analisados, bem como maior formação de cápsula fibrosa (Cf) (D), áreas de desorganização tecidual compatíveis com necrose (*) nos tempos mais tardios e múltiplos focos de calcificação (ponta de seta) (H,J), mais raros em PB5d (I). Vasos sanguíneos (setas) estão presentes em maior quantidade em PB5d. Coloração com Hematoxilina-Eosina.



Fonte: Dados da pesquisa.

Aos 120 dias após implantação, as amostras de PB5d exibiram uma malha colagênica com preservação ligeiramente maior (Figura 4A) em relação às amostras de PB10d, que apresentaram mais áreas de fragmentação e redução de fibras colágenas, com perda da sua ondulação característica (Figura 4B). Uma redução progressiva na quantidade de fibras elásticas foi observada para ambos os materiais em função dos tempos analisados, estando completamente ausentes no grupo PB10d, no último período de análise. Aos 120 dias, o grupo PB5d mostrava fibras elásticas mais preservadas (Figura 4C), enquanto os explantes de PB10d apresentavam fibras elásticas rompidas e acúmulos focais dos seus fragmentos (Figura 4D). O estudo da calcificação pela técnica de *Von Kossa* não detectou áreas calcificadas na maioria das amostras de PB5d (Figura 4E), mas mostrou a presença de focos de calcificação em todas amostras do grupo PB10d nos tempos mais tardios (Figura 4F).

Figura 4 Fotomicrografias de PBs dos grupos PB5d e PB10d explantados após 120 dias. Notar fibras colágenas mais preservadas no grupo PB5d (A) enquanto o grupo PB10d mostra maior fragmentação (C, D). Fibras elásticas aparecem fragmentadas no grupo PB5d (C) e estão ausentes em PB10d (D). Depósitos calcificados (cor marrom escuro) são raros no grupo PB5d (E), os quais são extensos no grupo PB10d (F). Colorações com Tricômico de *Masson*, Orceína e *Von Kossa*.



Fonte: Dados da pesquisa.

3.4 Análise semiquantitativa

Os resultados da avaliação semiquantitativa foram submetidos à análise estatística, complementando a análise histológica realizada nas amostras coradas com H&E, Tricrômico de *Masson*, Orceína e *Von Kossa*. Embora a análise histológica tenha mostrado uma inflamação mais branda e um menor encapsulamento das amostras de PB5d, o estudo semiquantitativo não indicou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao grau de inflamação e à formação de cápsula. A comparação do perfil das células inflamatórias não demonstrou diferença estatisticamente significativa na quantidade de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células gigantes entre os grupos PB5d e PB10d.

Diferenças estatisticamente significantes foram observadas apenas em um mesmo grupo, em função dos períodos analisados (Tabela 2). Destaca-se que houve uma expressiva redução da inflamação nas amostras de PB5d aos 60 dias, a quantidade de PMNs decresceu em ambos os grupos a partir dos 14 dias, assim como houve expressiva redução de células gigantes aos 120 dias para PB5d e PB10d. Por fim, a quantidade de linfócitos aumentou de forma significativa em PB5d aos 60 dias e para PB10, apenas os 120 dias.

Tabela 2 Resultados da avaliação semiquantitativa da resposta tecidual ao pericárdio bovino dos grupos PB5d e PB10d, explantado após 7, 14, 28, 60 e 120 dias

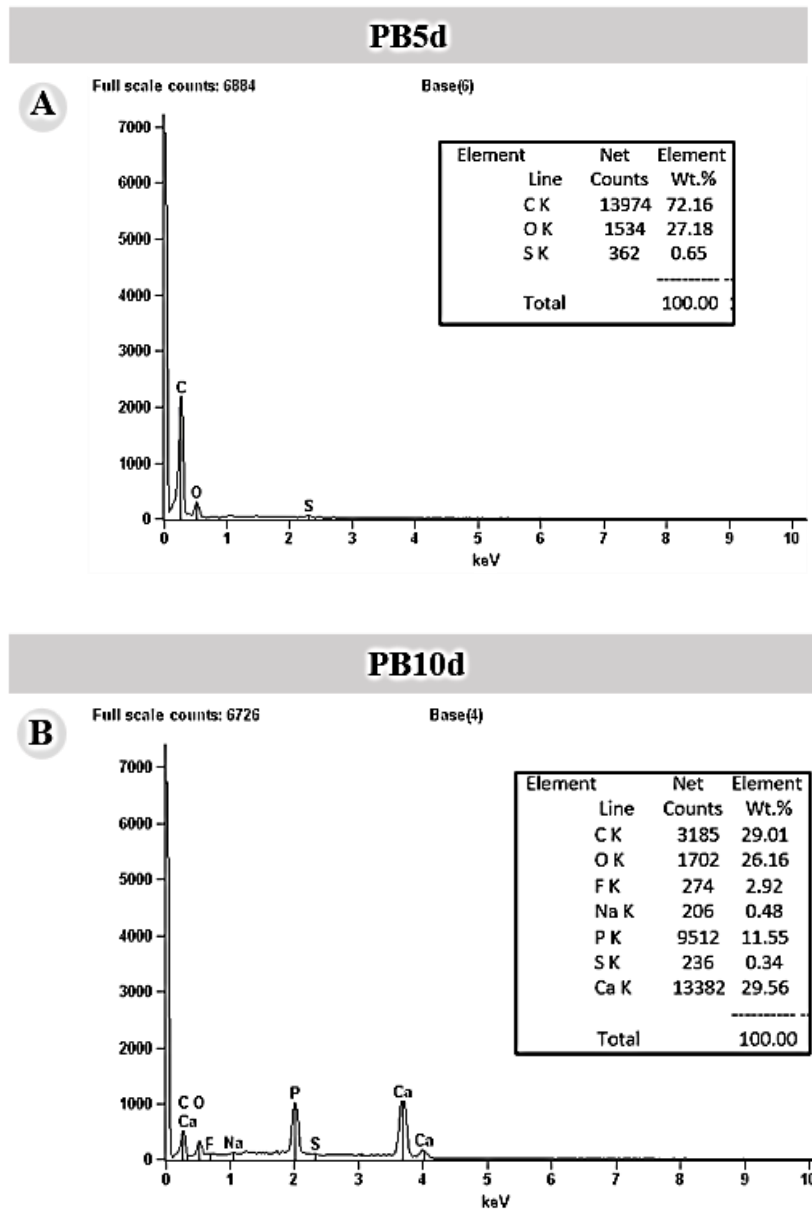
Parâmetros	Tecido	Tempo										
		7 dias		14 dias		28 dias		60 dias		120 dias		p-valor
		Mediana	q1-q3	Mediana	q1-q3	Mediana	q1-q3	Mediana	q1-q3	Mediana	q1-q3	
Inflamação	PB5d*	1,0	1,0-1,5	2,0	1,0-2,5	2,0 ^A	2,0-3,0	1,0 ^B	1,0-1,0	1,0	1,0-3,0	0,034
	PB10d	1,0	1,0-2,0	1,0	1,0-3,0	2,0	1,0-2,0	3,0	1,5-3,0	2,0	1,0-3,0	0,443
	p-valor	1,000		1,000		0,250		0,125		1,000		
PMNs	PB5d	2,0 ^A	1,0-2,5	0,0 ^B	0,0-0,0	0,0 ^B	0,0-0,0	0,0 ^B	0,0-0,0	0,0	0,0-2,0	0,002
	PB10d	1,0 ^A	0,5-1,5	0,0 ^B	0,0-0,0	0,0	0,0-1,0	0,0 ^B	0,0-0,0	0,0	0,0-0,5	0,030
	p-valor	0,500		1,000		1,000		1,000		0,750		
Linfócitos	PB5d	1,0 ^A	1,0-1,0	2,0	2,0-2,5	3,0	1,5-3,0	3,0 ^B	3,0-3,0	3,0	1,0-3,0	0,012
	PB10d	1,0 ^A	1,0-1,0	1,0 ^A	1,0-1,5	1,0	1,0-2,0	3,0	1,5-3,0	3,0 ^B	2,5-3,0	0,003
	p-valor	1,000		0,063		0,125		0,500		0,500		
Plasmócitos	PB5d	0,0	0,0-0,0	1,0	0,0-1,0	1,0	0,0-1,0	0,0	0,0-1,0	0,0	0,0-2,0	0,343
	PB10d	1,0	0,0-1,5	0,0	0,0-0,0	0,0	0,0-2,0	0,0	0,0-0,5	0,0	0,0-0,0	0,130
	p-valor	0,250		0,250		1,000		1,000		0,500		
Macrófagos	PB5d	2,0	2,0-3,0	3,0	2,5-3,0	3,0	2,5-3,0	3,0	2,5-3,0	2,0	2,0-3,0	0,406
	PB10d	3,0 ^A	3,0-3,0	3,0	3,0-3,0	3,0	2,0-3,0	3,0	2,0-3,0	2,0 ^B	1,5-2,5	0,036
	p-valor	0,250		1,000		1,000		1,000		0,500		
Células gigantes	PB5d	2,0 ^A	2,0-2,50	2,0	2,0-2,0	2,0	2,0-2,0	2,0	1,5-2,0	1,0 ^B	0,5-1,5	0,008
	PB10d	2,0 ^A	2,0-2,0	2,0	1,5-2,0	2,0	1,0-2,0	2,0	1,5-2,0	1,0 ^B	0,5-1,0	0,011
	p-valor	1,000		1,000		0,500		1,000		1,000		
Cápsula	PB5d	0,0	0,0-0,5	0,0	0,0-1,0	2,0	0,5-2,0	1,0	1,0-2,0	1,0	0,5-1,5	0,053
	PB10d	0,0	0,0-2,5	1,0	0,0-1,0	1,0	0,5-2,0	2,0	0,5-2,0	2,0	0,5-2,0	0,600
	p-valor	0,500		1,000		1,000		1,000		0,750		

Fonte: Dados da pesquisa. Legenda:* Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste *a posteriori* de Dunn

3.5 Análise da calcificação

A análise semiquantitativa da composição química elementar com EDX em amostras explantadas aos 120 dias não identificou a presença de cálcio no explante do grupo PB5d, mas evidenciou a presença desse elemento em PB10d no percentual de 29,56% de peso da região analisada (Figura 5A, B). A combinação de cálcio com os outros elementos detectados (sódio, fósforo, enxofre) indicam a presença provável de depósitos calcificados no tecido, sobretudo na forma de fosfatos de cálcio.

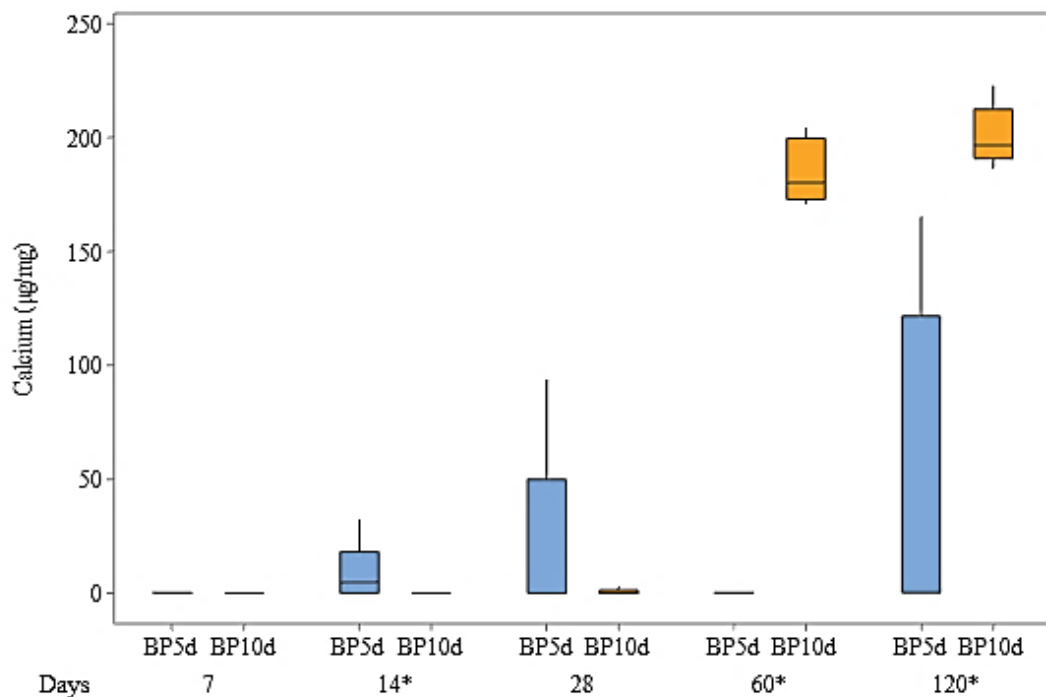
Figura 5 Análise EDX dos pericárdios bovinos dos grupos PB5d e PB10d explantados após 120 dias



Fonte: Dados da pesquisa

O resultado da análise química elementar por ICP-OES mostrou um baixo índice de calcificação nos explantes PB5d e PB10d. Os dados estão apresentados no Gráfico 1, com valores de medianas, primeiro e terceiro quartis e expressos em μg de Ca^{2+}/mg de tecido seco. Quando comparados, o teor de cálcio do grupo PB5d foi significativamente maior aos 14 dias ($p=0,043$), com 4,76 (0,15 - 31,82) *versus* 0,081 (0,06 - 0,14) em amostras de PB10d. No entanto, aos 60 e 120 dias, a calcificação em PB5d foi significativamente menor ($p=0,031$), com resultados em PB10d de 180,20 (172,73 - 204,50) *versus* 0,20 (0,14 - 0,53) em PB5d no período de 60 dias; e aos 120 dias PB10d apresentou 196,63 (186,68 - 222,55) *versus* 0,3 (0,23 - 165,04) em PB5d. A distribuição do cálcio nas amostras de PB5d não variou de forma significativa entre os tempos analisados, enquanto que o PB10d mostrou uma diferença significativa ($p=0,001$), com aumento do teor de cálcio entre 14 e 60 dias, 14 e 120 dias e 7 e 120 dias.

Gráfico 1 Diagrama de box plot para teor de cálcio em μg de Ca^{2+}/mg de tecido seco de pericárdio bovino dos grupos PB5d e PB10d, explantados após 7, 14, 28, 60 e 120 dias, pelo método do ICP-OES



Fonte: Dados da pesquisa.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a redução do tempo de reticulação do PB com GA influenciou positivamente as propriedades biológicas dos PBs implantados em tecido subcutâneo de rato, sem afetar as propriedades físicas importantes para a performance hemodinâmica de uma bioprótese valvular. Neste trabalho, o tempo de reticulação do PB em GA foi reduzido de um protocolo comercialmente disponível e validado de 10 para 5 dias, com a hipótese de que uma menor exposição ao GA poderia reduzir a calcificação pós-implante, aumentando a sobrevida clínica das biopróteses. Nas cirurgias cardíacas, observa-

se uma predisposição de BVCs confeccionadas com GAPB para a degeneração estrutural e calcificação distrófica, com conseqüente necessidade de nova substituição e aumento do risco de óbito.^{1,6,10}

Sabe-se que a reticulação do PB com GA melhora as propriedades mecânicas e aumenta a resistência à degradação enzimática das biopróteses pós-implantação.²⁸ Porém, a melhoria de suas características físicas não parece relacionar-se necessariamente com o aumento do tempo de fixação com GA.^{19,21} Lee e colaboradores (2017), por exemplo, observaram uma fixação adequada, quando o PB foi reticulado com uma solução a 0,5% de GA por 20 minutos, obtendo um percentual de 94% de reticulações alcançadas em duas semanas de tratamento.²² Em outro trabalho, Hofferberth e colaboradores (2019)²³ fixaram espécimes de pericárdio autólogo em solução de 0,6% de GA por 10 minutos e encontraram valores de estiramento satisfatórios para uso clínico.²³

No presente trabalho, foi demonstrado que o PB reticulado em solução de 0,5% de GA por 5 dias (PB5d) manteve propriedades físicas equivalentes às do tecido PB, convencionalmente tratado em GA por 10 dias (PB10d), pois a avaliação comparativa das amostras pré-implantação não mostrou diferenças estatisticamente significantes nos parâmetros temperatura de encolhimento (Ts), resistência à tração, alongamento e tenacidade. Os PBs de ambos os grupos mostraram valores iguais quanto ao parâmetro Ts, o que indica que o grau de reticulação das amostras de PB10d pode ser alcançado com tempo de incubação em GA reduzido para 5 dias.

Apenas a espessura diferiu entre os grupos. Contudo, esse achado não pode ser atribuído aos tempos de exposição ao GA empregados no estudo, uma vez que as diferenças de espessuras de PB podem estar relacionadas às diferenças de porte dos animais doadores. Um achado observado pós-implantação foi que o grupo com maior espessura coincidentemente mostrava uma maior formação de cápsula peri-implantar. De forma similar, outros autores, ao compararem implantes com diferentes espessuras, notaram cápsulas fibrosas mais espessas em implantes com maior espessura.²⁹ Embora a espessura do implante seja um fator que influencie a resposta do organismo receptor ao material, a dimensão da cápsula formada no implante subcutâneo de PB é irrelevante no sítio de implantação das BVCs, onde os folhetos de PB ficarão em contato direto com o sangue e o encapsulamento não é esperado. Além disso, a disponibilidade de PB em diferentes espessuras é importante para atender à necessidade de confecção de biopróteses de dimensões variadas.

A análise morfológica em ML e MEV das amostras pré-implantação indicou uma MEC mais organizada nos espécimes do grupo PB5d. Em contraste, as amostras fixadas por 10 dias mostraram uma matriz colágena mais compactada, com perda parcial do aspecto ondulado das fibras colágenas, muitas fibras e feixes de colágeno desorganizados e mais fibras elásticas colapsadas. As deformações observadas no grupo PB10d podem resultar de uma exposição demasiada ao fixador.³⁰ Os achados de deformação estrutural da matriz foram também observados quando as amostras do grupo PB10 foram implantadas no tecido subcutâneo de ratos, as quais exibiam fibras colágenas mal preservadas e fibras elásticas colapsadas, muitas vezes ausentes no último período de análise. Esses achados permitem afirmar que o tecido PB reticulado em GA por 5 dias preservou a estrutura original do tecido, o que pode contribuir para uma maior durabilidade das BVCs. De fato, a literatura

tem demonstrado que elementos alterados na MEC podem ser sítios de atração para o cálcio⁸, além de aumentarem a predisposição à falha das BVCs por fadiga mecânica.³¹ Muitos estudos têm mostrado que a fadiga ocorre frequentemente em áreas com deformações estruturais, independentemente da existência de calcificação. Nesse sentido, a arquitetura e o conteúdo das fibras de colágeno sustentam a resposta mecânica e, portanto, a resistência do tecido aos danos.^{8,31,32} Esses estudos sugerem que técnicas laboratoriais visando à preservação da estrutura original do tecido PB podem aumentar a durabilidade das BVCs, além de minimizar o risco de sua calcificação.

O padrão inflamatório observado nos implantes de PB no presente estudo foi similar àquele mostrado em outras investigações com implantes subcutâneos^{17,32,33}, ademais, diferenças intergrupos importantes foram notadas, ainda que o estudo semiquantitativo não tenha mostrado diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. A inflamação inicial foi mais discreta nas amostras de PB5d, mantendo-se crônica e progressivamente mais leve nos últimos períodos, enquanto as amostras de PB10d mostraram mais células inflamatórias, com um pico aos 60 dias, muitas vezes, coincidindo com áreas de necrose e de calcificação distrófica. A necrose observada no grupo PB10d pode refletir a morte de células fagocitárias e o aprisionamento dos seus restos celulares na matriz do implante. Além de serem elementos adicionais de inflamação, células necróticas constituem focos de calcificação pelo fato de perderem o controle do transporte transmembrana, resultando em um influxo passivo de cálcio para o citoplasma das células mortas.³⁴ A calcificação pode ocorrer também por meio de uma atração entre os íons cálcio e fosfato e os fosfolipídios de membrana dos resíduos celulares aprisionados no tecido.³⁵

Em ambos os grupos, todas as amostras exibiram uma resposta celular relacionada a uma reação de corpo estranho, com a presença de células PMNs, macrófagos, células gigantes, linfócitos e plasmócitos, os quais variaram em função do tempo. O estudo comparativo intergrupo não mostrou diferença estatisticamente significativa no padrão de células inflamatórias entre os grupos PB5d e PB10d. Em ambos os grupos, aos 7 dias, a inflamação era aguda, com muitos neutrófilos, sendo convertida em uma inflamação crônica nos tempos mais tardios, com a participação de células mononucleares, como macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Nas amostras de PB10d, os linfócitos foram mais tardios, enquanto células fagocitárias predominaram por mais tempo. A maior persistência de macrófagos no interior do implante e de células gigantes de corpo estranho nas bordas das amostras desse grupo pode ser justificada pela maior intensidade de fibras colágenas e elásticas degradadas, previamente no interior desses implantes. Decorridos 120 dias da implantação, ambos os grupos mostravam uma quantidade moderada de macrófagos e células gigantes durante a fase de inflamação crônica e de deposição de colágeno, o que pode indicar uma atividade imunomoduladora implicada no reparo tecidual.

O tipo de resposta do hospedeiro a um biomaterial implantado e o perfil fenotípico dos macrófagos envolvidos influenciam a biocompatibilidade e o desfecho da remodelação, nesse modelo de estudo.³⁶ Os macrófagos pró-inflamatórios (M1) são tipicamente encontrados em materiais sintéticos e estão associados a uma resposta menos favorável, proliferativa e citotóxica, caracterizada por fibrose e por produção de tecido cicatricial intenso, achados histológicos não observados no presente estudo. Em contraste, biomateriais derivados de material biológico, como o PB, estão relacionados com a

presença de macrófagos com fenótipo M2, relacionados com atividades anti-inflamatórias, regulação imune e remodelação tecidual.^{36,37} Ainda que o estudo não tenha realizado a fenotipagem dos macrófagos, acreditamos que os macrófagos observados sejam provavelmente do tipo M2, uma vez que o reparo foi favorável em todas amostras implantadas.

Há relatos de que a reticulação química da MEC pode impactar negativamente sobre a resposta de remodelação mediada pelo hospedeiro.^{20,32} No presente estudo, com modelo de implantação subcutânea, com base nos achados de repovoamento celular, neovascularização, deposição de colágeno e lipossustituição, o material GAPB demonstra não ser inerte *in vivo*, pois em ambos os grupos o tratamento com GA permitiu repovoamento celular e reparo pelo organismo receptor. Os achados de neovascularização nos implantes dos dois grupos demonstraram que os materiais implantados não impediram o reparo tecidual. Na comparação entre os dois materiais, os novos vasos sanguíneos eram mais abundantes nas amostras de PB5d em comparação com PB10d, o que indica uma remodelação mais favorável nas amostras reticuladas por 5 dias.³⁶ Muitas áreas com pouca neovascularização do grupo PB10d relacionava-se com a presença de focos de calcificação distrófica, indicando uma possível relação entre os dois fenômenos. Uma pobre vascularização poderia resultar em um baixo influxo de macrófagos e, por consequência, uma ação insuficiente na eliminação de células degeneradas e seus remanescentes, que atuam como focos de calcificação precoce.⁶

Um aspecto importante para a validação de um protocolo para confecção de biopróteses é o estudo da calcificação *in vivo* do PB. Surpreendentemente, a análise por ICP-OES mostrou valores baixos de calcificação nos grupos PB5d e PB10d, quando comparados com aqueles de outros estudos que realizaram tratamentos similares com GA.^{38,39} O baixo teor de cálcio em ambos os grupos pode ser atribuído à origem dos tecidos, ao pH das soluções empregadas no processamento que impediu a alteração da carga eletrostática das moléculas de colágeno e, sobretudo, à inativação dos aldeídos livres derivados do GA com ácido glutâmico, por meio da formação de ligações covalentes entre os grupos aminos desse aminoácido, com os aldeídos residuais no tecido.^{17,25,26} Esse conjunto de fatores comuns ao processamento dos dois materiais explica a baixa calcificação de ambos os grupos. Por outro lado, os resultados distintos quanto à calcificação intergrupos pode ser atribuído aos diferentes tempos de fixação em GA. A análise da calcificação por ML, EDX e ICP-OES indicou um menor conteúdo de cálcio nas amostras PB5d implantadas no tecido subcutâneo de ratos, em comparação àquelas do grupo PB10. Foi observado portanto, que a redução do tempo de fixação em GA pode maximizar o efeito anticalcificante obtido pelo tratamento com ácido glutâmico. Estudo recente observou uma concentração de 3,1 $\mu\text{g Ca}^{2+}/\text{mg}$ nas amostras reticuladas com GA por 10 dias, tratadas com ácido glutâmico e implantadas em tecido subcutâneo de rato por 60 dias.¹⁷ Sob condições experimentais muito próximas, o presente estudo observou uma concentração de 0,2 $\mu\text{g Ca}^{2+}/\text{mg}$ nas amostras de PB tratadas em GA por 5 dias e ácido glutâmico. Com base nesses achados, pode-se sugerir que a combinação de técnicas anticalcificantes pode ser uma estratégia promissora na minimização da calcificação do PB.

Embora a reticulação polimérica do PB seja uma etapa importante, o pré-tratamento com GA é considerado um importante fator para a calcificação das biopróteses

implantadas.⁴⁰ Alguns trabalhos têm demonstrado uma relação direta entre o grau de calcificação e o tempo de exposição ao GA, de forma que um maior tempo de reticulação pode aumentar a quantidade de grupos aldeídos residuais, os quais podem alterar os mecanismos relacionados com a calcificação e a reendotelização, ambos envolvidos na degeneração de biopróteses valvulares cardíacas.^{1,7,41}

A calcificação ectópica em tecido subcutâneo é uma medida indireta da intensidade da calcificação da BVC pós-implante, que pode aumentar à rigidez dos folhetos de PB e prejudicar o funcionamento adequado da prótese por estenose, refluxo ou regurgitação.⁴¹ Diversos fatores podem influenciar a calcificação de biopróteses de PB, como idade do animal doador, origem do pericárdio (porcino ou bovino), tipo de valva substituída, desenho da prótese (*stent* ou *stentless*), estrutura valvular e os tratamentos anticalcificantes empregados.⁴⁰⁻⁴² Ainda que nenhum tratamento prévio no PB previna completamente a calcificação *in vivo* das biopróteses, o método de tratamento do PB proposto não promoveu alterações das características térmicas e mecânicas e mostrou uma importante redução na sua calcificação, quando comparado ao grupo de PB, fixado por maior tempo, e biocompatibilidade após implantação em tecido subcutâneo de rato, indicando que esse protocolo pode contribuir para o aumento da durabilidade das biopróteses cardíacas confeccionadas a partir do PB.

Considerando a complexidade dos mecanismos envolvidos na calcificação das biopróteses tratadas com GA e as limitações que impedem a extrapolação dos achados observados em um modelo animal, em resposta a um biomaterial para pacientes humanos, mais estudos com um maior período de análise e combinação de outras estratégias anticalcificantes são necessários, a fim de se obter mais informações sobre a sua aplicação clínica.

5 CONCLUSÕES

A redução do tempo de fixação do PB em GA desencadeou uma resposta inflamatória discreta e taxas mínimas de calcificação do material implantado, sem alterar as propriedades físicas importantes para a confecção de biopróteses valvulares. A observação de pequenos focos de calcificação em algumas amostras do material reticulado por 5 dias indica que o protocolo de processamento proposto não impediu completamente a deposição de cálcio no interior do PB, mas se constitui em uma estratégia promissora que, quando associada a outras estratégias anticalcificantes, pode otimizar os protocolos já existentes.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Braile Biomédica Indústria Comércio e Representações Ltda. Agradecemos a Aline Helenita Ramos Santos, por sua assistência técnica; ao Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular e ao Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, em especial à professora Fabiana Paim Rosa por suas contribuições.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses com o conteúdo deste artigo.

REFERÊNCIAS

1. Li KYC. Bioprosthetic Heart Valves: Upgrading a 50-Year Old Technology. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6(April):1–6.
2. Lund O, Nielsen SL, Arildsen H, et al. Standard aortic St. Jude valve at 18 years: performance profile and determinants of outcome. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1459-65.
3. Ionescu MI, Pakrashi BC, Holden MP, Mary DA, Wooler GH. Results of aortic valve replacement with frame-supported fascia lata and pericardial grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1972 Sep;64(3):340–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5054873>.
4. Relland J, Perier P, Lecointe B. The Third Generation Carpentier-Edwards Bioprosthesis: Early Results. *J Am Coll Cardiol.* 1985;6(5):1149–54. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(85\)80323-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(85)80323-5).
5. Isaacs AJ, Shuhaiber J, Salemi A, Isom OW, Sedrakyan A. National trends in utilization and in-hospital outcomes of mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacements. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015 May;149(5):1262-9.e3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022522315001142>.
6. Bonetti A, Marchini M, Ortolani F. Ectopic mineralization in heart valves: New insights from in vivo and in vitro procalcific models and promising perspectives on noncalcifiable bioengineered valves. *J Thorac Dis.* 2019;11(5):2126–43.
7. Manji RA, Zhu LF, Nijjar NK, Rayner DC, Korbitt GS, Churchill TA, et al. Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection. *Circulation* 2006;114(4):318–27.
8. Whelan A, Williams E, Fitzpatrick E, Murphy BP, Gunning PS, O'Reilly D, et al. Collagen fibre-mediated mechanical damage increases calcification of bovine pericardium for use in bioprosthetic heart valves. *Acta Biomater.* 2021;128:384–92.
9. Vyavahare N, Ogle M, Schoen FJ, Zand R, Gloeckner DC, Sacks M, et al. Mechanisms of bioprosthetic heart valve failure: fatigue causes collagen denaturation and glycosaminoglycan loss. *J Biomed Mater Res.* 1999 Jul;46(1):44–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10357134>.
10. Hammermeister K, Sethi GK, Henderson WG, Grover FL, Oprian C, Rahimtoola SH. Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:1152-8.
11. Collatusso C, Roderjan JG, De Noronha L, Klosowski A, Suss PH, Guarita-Souza LC, et al. Decellularization as a method to reduce calcification in bovine pericardium bioprosthetic valves. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2019;29(2):302–11.
12. Tuladhar SR, Mulderigg S, Della Barbera M, Vedovelli L, Bottigliengo D, Tessari C, et al. Bioengineered percutaneous heart valves for transcatheter aortic valve replacement: a comparative evaluation of decellularised bovine and porcine pericardia. *Mater Sci Eng C.* 2021;123(Jan.):111936. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111936>.
13. Lei Y, Deng L, Tang Y, Ning Q, Lan X, Wang Y. Hybrid Pericardium with VEGF-Loaded Hyaluronic Acid Hydrogel Coating to Improve the Biological Properties of Bioprosthetic Heart Valves. *Macromol Biosci.* 2019;19(6):1–9.
14. Lei Y, Ning Q, Tang Y, Wang Y. Exogenous hyaluronic acid and chondroitin sulfate crosslinking treatment for increasing the amount and stability of glycosaminoglycans in bioprosthetic

heart valves. *J Mater Sci Mater Med*. 2019;30(3):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-019-6237-7>.

15. Badria A, Koutsoukos P, Korossis S, Mavrilas D. The effect of heparin hydrogel embedding on glutaraldehyde fixed bovine pericardial tissues: Mechanical behavior and anticalcification potential. *J Mater Sci Mater Med*. 2018;29(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-018-6184-8>.

16. Meuris B, Praetere H De, Strasly M, Trabucco P. A novel tissue treatment to reduce mineralization of bovine pericardial heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2018;156(1):197–206. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.01.099>.

17. Braile-Sternieri MCVB, Goissis G, Giglioti A de F, Ramirez VDA, Pereira NP, de Vasconcellos A, et al. In vivo evaluation of Vivere bovine pericardium valvular bioprosthesis with a new anti-calcifying treatment. *Artif Organs*. 2020;(Apr.):1–12.

18. Jiang Z, Wu Z, Deng D, Li J, Qi X, Song M, et al. Improved Cytocompatibility and Reduced Calcification of Glutaraldehyde-Crosslinked Bovine Pericardium by Modification With Glutathione. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10(May):1–13.

19. Woodroof EA. Use of glutaraldehyde and formaldehyde to process tissue heart valves. *J Bioeng*. 1978 Apr.;2(1–2):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/98522>.

20. Dalgliesh AJ, Parvizi M, Noble C, Griffiths LG. Effect of cyclic deformation on xenogeneic heart valve biomaterials. *PLoS One*. 2019;14(6):1–21.

21. Liao K, Frater RWM, LaPietra A, Ciuffo G, Iardi CF, Seifert E. Time-dependent effect of glutaraldehyde on the tendency to calcify of both autografts and xenografts. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(Suppl. 2):343–7.

22. Lee C, Lim HG, Lee CH, Kim YJ. Effects of glutaraldehyde concentration and fixation time on material characteristics and calcification of bovine pericardium: Implications for the optimal method of fixation of autologous pericardium used for cardiovascular surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2017;24(3):402–6.

23. Hofferberth SC, Baird CW, Hoganson DM, Quiñonez LG, Emani SM, del Nido PJ, et al. Mechanical Properties of Autologous Pericardium Change With Fixation Time: Implications for Valve Reconstruction. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2019;31(4):852–4.

24. Li Q, Gao Y, Zhang J, Tang Y, Sun Y, Wu L, et al. Crosslinking and functionalization of acellular patches via the self-assembly of copper@tea polyphenol nanoparticles. *Regen Biomater*. 2022;9(May).

25. Ferreira AD, Costa FD, Santos EA, Gomes CH, Collatusso C, Lopes SA, et al. L-glutamic acid in the prevention of the calcification of bovine pericardial fixed in glutaraldehyde: study in rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2007;22(3):303–9.

26. Goissis G, Braile DM, Carnevalli NC, Ramirez VA. Mechanical, thermal and morphological properties of glutaraldehyde cross-linked bovine pericardium followed by glutamic acid treatment. *Mater Res*. 2009;12:113–9.

27. Thampi P, Nair D, R. L, N. V, Venugopal S, Ramachandra U. Pathological effects of processed bovine pericardial scaffolds—a comparative in vivo evaluation. *Artif Organs*. 2013;37(7):600–5.

28. Gustavson. KH. *The Chemistry and Reactivity of Collagen*. New York: Academic Press, 1956; Chap. 9.

29. Ward WK, Slobodzian EP, Tiekotter KL, Wood MD. The effect of microgeometry, implant thickness and polyurethane chemistry on the foreign body response to subcutaneous implants.

Biomaterials. 2002;23(21):4185–92.

30. Rezvova MA, Kudryavceva YA. Modern Approaches to Chemical Modification of Proteins in Biological Tissues : Consequences and Application. 2018;44(1):19–31.

31. Sellaro TL, Hildebrand D, Lu Q, Vyavahare N, Scott M, Sacks MS. Effects of collagen fiber orientation on the response of biologically derived soft tissue biomaterials to cyclic loading. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Jan.;80(1):194–205. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30871>.

32. Bracaglia LG, Fisher JP. Extracellular Matrix-Based Biohybrid Materials for Engineering Compliant, Matrix-Dense Tissues. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(16):2475–87.

33. Grabenwoger M, Sider J, Fitzal F, Zelenka C, Windberger U, Grimm M, et al. Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material. *Ann Thorac Surg*. 1996;62(3):772–7.

34. Rao KP, Shanthi C. Reduction of calcification by various treatments in cardiac valves. *J Biomater Appl*. 1999 Jan.;13(3):238–68. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/088532829901300305>.

35. Boskey AL, Bullough PG, Vigorita V, Di CE. Calcium-acidic phospholipid-phosphate complexes in human hydroxyapatite-containing pathologic deposits. *Am J Pathol* 1988 Oct;133(1):22-9.

36. Cramer M, Chang J, Li H, Serrero A, El-Kurdi M, Cox M, et al. Tissue response, macrophage phenotype, and intrinsic calcification induced by cardiovascular biomaterials: Can clinical regenerative potential be predicted in a rat subcutaneous implant model? *J Biomed Mater Res - Part A*. 2022;110(2):245–56.

37. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol*. 2020 Jun 15;877:173090. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173090.

38. Grabenwoger M, Grimm M, Eybl E, Leukauf C, Muller MM, Plenck H Jr, et al. Decreased tissue reaction to bioprosthetic heart valve material after L-glutamic acid treatment. A morphological study. *J Biomed Mater Res*. 1992;26(9):1231–40.

39. Chang HW, Kim SH, Kim YJ. Combined anti-calcification treatment of bovine pericardium with amino compounds and solvents. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2011;12(6):903–7.

40. Flameng W, Meuris B, Yperman J, Verbeken E. Factors influencing calcification of cardiac bioprostheses in adolescent sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;132(1):89–98.

41. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg*. 2005;79(3):1072–80.

42. Sizeland KH, Wells HC, Higgins J, Cunanan CM, Kirby N, Hawley A, et al. Age dependent differences in collagen alignment of glutaraldehyde fixed Bovine pericardium. *Biomed Res Int*. 2014;2014.

6.2 ARTIGO 2

Estudo comparativo das propriedades físicas e calcificação do pericárdio bovino após um tratamento anticalcificante com ou sem descelularização

Raísa Cavalcante Dourado^{1,4*}, Aparecida de Fátima Giglioti², Gilberto Goissis², Samir Hipólito dos Santos³, Isabela Cerqueira Barreto¹, Márcio Cajazeira Aguiar⁴

¹Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

²Braille Biomédica Indústria Comércio e Representações Ltda., São José do Rio Preto, Brasil

³Laboratório de Química Analítica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

⁴Laboratório de Histotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

*Email: raisadourado@yahoo.com.br

Resumo

Introdução: A descelularização é um método alternativo de processamento de tecidos biológicos capaz de reduzir a antigenicidade e aumentar a resistência tecidual à calcificação, mas ainda não é usual no preparo de tecidos de pericárdio bovino (PB) destinados ao uso em biopróteses valvulares cardíacas (BVCs). Além disso, faltam estudos que investiguem o efeito da combinação da técnica de descelularização com outras estratégias anticalcificantes. **Objetivo:** Caracterizar as propriedades do PB acelular fixado com glutaraldeído (GA) por cinco dias e avaliar o efeito da descelularização para evitar a calcificação de PBs *in vivo*. **Material e métodos:** Os tecidos de PB foram divididos em dois grupos: PB5d (amostras fixadas com GA por 5 dias) e PB5dAC (amostras acelulares e fixadas com GA por cinco dias). Após a fixação, todas as amostras foram submetidas a um tratamento anticalcificante com ácido glutâmico. Os PBs passaram por caracterização física, por testes mecânicos e de estabilidade térmica, além de avaliação histológica por microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após a implantação em tecido subcutâneo de ratos, os PBs foram submetidos à nova avaliação por ML e MEV e analisados para o teor de cálcio por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES). **Resultados:** O tratamento de descelularização modificou a organização da matriz extracelular dos PBs, mas não promoveu alterações indesejáveis nas propriedades físicas teciduais. A reação inflamatória foi similar entre PB5d e PB5dAC e os valores de calcificação foram baixos em ambos os grupos, com um menor conteúdo de cálcio em PB5dAC. **Conclusão:** O tratamento combinado de descelularização, fixação com GA por cinco dias e pós-tratamento com ácido glutâmico diminuiu a calcificação e a inflamação do PB em um modelo de implantação subcutânea em rato, sem alterar as propriedades físicas e biológicas importantes para a confecção de biopróteses valvulares.

Descritores: biopróteses; calcificação; pericárdio bovino; glutaraldeído; descelularização.

1. INTRODUÇÃO

As biopróteses valvulares cardíacas (BVCs) de pericárdio bovino (PB) fixado em glutaraldeído (GA) têm sido amplamente utilizadas como substitutos valvares em pacientes com doença valvar cardíaca. Apesar de suas vantagens, a degeneração estrutural associada à

calcificação distrófica do PB é um inconveniente comum no período entre 10 e 15 anos pós-implantação.¹ Embora os mecanismos envolvidos na calcificação pós-implantação sejam pouco compreendidos, muitos estudos indicam que as principais causas da calcificação são a retenção de células mortas e detritos celulares nas biopróteses de PB², além da presença de resíduos citotóxicos oriundos da fixação com o GA.³

Alguns estudos recentes têm destacado a influência de células desvitalizadas e detritos celulares como sítios de nucleação mineral em BVCs.⁴⁻⁶ O mecanismo envolve a ligação de fosfatos derivados dos fosfolipídios de membranas celulares com íons de Ca^{2+} do meio extracelular, havendo a formação inicial de espécies de fosfato de cálcio cristalino. A partir daí, ocorre o crescimento e expansão de mais cristais, com consequente formação de agregados cristalinos de hidroxiapatita.⁷⁻⁹ Com base no exposto, uma estratégia sugerida para evitar a calcificação observada nas biopróteses de PB seria a remoção dos fosfolipídios de membrana, com disponibilidade para ligação com o íons de cálcio. Isso pode ser alcançado por meio da descclularização do PB que compõe as biopróteses.^{5,10,11}

A descclularização é uma técnica de engenharia de tecidos que visa à remoção de material celular e nuclear, com potencial para reduzir a calcificação do PB e aumentar a longevidade das BVCs, além de remover a antigenicidade residual e diminuir o risco de rejeição. O processo de descclularização emprega usualmente métodos biológicos e químicos e muitos protocolos têm sido desenvolvidos com diferentes substâncias químicas, concentrações e tempos de exposição.¹² Os agentes químicos mais utilizados são os detergentes iônicos (Triton X-100), não iônicos (desoxicolato de sódio, dodecilsulfato de sódio - SDS) e agentes enzimáticos biológicos (DNase, RNase, tripsina).^{13,14}

O uso clínico bem-sucedido do pericárdio para aplicações cardiovasculares depende da preservação das suas propriedades mecânicas, como resistência à tração, módulo de elasticidade e resistência à fratura. Assim, uma técnica de descclularização ideal deve remover o material celular com mínimos danos à matriz extracelular (MEC), pois a arquitetura e o conteúdo das fibras colágenas e elásticas dos folhetos teciduais de PB são responsáveis por sustentar a resposta mecânica das BVCs.^{5,6} Contudo, alguns tratamentos de descclularização falham em preservar a estrutura original do PB. Ainda que alguns trabalhos tenham demonstrado um bom efeito anticalcificante, aliado à preservação da estrutura colagênica original do PB^{9,10,12,16,17}, sabe-se que nenhum tratamento de descclularização é capaz de eliminar completamente as células do tecido xenogênico, sem provocar algum desarranjo na MEC do tecido processado.^{5,9,11,18,19} Assim, estudos adicionais *in vivo* são necessários para determinar se a descclularização produziria materiais mais biocompatíveis, com propriedades anticalcificantes e biomecânicas superiores às BVCs comercialmente disponíveis.

A descclularização de PBs destinados ao uso em BVCs ainda não é usual, mas tem sido investigada e proposta como uma etapa adicional do processamento químico do PB, previamente à sua fixação.^{5,20-22} Vale ressaltar que a fixação tecidual é essencial para a preservação do PB pós-implante, pois protege o tecido da resposta inflamatória que leva à degradação tecidual.^{5,21-23} Entre os agentes fixadores, o GA é o mais utilizado, embora tenha sido apontado como causa de calcificação devido à permanência de grupos aldeídos residuais provenientes da reticulação incompleta das proteínas teciduais pelo GA.^{8,24} Algumas estratégias podem diminuir os grupos aldeídos livres de GA por redução do tempo de fixação dos tecidos de PB²⁵⁻²⁷ e o pós-tratamento com incubação desse material em soluções de aminoácidos como

a taurina, ácido glutâmico e glicina.²⁸⁻³¹

A utilização de aminoácidos visa inativar de modo permanente os grupos aldeídos livres teciduais provenientes do GA e que, pelo seu caráter eletrofílico, permanecem expostos à ligação com íons cálcio. A incubação com aminoácidos estabelece ligações químicas estáveis com a carbonila dos grupos aldeídos, tornando esses grupos indisponíveis à nucleação mineral.²⁸ Por conta desse efeito, estudos com diferentes aminoácidos já demonstraram que esse procedimento reduz a calcificação de biopróteses, em comparação com materiais processados apenas com GA.^{8,28-31} Dentre os aminoácidos disponíveis, o ácido glutâmico não tem sido amplamente relatado na literatura para preparo de PBs destinados à fabricação de biopróteses, mas alguns estudos mostraram sua alta eficácia anticalcificante em modelos de implantação subcutânea em rato.^{28,30}

Considerando a complexidade dos mecanismos envolvidos na calcificação das biopróteses tratadas com GA, a combinação de estratégias anticalcificantes tem sido apontada como uma estratégia promissora, a fim de maximizar seus efeitos sobre a calcificação e a durabilidade do PB.^{5,23,30,31,32} Contudo, não existem protocolos padronizados na literatura e novos estudos devem ser realizados para testar a eficácia das associações de técnicas anticalcificantes.

Este trabalho explorou a associação de três técnicas anticalcificantes no processamento laboratorial de PBs destinados à BVCs, por meio da avaliação do efeito da descélularização em um protocolo anticalcificante composto por fixação em GA por tempo reduzido em relação a um protocolo comercial validado³⁰ e pós-tratamento com ácido glutâmico. O método de descélularização empregado foi à base de surfactantes neutro (Triton X-100) e aniônico (SDS) e um agente quelante (ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA). Os tecidos descélularizados foram caracterizados histologicamente e avaliados quanto às suas propriedades térmicas e mecânicas, a fim de verificar se o PB acelular proposto pelo estudo apresentaria características biomecânicas adequadas para a construção de BVCs. Além disso, a resposta biológica e o efeito anticalcificante *in vivo* foram avaliados em um modelo de implantação em tecido subcutâneo de rato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação dos tecidos

As amostras teciduais de PB de animais de até 36 meses foram preparadas na Braile Biomédica (São Paulo – Brasil), obtidas a partir de um frigorífico certificado e armazenadas em uma solução tamponada (pH 7,4) de cloreto de sódio e cloreto de magnésio e mantidas a uma temperatura de 2°C a 15°C. Após a dissecação, os PBs foram lavados em solução salina, seccionados em fragmentos de 1 cm² e distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais.

As amostras do grupo PB5dAC foram submetidas previamente à fixação, a um tratamento de descélularização com soluções de glicerol, EDTA, Triton X-100, ázida sódica e etanol, conforme o protocolo padronizado. Após esse processo, os tecidos foram fixados sob o mesmo protocolo empregado para amostras do grupo PB5d. A fixação das amostras de ambos os grupos (PB5d e PB5dAC) ocorreu com incubação em solução de GA (Sigma Chemical Company, EUA), pH 7,4, por cinco dias (duas trocas com solução de GA a 0,1% e uma última troca com solução de GA a 0,5%). Após a fixação, todas as amostras foram imersas em uma solução

anticalcificante de ácido glutâmico, lavados com solução a 0,9% de cloreto de sódio e depois armazenadas em uma mistura de uma solução a 0,2% de GA e solução a 1% de etanol, pH 7,4.

2.2 Caracterização dos materiais

O teste de estabilidade térmica foi realizado através do método hidrotérmico com um extensômetro customizado, a fim de avaliar o grau de fixação (reticulação) das fibras colágenas no processo de preservação do PB. As análises foram realizadas tomando como parâmetro medidas de temperatura de encolhimento ou “Ts” (*shrinkage temperature*), determinada em °C. A Ts corresponde à temperatura na qual a amostra apresenta um encolhimento igual ou superior a 20% em relação ao seu tamanho original. Os corpos de prova moldados, medindo 2,0 cm x 0,8 cm, foram mantidos em extensão constante ao longo do eixo em um sistema de banho-maria, controlado eletronicamente, com resistências de 1 Kw para o aquecimento necessário de 1°C por minuto.

O estudo das propriedades mecânicas dos materiais dos grupos PB5d/PB5dAC foi realizado com corpos de prova moldados em conformidade com ASTM-D-638 (*Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics*). As propriedades avaliadas foram espessura (mm), resistência à tração (τ , kgf/mm²), alongamento na ruptura ($\epsilon\%$) e índice de tenacidade (calculado pelo produto da tração pela alongação, dividido por dois). A espessura do tecido foi medida em três pontos, usando um medidor de espessura (Mitutoyo, Japão) e as propriedades de tração foram avaliadas utilizando uma máquina de teste de tração Q-TEST (*MTS Systems Corporation*), equipada com medidor digital de força que opera a uma taxa de extensão de 100 mm/min. A resistência à tração, o alongamento e à tenacidade foram avaliados a partir de parâmetros de referência aceitos para PBs reticulados em GA (GAPBs), destinados à fabricação de BVCs.

2.3 Implantação subcutânea em ratos

Todos os procedimentos em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA), do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, Brasil, local de realização do experimento, sob protocolo nº 9262310518. Foram utilizados 30 ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, machos, com 3-4 semanas de idade e massa de 80-90 gramas, obtidos de uma colônia de reprodução local, saudáveis e sem patógenos estritos. Os animais foram mantidos em 24°C, com um ciclo de claro/escuro de 12/12h

Cada animal recebeu dois implantes subcutâneos de PB, sendo um em região ântero-lateral dorsal esquerda (PB5d) e outro, em região ântero-lateral dorsal direita (PB5dAC). A anestesia foi realizada com uma combinação de quetamina (7,0 mg/100g) e xilazina (0,8 mg/100 g), via intraperitoneal. Após a tricotomia e antisepsia na região dorsal de ambos os lados, a pele do dorso foi aberta com duas incisões separadas (cada uma de 1,5cm), paralelas à coluna vertebral. Imediatamente antes da implantação, todas as amostras de tecido foram bem enxaguadas em água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). As amostras de PB foram implantadas em bolsas subcutâneas que foram posteriormente fechadas com fio de seda 4-0.

Os explantes seriados foram realizados após 14, 28 e 60 dias (n=10 para cada tempo biológico). Os animais foram sacrificados com sobredosagem de uma solução de quetamina (18

mg/100g) e xilazina (3 mg/100g), via intraperitoneal. O acesso aos materiais implantados ocorreu pela realização de incisões bilaterais e paravertebrais, seguida de delicada dissecação. Do número total de amostras explantadas do mesmo grupo, metade foi destinada à avaliação histológica e a outra metade, submetida à dosagem de cálcio. Os explantes destinados à avaliação histológica foram removidos, com preservação de 2 mm de tecido além da borda do implante. Todas as amostras foram lavadas em água ultrapura e armazenadas em solução tamponada de formaldeído a 4% (pH 7,2).

2.4 Avaliação histológica (pré e pós-implantação)

O estudo morfológico foi realizado em amostras pré e pós-implantação, por microscopia de luz (ML) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras indicadas para ML foram fixadas em solução fixadora de formaldeído a 4%, lavadas em tampão fosfato 0,05M por dez minutos, desidratadas em uma série crescente de etanol, diafanizadas com xilol e incluídas em parafina de forma a obter secções semi-seriadas de 4 µm, paralelas e transversais. Em seguida, as amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), Tricômico de Masson, Orceína e Von Kossa.

As secções coradas foram analisadas por dois patologistas de forma independente e as eventuais discrepâncias foram discutidas até alcançar o consenso. As imagens foram capturadas com auxílio de um sistema digital de aquisição de imagem, contendo microscópio Nikon Eclipse E-200 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) com magnificação de 400X, acoplado a uma câmera *Tucsen TrueChrome Metrics* (International Stemmer Imaging, Puchheim, Germany). O *software* utilizado para captura e análise das imagens foi o TUCSON *Tcapture* (International Stemmer Imaging, Puchheim, Germany).

O estudo morfológico compreendeu a avaliação da organização e integridade das fibras colágenas e fibras elásticas e para a presença de depósitos calcificados. Os resultados foram descritos com base na presença, natureza e intensidade da inflamação, fibrose, necrose, formação de cápsula, neovascularização e tipos celulares inflamatórios predominantes, conforme análise semiquantitativa adaptada de Thampi e colaboradores. (2013).³³ Os achados foram categorizados em graus de intensidade: ausente (0), discreto (1), moderado (2) e intenso (3), considerando-se como discreto todo parâmetro que comprometia o espécime em até 25%, moderado de 26 até 50% e intenso $\geq 51\%$ da lâmina observada.

As amostras indicadas para MEV foram fixadas em uma solução contendo 2% de GA e 2,5% de formaldeído (estudo morfológico), tamponada em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4), pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% tamponado por 30 minutos, novamente lavadas em cacodilato de sódio 0,1 M e desidratadas em uma série crescente de etanol. Após secagem em ponto crítico (Leica Geosystems, Switzerland), os espécimes foram montados sobre *stubs* de alumínio, colocados no aparelho Bal-Tec SCD 050 (Liechtenstein) para pulverização superficial com ouro e examinados em microscópio JEOL JSM-6390LV (Jeol Ltd, Japão), operando em 10–15 kV.

2.5 Quantificação do cálcio (pré e pós-implantação)

O teor de cálcio nos materiais explantados foi determinado com avaliação quantitativa por meio da Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES). A análise em tempo zero foi também realizada para controle negativo, por amostragem

aleatória. Para preparo das amostras, as massas foram pesadas em balança analítica (Mettler-Toledo, EUA) e transferidas para frascos de politetrafluoretileno. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL de HNO₃ 65% destilado (Merck, Alemanha), 1,0 mL de H₂O₂ (Merck, Alemanha) e 4,0 mL de água deionizada. As soluções foram preparadas com água deionizada com resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹, purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). Em seguida, os frascos foram fechados e submetidos a aquecimento em um bloco digestor (TECNAL, Brasil) a uma temperatura de 180 °C, por um tempo de 120 minutos. Em seguida, toda a solução foi pesada e transferida para tubos de centrífuga (Falcon) e avolumados para 10,0 mL com água deionizada.

A análise química foi realizada com um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Agilent, Austrália), utilizando as condições operacionais padrão do fabricante para espectrômetro, como potência de radiofrequência de 1,2 kW e vazão de gás de nebulização de 0,8 L min⁻¹. O gás argônio foi utilizado como gás de nebulização e geração do plasma, com pureza mínima de 99,9999% (White Martins, Brasil). Um nebulizador pneumático do tipo Sea Spray, com uma câmara de duplo passo, foi usado para introdução da amostra. As concentrações de cálcio foram determinadas, utilizando o comprimento de onda em 317,933 nm.

2.6 Análise estatística

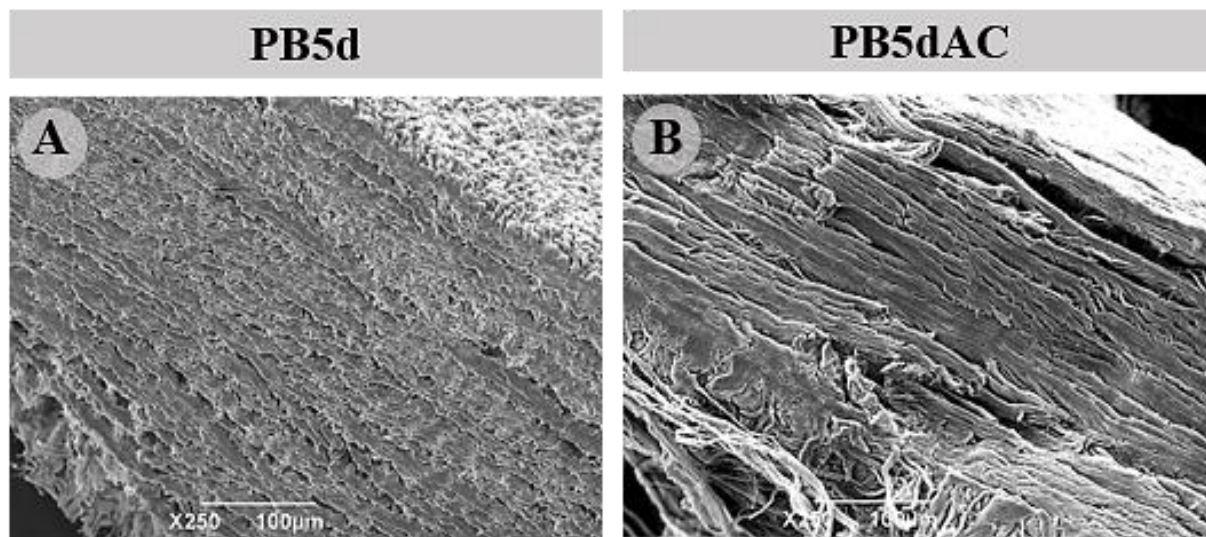
Todos os dados são apresentados com mediana e quartis. Após o teste de *Shapiro-Wilk* para normalidade, os grupos foram comparados utilizando análises paramétricas de *Wilcoxon* para dados emparelhados. Comparações entre tempos biológicos foram realizadas utilizando teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste *post-hoc* de *Dunn*. A análise estatística foi realizada com o *software* livre “R” (versão 4.1.2).

3. RESULTADOS

3.1 Análise histológica (pré-implantação)

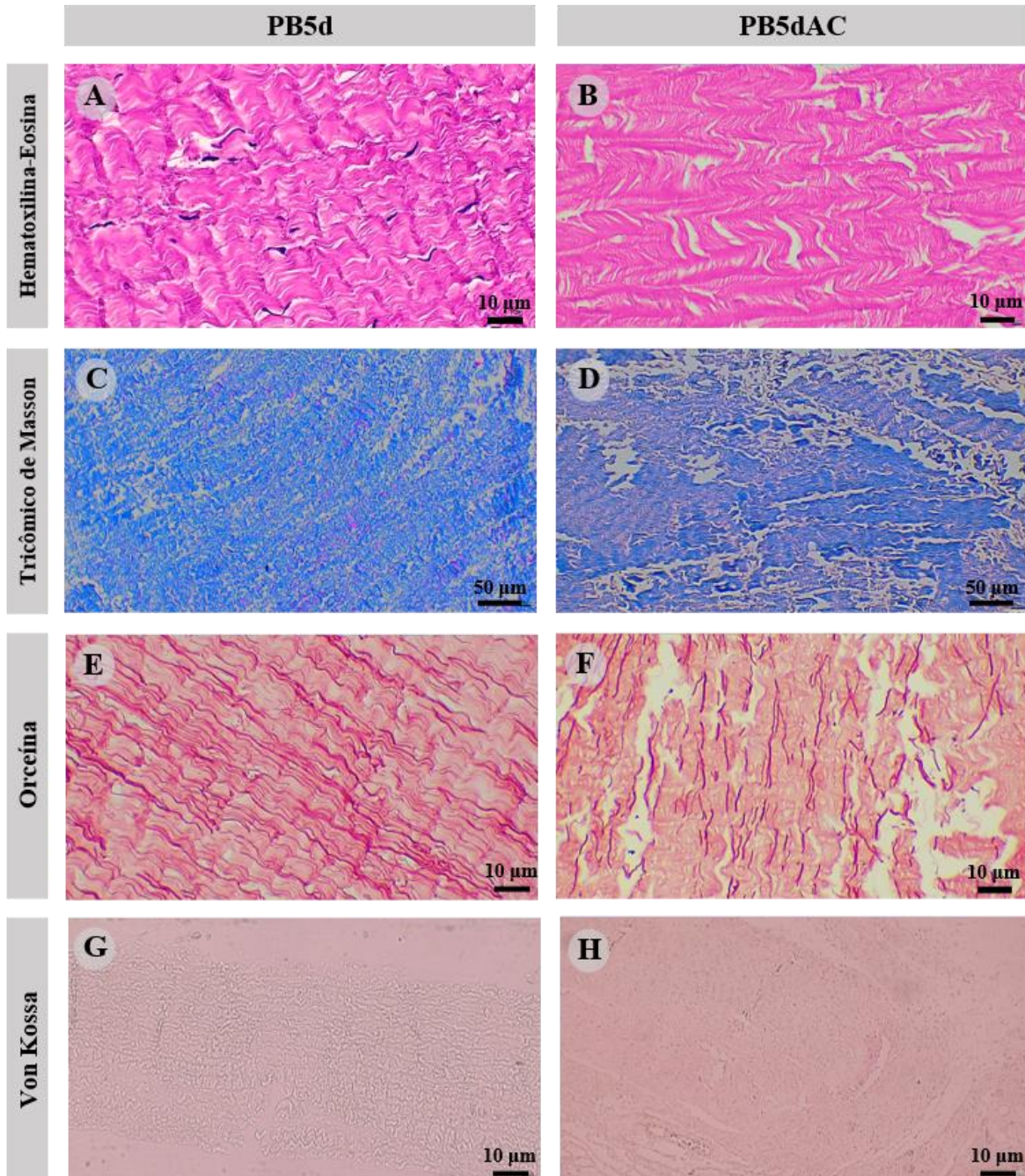
A análise morfológica por ML e por MEV de PB5d e PB5dAC não implantados revelou importantes diferenças entre os grupos. As imagens de MEV demonstram uma matriz fibrosa mais organizada e com manutenção do aspecto ondulado das fibras colágenas, em amostras do grupo PB5d (Figura 1A), em contraste com as amostras do grupo PB5dAC (Figura B). Em ML, as amostras pré-implantação do grupo PB5d apresentaram um padrão tecidual celularizado, com predomínio de fibroblastos (Figura 2A), arranjo organizado de fibras colágenas (Figura 2C), além de fibras elásticas preservadas (Figura 2E). Em comparação, a análise de amostras de PB5dAC demonstrou ausência de resíduos celulares (Figura 2B), fibras colágenas fragmentadas, formando feixes mais espaçados e sem orientação definida (Figura 2D), e muitas fibras elásticas rompidas (Figura 2F).

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de PB pré-implantação dos grupos PB5d e PB5dAC. A matriz colágena aparece organizada em camadas e com sua ondulação característica preservadas nas amostras de PB5d (A). Em PB5dAC, a matriz colágena é mais compactada com perda da ondulação (B).



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 2. Pericárdio bovino pré-implantação: PB5d (A, C e E) e PB5dAC (B, D e F). As amostras de PB5d exibem matriz celularizada (A) e em PB5dAC são acelulares (B), as fibras colágenas são mais preservadas no grupo PB5d (C) e mais espaçadas em PB5dAC (D) e as fibras elásticas aparecem preservadas em PB5d (E) e fragmentadas em maior quantidade em PB5dAC (F). Não foram detectados depósitos calcificados em PB5d (G) e em PB5dAC (H). Colorações com Hematoxilina-Eosina, Tricômico de Masson, Orceína e Von Kossa.



Fonte: Dados da pesquisa.

3.2 Testes mecânicos e de estabilidade térmica

O estudo comparativo entre os grupos PB5d e PB5dAC indicou valores semelhantes para as propriedades temperatura de encolhimento, resistência à tração, alongamento e índice de tenacidade. Contudo, uma diferença estatisticamente significativa foi observada quando a espessura das amostras foi comparada, havendo uma menor espessura nas amostras de PB5d ($p = 0,048$) (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades mecânicas e térmicas de PB dos grupos PB5d e PB5dAC.

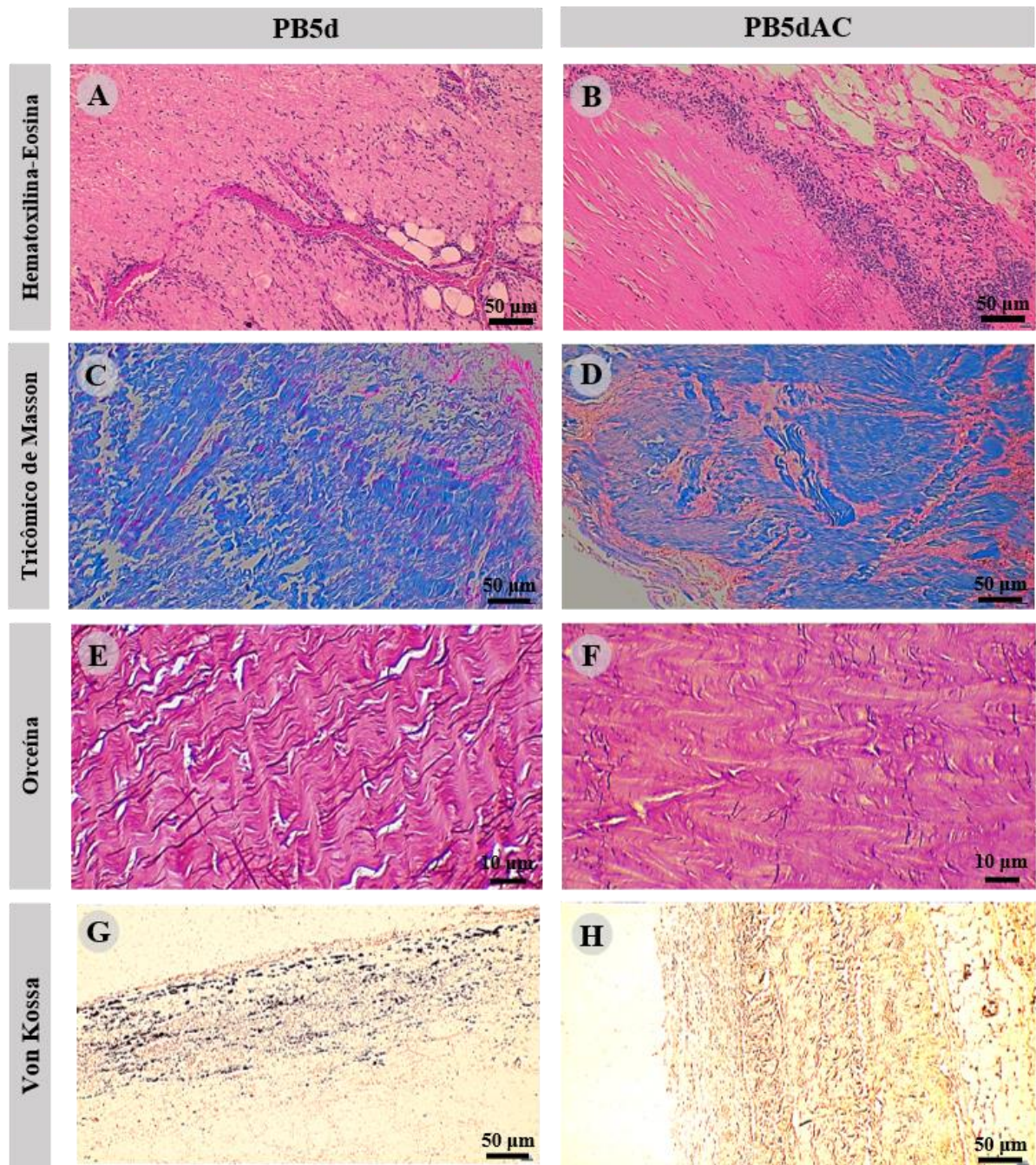
Parâmetros	Material				p-valor
	PB 5d		PB5dAC		
	Mediana	q1-q3	Mediana	q1-q3	
Temperatura de encolhimento (°c)	86,80	86,20-89,90	85,70	84,75-86,15	0,167
Espessura (mm)	0,40	0,37-0,48	0,60	0,56-0,74	0,048
Resistência à tração (kgf/mm ²)	1,29	1,16-1,67	1,20	1,13-1,25	0,714
Alongamento (%)	53,05	49,30-64,70	58,20	56,10-60,35	0,714
Índice de tenacidade	40,60	37,50-46,60	35,10	32,85-36,30	0,167

Fonte: Dados da pesquisa.

3.3 Análise histológica (pós-implantação)

Em amostras de PB5d, foi observada uma maior formação de vasos sanguíneos, especialmente nas áreas de degradação do colágeno (Figura 3A). Em comparação ao grupo PB5d, as amostras do grupo PB5dAC explantadas após 60 dias mostravam uma resposta inflamatória ligeiramente maior, coincidindo com áreas de fagocitose ativa e uma cápsula fibrosa mais desenvolvida (Figura 3B). As amostras de PB5d apresentaram uma matriz composta por fibras e feixes colágenos bem preservados (Figura 3C), enquanto a matriz do grupo PB5dAC exibia uma maior deposição de colágeno, fibras colágenas mais fragmentadas e com perda de sua ondulação característica (Figura 3D). O estudo histológico comparativo intergrupos mostrou ainda uma redução progressiva na quantidade de fibras elásticas, em função dos tempos analisados para ambos os materiais, com uma maior preservação em PB5d (Figura 3E), enquanto os explantes de PB5dAC apresentaram fibras elásticas rompidas, muitas vezes com acúmulos de focais dos seus fragmentos, os quais estavam praticamente ausentes no último período de análise (Figura 3F). O estudo histológico pela técnica de Von Kossa mostrou a presença de focos de calcificação em algumas amostras do grupo PB5d aos 28 e 60 dias (Figura 3G), mas não detectou áreas calcificadas nas amostras do grupo PB5dAC em nenhum período analisado (Figura 3H).

Figura 3 Pericárdio bovino pós-implantação: PB5d e PB5dAC explantados após 60 dias (Hematoxilina-Eosina, Tricômico de Masson, Orceína e Von Kossa).



Fonte: Dados da pesquisa.

3.4 Análise semiquantitativa

Os resultados da avaliação semiquantitativa foram submetidos à análise estatística, complementando a análise histológica realizada. O estudo de células inflamatórias indicou predomínio de macrófagos em ambos os grupos e para todos os tempos analisados. Aos 14 dias, a inflamação era crônica, com ausência de neutrófilos e, a partir desse período, houve um gradual

aumento de linfócitos. Nos tempos mais tardios, amostras dos dois grupos mostravam predominância de células fagocitárias. A comparação estatística intergrupos demonstrou uma uniformidade na quantidade de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células gigantes nas amostras explantadas. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao grau de inflamação e à formação de cápsula. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas apenas em um mesmo grupo em função dos períodos analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da avaliação semiquantitativa da resposta tecidual ao pericárdio bovino dos grupos PB5d e PB5dAC, explantado após 14, 28 e 60 dias (n = 5 animais/período de implantação).

Parâmetros	Material	Tempo						p-valor
		14 dias		28 dias		60 dias		
		Mediana	q1-q3	Mediana	q1-q3	Mediana	q1-q3	
Inflamação*	PB 5d	2,0	1,0-2,5	2,0 ^A	2,0-3,0	1,0 ^B	1,0-1,0	0,014
	PB5dAC	2,0	1,0-2,0	1,0	1,0-2,0	2,0	1,5-2,0	0,459
	p-valor	1,000		0,250		0,125		
Linfócitos	PB 5d	2,0	2,0-2,5	3,0	1,5-3,0	3,0	3,0-3,0	0,070
	PB5dAC	1,0	1,0-1,0	1,0	1,0-1,5	2,0	1,0-2,5	0,099
	p-valor	0,063		0,125		0,125		
Plasmócitos	PB 5d	1,0	0,0-1,0	1,0	0,0-1,0	0,0	0,0-1,0	0,627
	PB5dAC	0,0	0,0-0,0	0,0	0,0-0,5	0,0	0,0-1,0	0,311
	p-valor	0,250		0,500		1,000		
Macrófagos*	PB 5d	3,0	2,5-3,0	3,0	2,5-3,0	3,0	2,5-3,0	1,000
	PB5dAC	3,0 ^A	3,0-3,0	2,0 ^B	2,0-2,0	3,0	3,0-3,0	0,001
	p-valor	1,000		0,125		1,000		
Células gigantes	PB 5d	2,0	2,0-2,0	2,0	2,0-2,0	2,0	1,5-2,0	0,368
	PB5dAC	2,0	1,5-2,0	1,0	1,0-2,0	1,0	1,0-1,5	0,174
	p-valor	1,000		0,250		0,250		
Cápsula	PB 5d	0,0	0,0-1,0	2,0	0,5-2,0	1,0	1,0-2,0	0,130
	PB5dAC	2,0	1,5-2,0	1,0	0,0-2,0	2,0	0,5-2,0	0,350
	p-valor	0,125		0,750		1,000		

Fonte: Dados da pesquisa.

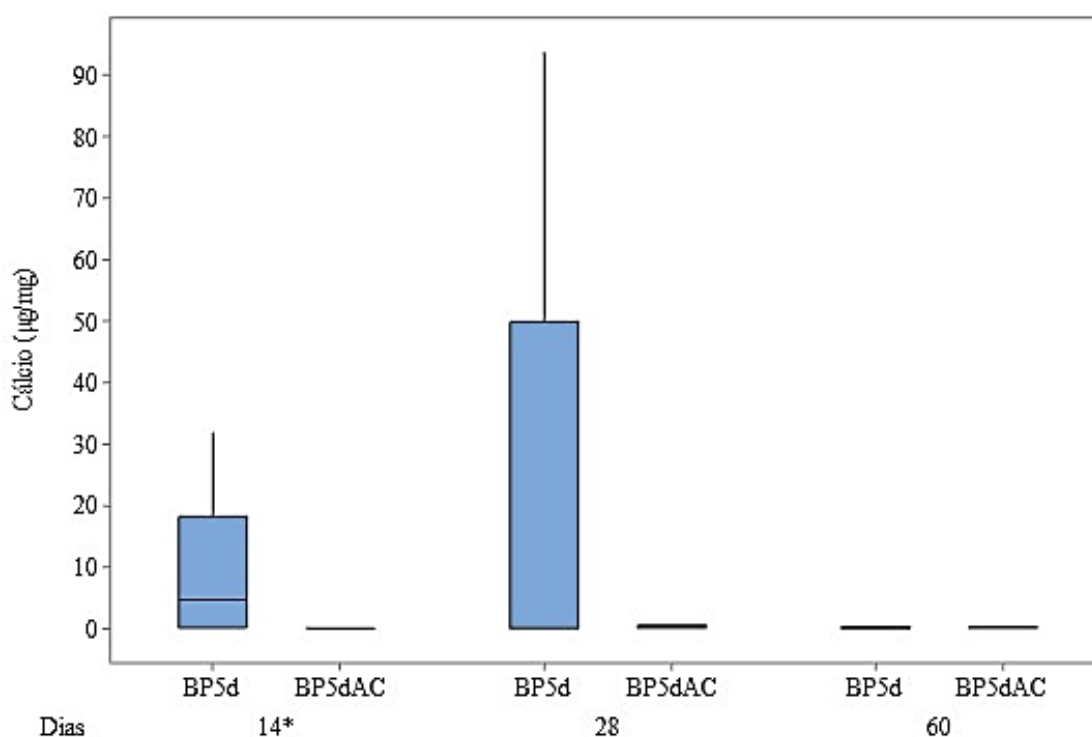
Legenda: * Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste a posteriori de Dunn

3.5 Análise da calcificação

O resultado da análise química elementar por ICP-OES mostrou um baixo índice de calcificação nos explantes PB5d e PB5dAC. Os dados estão apresentados no Gráfico 1, com

valores de medianas, primeiro e terceiro quartis e expressos em μg de Ca^{2+} /mg de tecido seco. Aos 14 dias, o teor de cálcio do grupo PB5d foi significativamente maior ($p=0,043$) em comparação com amostras de PB5dAC, com 4,76 (0,15 – 31,82) *versus* 0,14 (0,09 - 0,17), respectivamente. Aos 28 dias, foi observada uma maior quantidade de amostras calcificadas em PB5d, com grande variação no índice de cálcio entre os explantes do grupo (0,13-93,60) em contraste ao grupo PB5dAC, que apresentou valores menores (0,11-0,87), embora a comparação de medianas não tenha demonstrado diferença estatisticamente significativa (0,26 *versus* 0,15). No período de 60 dias, o conteúdo de cálcio foi muito baixo nas amostras de PB5d e PB5dAC, com valores semelhantes entre os grupos: 0,20 em PB5d (0,13-0,53) e 0,19 em PB5dAC (0,14-0,39).

Gráfico 1 Diagrama de box plot para teor de cálcio em μg de Ca^{2+} /mg de tecido seco de pericárdio bovino dos grupos PB5d e PB5dAC, explantados após 14, 28 e 60 dias, pelo método ICP-OES.



Fonte: Dados da pesquisa.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito da descélularização em um protocolo de tratamento de PBs para evitar a calcificação de BVCs. Para isso, utilizou-se o efeito combinado da descélularização prévia do PB, com outras duas estratégias anticalcificantes comprovadas por estudos anteriores: redução do tempo de reticulação em GA^{25,26} e o pós-tratamento com aminoácidos.^{5,16,30,31} Resultados preliminares mostraram que a redução do tempo de fixação do PB em GA pode ser um método promissor para redução da calcificação distrófica em implantes subcutâneos de ratos, sem afetar as propriedades mecânicas do tecido antes da sua implantação.²⁵⁻²⁷ Quanto ao uso de aminoácidos, estudos prévios demonstraram a redução de

grupos aldeídos residuais com afinidade ao cálcio através da reação do PB com grupamentos amínicos, após incubação em aminoácidos, como o ácido glutâmico.^{28,30} Dessa forma, todas as amostras de PB utilizadas neste trabalho foram reticuladas em solução de GA por cinco dias e passaram por incubação em ácido glutâmico para inativação de aldeídos residuais. Para compor o grupo teste (PB5dAC), as amostras passaram por um tratamento prévio de descelularização com surfactantes.

Visando avaliar o impacto do protocolo de descelularização sobre as propriedades físicas do tecido, a presente investigação realizou testes mecânicos e de estabilidade térmica de amostras dos grupos PB5dAC e PB5d, antes de sua implantação, além de uma análise histológica por ML e MEV. A avaliação comparativa das amostras pré-implantação não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quanto aos parâmetros temperatura de encolhimento, resistência à tração, alongamento e tenacidade. Apenas o parâmetro espessura diferiu entre os grupos, havendo uma menor espessura nas amostras de PB5d. Este achado não pode ser atribuído aos diferentes protocolos empregados no estudo, visto que há naturalmente uma grande variabilidade na espessura do PB, mesmo quando a coleta é feita em animais com idades semelhantes. Um achado curioso foi que as amostras do grupo com maior espessura mostravam uma cápsula peri-implantar mais desenvolvida, em comparação com aquelas do grupo PB5d. Outros autores, ao compararem implantes com diferentes espessuras, também observaram cápsulas fibrosas mais desenvolvidas em implantes com maior espessura.^{34,35}

É importante ressaltar que, embora a espessura do implante seja um fator que influencie a resposta de corpo estranho no organismo receptor, o estudo das dimensões da cápsula em trabalhos experimentais com PB em tecido subcutâneo é pouco relevante, uma vez que os folhetos de PB empregados na substituição clínica de valvas cardíacas têm contato com o sangue e, portanto, não há formação de cápsula. Além disso, a disponibilidade de PB em diferentes espessuras seria importante para atender à necessidade de confecção de biopróteses de variadas dimensões.

Ainda que alterações mecânicas importantes não tenham sido detectadas pelos testes mecânicos, a análise morfológica por ML e MEV das amostras pré-implantação do PB acelular mostrou alterações marcantes na estrutura de sua MEC, como a perda do padrão ondulado das fibras colágenas e fragmentação das fibras elásticas. Para utilizar plenamente os benefícios do PB, as técnicas de processamento laboratorial desse tecido devem manter o arcabouço tecidual o mais próximo possível da sua estrutura original.^{17,21} No entanto, a presença de alterações morfológicas na matriz colagênica e em fibras elástica é um achado comum em tecidos xenogênicos submetidos a diferentes tratamentos de descelularização.^{5,11,19}

Decorridos 14, 28 e 60 dias de sua implantação em tecido subcutâneo de ratos, os explantes acelularizados (PB5dAC) apresentaram o mesmo padrão de desorganização da matriz de colágeno e de elastina observado nas amostras pré-implantação, ou seja, presença de fibras elásticas colapsadas e, muitas vezes, ausentes, quando examinadas em ML e MEV. Em comparação, o grupo PB5d mostrava uma matriz com fibras colágenas e fibras elásticas mais preservadas, indicando que a descelularização proposta pelo estudo pode alterar a estrutura do colágeno e a elastina dos implantes, com potencial efeito de alterar o comportamento biomecânico da BVC em longo prazo. O conteúdo e a arquitetura das fibras de colágeno são responsáveis por sustentar a resposta mecânica das BVCs⁶ e, sabidamente, elementos alterados

na MEC podem aumentar a predisposição à falha das BVCs por fadiga mecânica, independente de calcificação^{21,36,37} e, além disso, representam sítios de atração para o cálcio.⁶ Assim, técnicas de processamento que visem à preservação da estrutura original do tecido PB podem aumentar a durabilidade das BVCs, além de minimizar o risco de sua calcificação.

As alterações morfológicas observadas nas amostras acelularizadas deste estudo podem estar relacionadas com o processamento. No presente estudo não se verificou prejuízo à propriedade de resistência à tração, no entanto, Heuschkel (2018), ao empregar uma substância surfactante para promover a descclularização de implantes, observou vestígios do detergente utilizado no tecido, mesmo após sucessivas etapas de lavagem, o que poderia explicar os seus achados de perda de resistência à tração e de aumento da proteólise das fibras elásticas observados em sua investigação.¹⁸

Uma técnica ideal de descclularização para as biopróteses cardíacas deve remover os detritos celulares, preservar as propriedades mecânicas (resistência à tração, elasticidade e resistência à fratura), a estrutura e a carga eletrostática da matriz colagênica, pois mudanças nas interações eletrostáticas entre as moléculas de colágeno modificam o arranjo de fibrilas colágenas, com impacto sobre a estrutura tecidual. A manutenção do ponto isoelétrico do colágeno (6,5-8,0) é importante para não favorecer a deposição de íons de cálcio e de fosfato, como ocorre em matrizes de colágeno com características aniônicas.³⁸

A descclularização do PB pode ser alcançada por meio de vários métodos. Em geral, os protocolos realizam uma extração parcial ou completa dos fosfolipídios ácidos que formam as membranas lipoproteicas de células e de organelas citoplasmáticas, após a lavagem dos implantes em diferentes agentes químicos. Os agentes mais utilizados são etanol, éteres, surfactantes aniônicos como dodecil sulfato de sódio (SDS), surfactantes não iônicos como Triton X-100, tripsina, derivados do ácido amido oleico, ácido desoxicólico e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).^{19,29,30} No presente estudo, utilizou-se um protocolo de descclularização que empregou soluções de glicerol, EDTA, surfactantes iônicos (SDS) e neutro (Triton X-100), sem alterar a carga eletrostática da molécula de colágeno tipo I e preservando seu ponto isoelétrico em torno de 7,00.

Em particular, protocolos baseados em detergentes SDS e Triton X-100 combinados já foram considerados adequados para a descclularização de tecidos, proporcionando boa preservação da MEC, um comportamento biomecânico adequado; apresenta também suscetibilidade reduzida à calcificação do tecido, além de oferecer a vantagem adicional de eliminar antígenos associados às células, responsáveis pela imunogenicidade de BVCs, apesar de seu tratamento químico com GA.⁴ No presente estudo, a efetividade do protocolo de descclularização foi confirmada pela ausência de núcleos e demais restos celulares ao exame histológico. O tratamento causou alterações morfológicas na sua MEC, mas não interferiu nas propriedades térmicas e mecânicas do tecido pré-implantação. De forma similar, diferentes protocolos de descclularização de pericárdio suíno e bovino já foram descritos como métodos eficazes para preservar as propriedades estruturais e biomecânicas do tecido.^{10,12,18,19}

Alterações no padrão da MEC do PB acelular observados *in vitro* não necessariamente se traduzem em algum sinal de falha mecânica da valva após implantação.^{5,11} Porém, para que a tecnologia utilizada neste trabalho possa ser empregada com sucesso no futuro, análises pré-clínicas de biopróteses preparadas sob essa técnica são necessárias para maior validação. Mudanças de quantidade e alinhamento do colágeno podem ser toleradas especialmente pelo

desenvolvimento de técnicas que permitam o repovoamento de células hospedeiras e remodelação tecidual para se adaptar ao ambiente fisiológico.^{17,40} No trabalho de Wong (2016), com matrizes de pericárdio bovino acelular, houve repovoamento celular completo, evidência de renovação de colágeno e neovascularização dentro de 42 dias após a implantação.⁴¹

Há relatos de que a reticulação química da MEC pode ter efeitos prejudiciais consideráveis sobre a resposta de remodelação mediada pelo hospedeiro.^{17,21} Em nosso estudo, com base nos achados de repovoamento celular, neovascularização e deposição de colágeno em ambos os grupos, confirmou-se que o biomaterial GAPB não é inerte *in vivo*, pois em ambos os grupos o tratamento com GA não impediu o reparo e remodelamento celular do receptor em sítio de implantação subcutânea. A regeneração tecidual em torno do material implantado pode ser comprometida por fibrose extensa e por neovascularização limitada. Portanto, o estudo da neovascularização é um aspecto importante para avaliar a biocompatibilidade de biomateriais e sua permanência na área doadora. No presente estudo, os achados sugestivos de neovascularização foram observados nos implantes de ambos os grupos e em todos os períodos analisados, sendo mais comum nas amostras de PB5d, o que poderia indicar um reparo menos favorável das amostras acelularizadas.⁴²

A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um biomaterial, quando implantado, induzir uma resposta apropriada do hospedeiro. A avaliação da biocompatibilidade é uma medida da magnitude e duração das alterações adversas como infecção, inflamação e fibrose, as quais podem influenciar a resposta do hospedeiro. Portanto, uma resposta inflamatória controlada é esperada em um implante com boa biocompatibilidade. Sendo assim, o presente estudo avaliou a resposta inflamatória nas amostras implantadas em tecido subcutâneo de ratos, a fim de avaliar a influência da técnica de descelularização sobre a biocompatibilidade do BP.

O estudo histológico das amostras PB5d e PB5dAC mostrou um padrão inflamatório similar ao observado em outros estudos com implantes subcutâneos.^{30,43} A análise comparativa intergrupos mostrou uma inflamação ligeiramente mais intensa nas amostras de PB5dAC explantadas após 60 dias, devido às áreas mais difusas de fagocitose ativa, ainda que o estudo semiquantitativo não tenha demonstrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à severidade e ao padrão de células inflamatórias. A avaliação semiquantitativa indicou diferença estatisticamente significativa no padrão de células inflamatórias entre os tempos de análise, apenas dentro de um mesmo grupo. Em ambos os grupos, a inflamação estava concentrada às bordas do tecido implantado, associada a uma reação de corpo estranho, com presença de macrófagos, células gigantes, linfócitos e plasmócitos. Aos 14 dias, a inflamação era crônica, com ausência de neutrófilos e, a partir desse período, houve um gradual aumento de linfócitos. Em tempos mais tardios, amostras dos dois grupos mostravam predominância de células fagocitárias. A presença de macrófagos no interior do implante e células gigantes de corpo estranho nas bordas é justificada provavelmente pela existência prévia de fibras colágenas e elásticas degradadas no interior dos implantes.

O processo de descelularização visa reduzir a calcificação do tecido após sua implantação, fenômeno que enrijece os folhetos de PB e prejudica o funcionamento adequado da bioprótese. O estudo da calcificação ectópica do PB em subcutâneo de animais é uma medida indireta da calcificação de próteses valvulares feitas com esse material.³ A análise histológica pela técnica de Von Kossa dos tecidos explantados mostrou focos discretos ou moderados de calcificação

nas amostras tratadas apenas com GA, e ácido glutâmico em explantes obtidos aos 28 e 60 dias, enquanto nenhuma calcificação aparente foi observada em amostras do grupo PB5dAC. Tais achados foram confirmados pela análise química elementar (ICP-OES), a qual observou um baixo teor de cálcio nas amostras de ambos os grupos e um teor de cálcio significativamente mais baixo no grupo submetido ao novo tratamento anticalcificante (descelularização, reticulação em GA por 5 dias e ácido glutâmico).

Um estudo recente observou por ICP-OES uma concentração de 3,1 $\mu\text{g Ca}^{2+}/\text{mg}$ nas amostras reticuladas com GA a 0,5% por 10 dias, tratadas com ácido glutâmico e explantadas de tecido subcutâneo de ratos após 60 dias.³⁰ Sob condições experimentais muito próximas, o presente estudo observou uma concentração de 0,19 $\mu\text{g Ca}^{2+}/\text{mg}$ nas amostras de PB acelular, tratadas em GA a 0,5% por cinco dias e ácido glutâmico e explantadas aos 60 dias. A expressiva redução da calcificação no grupo PB5dAC pode ser explicada pela redução do tempo de reticulação e pela remoção dos componentes celulares, com afinidade ao cálcio pela técnica de descelularização, fatores que estão relacionados à calcificação precoce das BVCs.^{4,6} Contudo, outros fatores relacionados com esse processo também são relatados, a exemplo de evidências de deposição de cálcio em amostras de colágeno tipo I e elastina, em preparações de PB acelular. Esses componentes servem como substratos para nucleação mineral para formação de hidroxiapatita.⁴⁴ No entanto, a contribuição da calcificação das fibras de colágeno e de elastina provavelmente seja mínima, enquanto que o papel das células e resíduos celulares assume uma maior importância.^{4,6,44}

Em BVCs de PB comercialmente disponíveis, existe uma correlação significativa entre os níveis de fosfolípidios teciduais e o conteúdo de cálcio, de forma que os processamentos teciduais que visam à redução de fosfolípidios, pela remoção de células e detritos de suas membranas, são bem sucedidos na redução da calcificação.^{5,10,22,23} No entanto, nenhum tratamento de descelularização tem sido capaz de evitar completamente a calcificação. Ainda que os restos celulares do implante sejam completamente removidos, as células do indivíduo receptor podem se infiltrar e ficar aprisionadas na matriz do implante.⁴ Em virtude do ambiente citotóxico estabelecido pela fixação prévia em GA, essas células morrem, convertendo-se em detritos celulares com afinidade para os cristais de cálcio. Outros fatores podem influenciar na calcificação de biopróteses de PB, como idade do animal doador, posicionamento e adaptação da BVC no leito receptor, desenho da prótese (*stent* ou *stentless*), estrutura valvular, origem do pericárdio (porcino ou bovino) e combinação de estratégias anticalcificantes.⁴⁵

Considerando a complexidade dos mecanismos envolvidos na calcificação das biopróteses tratadas com GA, a combinação de várias estratégias anticalcificantes poderia maximizar seus efeitos sobre os implantes, aumentando a longevidade do xenoinxerto de PB.^{5,23,30-32} No presente estudo, procedeu-se à combinação de três estratégias anticalcificantes: (1) descelularização; (2) fixação em GA por cinco dias e (3) pós-tratamento com ácido glutâmico, que demonstrou ser eficaz na redução da calcificação de amostras de PB implantadas em tecido subcutâneo de rato, sem alterar as características biomecânicas; e a biocompatibilidade dos implantes.

5 CONCLUSÕES

A técnica de descelularização, associada à reticulação com GA por cinco dias, e o tratamento com ácido glutâmico foram capazes de reduzir as taxas de calcificação a valores mínimos, em amostras implantadas em tecido subcutâneo de rato. O protocolo proposto pelo estudo causou alterações na MEC dos tecidos tratados, mas não interferiu nas propriedades térmicas e mecânicas pré-implantação. Essa técnica combinou tratamentos anticalcificantes que agem em diferentes causas de calcificação, consistindo em uma estratégia promissora para otimização de protocolos já existentes por meio de um possível efeito sinérgico entre as técnicas anticalcificantes. Para validar essa hipótese e ampliar a compreensão dos mecanismos de calcificação de biopróteses, são necessários outros estudos utilizando implantação de biopróteses cardíacas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Braile Biomédica Indústria Comércio e Representações Ltda. Agradecemos a Aline Helenita Ramos Santos por sua assistência técnica, ao Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular e ao Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, em especial à professora Fabiana Paim Rosa por suas contribuições.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses com o conteúdo desse artigo.

REFERÊNCIAS

1. Johnston DR, Soltesz EG, Vakil N, Rajeswaran J, Roselli EE, Sabik JF, et al. Long-term durability of bioprosthetic aortic valves: implications from 12.569 implants. *Ann Thorac Surg.* 2015;99(4):1239–47.
2. Gong G, Ling Z, Seifter E, Factor SM, Frater RW. Aldehyde tanning: the villain in bioprosthetic calcification. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1991;5(6):288–99; discussion 293. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1908254>.
3. Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Levy RJ. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *Am J Pathol.* 1987;127(1):122–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1899585&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
4. Bonetti A, Marchini M, Ortolani F. Ectopic mineralization in heart valves: New insights from in vivo and in vitro procalcific models and promising perspectives on noncalcifiable bioengineered valves. *J Thorac Dis.* 2019;11(5):2126–43.
5. Collatusso C, Roderjan JG, De Noronha L, Klosowski A, Suss PH, Guarita-Souza LC, et al. Decellularization as a method to reduce calcification in bovine pericardium bioprosthetic valves. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2019;29(2):302–11.

6. Whelan A, Williams E, Fitzpatrick E, Murphy BP, Gunning PS, O'Reilly D, et al. Collagen fibre-mediated mechanical damage increases calcification of bovine pericardium for use in bioprosthetic heart valves. *Acta Biomater.* 2021;128:384–92.
7. Kim KM. Cellular mechanism of calcification and its prevention in glutaraldehyde treated vascular tissue. *Z Kardiol* 2001;90 Suppl 3:99-105. 120 (29)
8. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: Progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(3):1072–80.
9. Grefen L, König F, Grab M, Hagl C, Thierfelder N. Pericardial tissue for cardiovascular application: an in-vitro evaluation of established and advanced production processes. *J Mater Sci Mater Med.* 2018;29(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-018-6186-6>.
10. Tuladhar SR, Mulderrig S, Della Barbera M, Vedovelli L, Bottigliengo D, Tessari C, et al. Bioengineered percutaneous heart valves for transcatheter aortic valve replacement: a comparative evaluation of decellularised bovine and porcine pericardia. *Mater Sci Eng C.* 2021;123(January):111936. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111936>
11. Botes L, Laker L, Dohmen PM, van den Heever JJ, Jordaan CJ, Lewies A, Smit FE. Advantages of decellularized bovine pericardial scaffolds compared to glutaraldehyde fixed bovine pericardial patches demonstrated in a 180-day implant ovine study. *Cell Tissue Bank.* 2022 Jan 17. doi: 10.1007/s10561-021-09988-8. Epub ahead of print. PMID: 35037183
12. Aguiari P, Iop L, Favaretto F, Fidalgo CM, Naso F, Milan G, Vindigni V, Spina M, Bassetto F, Bagno A, Vettor R, Gerosa G. In vitro comparative assessment of decellularized bovine pericardial patches and commercial bioprosthetic heart valves. *Biomed Mater.* 2017 Feb 3;12(1):015021. doi: 10.1088/1748-605X/aa5644. PMID: 28157718.
13. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods (San Diego, Calif).* 2015;84:25–34.
14. Paniagua Gutierrez JR, Berry H, Korossis S, Mirsadraee S, Lopes SV, da Costa F, et al. Regenerative potential of low-concentration SDS-decellularized porcine aortic valved conduits in vivo. *Tissue Eng Part A.* 2015;21:332–42.
15. Parmaksiz M, Dogan A, Odabas S, et al. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed Mater.* 2016;11:1-14.
16. Lauten A, Laube A, Schubert H, Bischoff S, Nietzsche S, Horstkötter K, Poudel-Bochmann B, Franz M, Lichtenberg A, Figulla HR, Akhyari P. Transcatheter treatment of tricuspid regurgitation by caval valve implantation--experimental evaluation of decellularized tissue valves in central venous position. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2015 Jan 1;85(1):150-60. doi: 10.1002/ccd.25380.
17. Dalgliesh AJ, Parvizi M, Noble C, Griffiths LG. Effect of cyclic deformation on xenogeneic heart valve biomaterials. *PLoS One.* 2019;14(6):1–21.
18. Heuschkel MA, Leitolis A, Roderjan JG, Suss PH, Luzia CAO, da Costa FDA et al. In vitro evaluation of bovine pericardium after a soft decellularization approach for use in tissue engineering. *Xenotransplantation* 2018;e12464, doi: 10.1111/xen.12464].
19. Halfwerk FR, Rouwkema J, Gossen JA, Grandjean JG. Supercritical carbon dioxide decellularised pericardium: Mechanical and structural characterisation for applications in cardio-thoracic surgery. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018;77(Sep):400–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.10.002>

20. Hussein KH, Park K-M, Kang K-S, Woo H-M. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for bio- medical application. *Mater Sci Eng: C*. 2016;67:766–78.
21. Bracaglia LG, Fisher JP. Extracellular Matrix-Based Biohybrid Materials for Engineering Compliant, Matrix-Dense Tissues. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(16):2475–87.
22. Luo Y, Huang S, Ma L. A novel detergent-based decellularization combined with carbodiimide crosslinking for improving anti-calcification of bioprosthetic heart valve. *Biomed Mater*. 2021 May 24;16(4). doi: 10.1088/1748-605X/ac0088.
23. Li Q, Gao Y, Zhang J, Tang Y, Sun Y, Wu L, et al. Crosslinking and functionalization of acellular patches via the self-assembly of copper@tea polyphenol nanoparticles. *Regen Biomater*. 2022;9(May).
24. Lee S, Levy RJ, Christian AJ, Hazen SL, Frick NE, Lai EK, et al. Calcification and oxidative modifications are associated with progressive bioprosthetic heart valve dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(5):1–13.
25. Liao K, Frater RWM, LaPietra A, Ciuffo G, Ilardi CF, Seifter E. Time-dependent effect of glutaraldehyde on the tendency to calcify of both autografts and xenografts. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(SUPPL. 2):343–7.
26. Lee C, Lim HG, Lee CH, Kim YJ. Effects of glutaraldehyde concentration and fixation time on material characteristics and calcification of bovine pericardium: Implications for the optimal method of fixation of autologous pericardium used for cardiovascular surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2017;24(3):402–6.
27. Hofferberth SC, Baird CW, Hoganson DM, Quiñonez LG, Emani SM, del Nido PJ, et al. Mechanical Properties of Autologous Pericardium Change With Fixation Time: Implications for Valve Reconstruction. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2019;31(4):852–4.
28. Ferreira AD, Costa FD, Santos EA, Gomes CH, Collatusso C, Lopes SA, et al. L-glutamic acid in the prevention of the calcification of bovine pericardial fixed in glutaraldehyde: study in rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2007;22(3):303–9.
29. Meuris B, Praetere H De, Strasly M, Trabucco P. A novel tissue treatment to reduce mineralization of bovine pericardial heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2018;156(1):197–206. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.01.099>.
30. Braile-Sternieri MCVB, Goissis G, Giglioti A de F, Ramirez VDA, Pereira NP, de Vasconcellos A, et al. In vivo evaluation of Vivere bovine pericardium valvular bioprosthesis with a new anti-calcifying treatment. *Artif Organs*. 2020;(Apr):1–12.
31. Jiang Z, Wu Z, Deng D, Li J, Qi X, Song M, et al. Improved Cytocompatibility and Reduced Calcification of Glutaraldehyde-Crosslinked Bovine Pericardium by Modification With Glutathione. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10(May):1–13.
32. Lee C, Kim SH, Choi SH, Kim YJ. High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment: In vitro material assessment and in vivo anticalcification effect. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 2011;39(3):381–7.
33. Thampi P, Nair D, R. L, N. V, Venugopal S, Ramachandra U. Pathological effects of processed bovine pericardial scaffolds-a comparative in vivo evaluation. *Artif Organs*. 2013;37(7):600–5.
34. Ward WK, Slobodgian EP, Tiekotter KL, Wood MD. The effect of microgeometry, implant thickness and polyurethane chemistry on the foreign body response to subcutaneous implants. *Biomaterials*. 2002;23(21):4185–92.
35. Sanders JE, Stiles CE, Hayes CL. Tissue response to single- polymer fibers of varying diameters: evaluation of fibrous encapsulation and macrophage density. *J Biomed Mater Res* 2000;52:231–7.

36. Sellaro TL, Hildebrand D, Lu Q, Vyavahare N, Scott M, Sacks MS. Effects of collagen fiber orientation on the response of biologically derived soft tissue biomaterials to cyclic loading. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Jan;80(1):194–205. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30871>
37. Dong H, Liu M, Martin C, Sun W. A residual stiffness-based model for the fatigue damage of biological soft tissues. *J Mech Phys Solids*. 2020;143:104074. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmps.2020.104074>.
38. Goissis G, de Fátima Giglioti A, Braile DM. Preparation and characterization of an acellular bovine pericardium intended for manufacture of valve bioprostheses. *Artif Organs*. 2011;35(5):484–9.
39. Rezvova MA, Kudryavceva YA. Modern Approaches to Chemical Modification of Proteins in Biological Tissues : Consequences and Application. 2018;44(1):19–31.
40. Kluin J, Talacua H, Smits AI, Emmert MY, Brugmans MC, Fioretta ES, et al. In situ heart valve tissue engineering using a bioresorbable elastomeric implant—From material design to 12 months follow-up in sheep. *Biomaterials*. 2017; 125:101–17. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.007>.
41. Wong ML, Wong JL, Vapniarsky N, Griffiths LG. In vivo xenogeneic scaffold fate is determined by residual antigenicity and extracellular matrix preservation. *Biomaterials*. 2016; 92:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.024>.
42. Cramer M, Chang J, Li H, Serrero A, El-Kurdi M, Cox M, et al. Tissue response, macrophage phenotype, and intrinsic calcification induced by cardiovascular biomaterials: Can clinical regenerative potential be predicted in a rat subcutaneous implant model? *J Biomed Mater Res - Part A*. 2022;110(2):245–56.
43. Zilla P, Fullard L, Trescony P, Meinhart J, Bezuidenhout D, Gorlitzer M, et al. Glutaraldehyde detoxification of aortic wall tissue: a promising perspective for emerging bioprosthetic valve concepts. *J Heart Valve Dis*. 1997;6(5):510–20.
44. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006 Jul 7;27(19):3675–83. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206001682>.
45. Flameng W, Meuris B, Yperman J, Verbeken E. Factors influencing calcification of cardiac bioprostheses in adolescent sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;132(1):89–98.

7 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas biopróteses valvulares cardíacas com maior durabilidade e maior resistência à calcificação pós-implante, em relação às atualmente disponíveis, despertou o interesse para a presente pesquisa. As principais estratégias para minimizar o processo de calcificação tardia das BVCs são voltadas para o processamento químico dos folhetos teciduais de PB que compõe esses dispositivos. O pós-tratamento do PB em aminoácidos para a inativação dos aldeídos residuais de GA no tecido já é utilizado, enquanto as técnicas de fixação do PB com GA por períodos reduzidos e a descelularização prévia do tecido carecem de maior investigação para sua aplicação clínica. Nesse sentido, mais estudos voltados para a avaliação das propriedades físicas e biológicas dos tecidos processados são necessários, visando à comparação com PBs já certificados ao uso em BVCs. Além disso, faltam estudos que investiguem o efeito da combinação das técnicas anticalcificantes citadas. Por conta do aspecto multifatorial da calcificação, alguns autores têm sugerido a combinação de estratégias anticalcificantes como solução para maximizar a longevidade de xenoenxertos de pericárdio bovino.^{10,23,24,32,45}

Uma estratégia para reduzir o grau de calcificação, sem comprometer a estabilidade do material, seria ajustar cuidadosamente o tempo de fixação com GA.¹⁹⁻²¹ Adotamos neste estudo uma redução do tempo de fixação do PB com GA, utilizando um protocolo de tratamento de 5 dias, em comparação a um protocolo certificado que emprega 10 dias. As amostras de tecido PB fixadas pelo menor tempo apresentaram teor de cálcio reduzido pós implantação, resultado similar encontrado por outros autores com o mesmo modelo de implantação em tecido subcutâneo de ratos – ou seja, uma positiva correlação entre o grau de calcificação nos explantes de PB e tempo de exposição prévia ao agente fixador.^{19,155} No trabalho de Liao e colaboradores (1995), amostras de PB não fixados também foram testadas e praticamente não sofreram calcificação *in vivo*. No entanto, os tecidos que foram implantados “frescos” induziram resposta inflamatória severa, diretamente relacionada com a degradação do colágeno não reticulado. Esses resultados demonstram a importância da etapa de fixação tecidual para evitar o processo de digestão enzimática no organismo receptor, mas os autores ressaltam que a fixação do PB deve ser realizada por uma curta duração, a fim de evitar a calcificação em biopróteses feitas com esse material.¹⁹

A redução do tempo de incubação do PB em GA representa uma otimização dos protocolos estabelecidos e minimiza a calcificação tecidual pós implantação, provavelmente

pela eliminação ou redução de grupos aldeídos livres ou formas polimerizadas residuais de GA nos tecidos processados.^{10,19,67,155} Após a implantação, os grupos aldeídos representam sítios importantes para deposição de cálcio porque as moléculas de GA residuais no tecido são de grande polaridade e capazes de atrair íons cálcio. Além disso, a liberação gradual do GA, a partir das rupturas de ligações de GA polimérico, tem um conhecido efeito citotóxico local que predispõe a superfície do tecido implantado da BVC à calcificação.^{67,129}

Diferentes estudos com base em medidas de temperatura de encolhimento, um parâmetro que avalia o grau de reticulação tecidual, afirmam que tempos prolongados de imersão em GA não são necessários à reticulação do tecido e que uma fixação adequada do PB pode ser alcançada com menores tempos de incubação em GA. Lee e colaboradores (2017) mostraram que o tempo de fixação significativo para manutenção da estabilidade do tecido são os primeiros 20 minutos, que produzem 94% do total de ligações cruzadas obtidas em duas semanas de tratamento.²⁰ Em outro trabalho, Hofferberth e colaboradores (2019)²¹ fixaram espécimes de pericárdio autólogo por 10 minutos em solução de 0,6% de GA e encontraram valores de estiramento satisfatórios para uso clínico.²¹ Estudo prévio realizado por outro autor sugere que 15 minutos de fixação no GA poderia fazer 80% do total das ligações cruzadas alcançadas em duas semanas de tratamento para a mesma concentração utilizada.¹⁹ Esses achados confirmaram os resultados de Woodroof e colaboradores (1978), de que a reação de reticulação ocorre de maneira rápida e se mostra quase completa após uma hora em tecidos fixados com soluções de GA, em baixas concentrações, entre 0,1 e 5%.¹⁴

Para reduzir ainda mais a influência dos resíduos de aldeídos na calcificação do PB, todas as amostras de PB utilizadas neste trabalho, após a fixação, foram submetidas a um pós-tratamento com o aminoácido ácido glutâmico. A utilização de aminoácidos está associada à redução da calcificação porque pode inativar de modo permanente os grupos aldeídos livres teciduais provenientes do GA e que, pelo seu caráter eletrofílico, estavam expostos à ligação com íons cálcio. A incubação com aminoácidos estabelece ligações químicas estáveis com a carbonila dos grupos aldeídos, tornando esses grupos indisponíveis à nucleação mineral.³⁰ Por conta desse efeito, estudos com diferentes aminoácidos já demonstraram que esse procedimento reduz a calcificação de biopróteses, em comparação com materiais processados apenas com GA.^{12,23,24,30,67,125} Dentre os aminoácidos disponíveis, o ácido glutâmico para neutralização de grupos aldeídos livres em GAPBs, destinados à fabricação de biopróteses, não tem sido amplamente relatado na literatura, mas alguns estudos sob protocolo semelhante com a presente pesquisa mostraram alta eficácia anticalcificante do ácido glutâmico em tecidos GAPB

implantados em subcutâneo de ratos^{29,30}, sem alterar as propriedades físicas do tecido tratado por esse método.²³

É importante que os estudos sobre diferentes métodos anticalcificantes, além de explorarem a calcificação pós-implante, também analisem as propriedades físicas dos tecidos, que são altamente dependentes das condições de processamento e têm efeitos diretos no desenvolvimento de novas BVCs. Sabidamente, um protocolo ótimo de tratamento do tecido PB reticulado por GA é aquele capaz de induzir um mínimo de calcificação, enquanto assegura a sua estabilidade mecânica, dois aspectos que influenciam na durabilidade das biopróteses após a sua implantação em humanos. Nesse sentido, o presente trabalho mostrou que a redução do tempo de fixação do PB com GA e o pós tratamento com ácido glutâmico, além de resultar em redução da calcificação, maior biocompatibilidade e preservação da MEC tecidual, não alterou de forma significativa as propriedades físicas do tecido em comparação aos respectivos controles. Por conta das vantagens oferecidas, os resultados demonstrados podem incentivar a aplicação desse protocolo (GA por 5 dias + ácido glutâmico) para o preparo de PBs na fabricação de novas biopróteses cardíacas.

Convém ressaltar que, até o momento, nenhum tratamento prévio evita completamente a calcificação das biopróteses em condições clínicas.¹¹ Adicionalmente, outros métodos anticalcificantes descritos na literatura podem ser combinados e resultar em um efeito sinérgico vantajoso à redução da calcificação, o que conseqüentemente aumentaria o grau de biocompatibilidade e durabilidade das BVCs.^{10,23,24,32,45} A descclularização de PB, previamente à sua fixação com GA, foi outra estratégia utilizada neste estudo. Em valvas cardíacas de PB comercialmente disponíveis, existe uma correlação significativa entre os níveis de fosfolípidios teciduais e o conteúdo de cálcio, de forma que os processamentos teciduais que visam à redução de fosfolípidios pela remoção de células e detritos de suas membranas são bem sucedidos na redução da calcificação *in vivo*.^{4,32,33,45,147} A descclularização é uma técnica de engenharia de tecidos que visa à remoção de material celular e nuclear e pode ser realizada por meio de vários métodos físicos, químicos e enzimáticos. Os agentes mais utilizados são etanol, éteres, surfactantes aniônicos, como dodecil sulfato de sódio (SDS), surfactantes não iônicos como Triton X-100, tripsina, derivados do ácido amido oleico, ácido desoxicólico e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).^{8,12,71,97} O protocolo de descclularização, desenvolvido para este estudo, empregou uma solução a base de glicerol, etanol, surfactantes neutro (Triton X-100) e aniônico (SDS) e um agente quelante (ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) que não altera a carga eletrostática da molécula de colágeno tipo I, preservando seu ponto

isoeletrico em torno de 7,00. Isso é importante porque mudanças nas interações eletrostáticas entre as moléculas de colágeno modificam a estrutura de fibrilas colágenas, com impacto sobre a estrutura tecidual. A manutenção do ponto isoeletrico do colágeno é importante também para não favorecer a deposição de íons de cálcio e de fosfato, como ocorre em matrizes de colágeno com característica aniônica.^{142,144}

Protocolos baseados em detergentes SDS e Triton X-100 combinados já foram considerados adequados para a descclularização de tecidos, proporcionando boa preservação da MEC, comportamento biomecânico adequado e suscetibilidade reduzida à calcificação do tecido^{170,171}, além de oferecer a vantagem adicional de eliminar antígenos associados às células, que são responsáveis pela imunogenicidade de biopróteses valvulares, apesar de seu tratamento químico com GA.¹⁷² No presente estudo, a efetividade do protocolo de descclularização com esses agentes foi confirmada pela ausência de núcleos e demais restos celulares ao exame histológico. O tratamento não interferiu nas propriedades térmicas e mecânicas do tecido pré-implantação, mas causou alterações na sua MEC. Vários autores também observaram alterações no padrão da MEC do PB acclular submetidos a diferentes protocolos e afirmam que, de forma geral, ainda que existam muitas substâncias disponíveis para descclularização, nenhuma delas é capaz de eliminar completamente as células do tecido xenogênico sem provocar algum grau de desarranjo na estrutura de colágeno e elastina original.^{40,110,143,144} Essas alterações não necessariamente se traduzem em algum sinal de falha mecânica da valva após sua implantação.^{32,42} Porém, para que a tecnologia utilizada neste trabalho possa ser empregada com sucesso no futuro, análises pré-clínicas de biopróteses preparadas sob essa técnica são necessárias para maior validação.

Por outro lado, constatamos que a técnica de descclularização proposta foi capaz de maximizar o efeito anticalcificante obtido pela fixação com GA por cinco dias e a neutralização com ácido glutâmico. A análise quantitativa por ICP-OES mostrou valores baixos de calcificação em ambos os grupos e um teor de cálcio significativamente mais baixo no grupo submetido ao novo tratamento anticalcificante (descclularização + reticulação em GA por cinco dias + ácido glutâmico). Estudo recente observou uma concentração de 3,1 µg Ca²⁺/mg nas amostras reticuladas com GA a 0,5% por 10 dias, tratadas com ácido glutâmico e explantadas de tecido subcutâneo de ratos após 60 dias.²³ Sob condições experimentais muito próximas, o presente estudo observou uma concentração de 0,2 µg Ca²⁺/mg nas amostras de PB acclular, tratadas em GA a 0,5% por cinco dias e ácido glutâmico. A expressiva redução da calcificação nesse grupo pode ser explicada pela redução do tempo de reticulação e pela remoção dos

componentes celulares, com afinidade ao cálcio pela técnica de descelularização, fatores relacionados à calcificação precoce das próteses valvulares.^{4,6,11,119} Com base nesses achados, pode-se sugerir que a combinação de técnicas anticalcificantes pode ser uma estratégia promissora na minimização da calcificação do PB.

Limitações do estudo

O modelo de implantação subcutânea em ratos utilizado no presente estudo é bem aceito^{7,12,161} e geralmente prediz uma resposta de calcificação semelhante à observada em espécimes clínicos.¹⁶¹ No entanto, esse modelo não submete o material a fluxo sanguíneo contínuo, pressão ou estresse mecânico dinâmico, fatores que poderiam influenciar na calcificação do material.¹⁷³ Sendo assim, os resultados aqui obtidos servem como ponto de partida para a seleção de novos materiais para biopróteses cardiovasculares, mas a metodologia apresentada não substitui os ensaios pré-clínicos com modelos de implantação intracardíaca em animais de grande porte.

Diante dos promissores resultados encontrados nesta pesquisa, novos estudos que abranjam avaliações histomorfológica e histomorfométrica, assim como outros métodos de caracterização físico-química e imaginológicas, necessitam ser realizados com a finalidade de subsidiar futuras aplicações clínicas.

8 CONCLUSÃO

A redução do tempo de fixação do PB em GA diminuiu a inflamação e a calcificação do material implantado, sem alterar as propriedades físicas importantes para a confecção de biopróteses valvulares. A observação de pequenos focos de calcificação em algumas amostras do material reticulado por cinco dias indica que o protocolo de processamento proposto não impediu completamente a deposição de cálcio sobre o pericárdio bovino, mas se constitui em uma estratégia promissora que, quando associada a outras estratégias anticalcificantes, pode otimizar os protocolos já existentes.

A combinação da descelularização do PB, sua fixação com GA por 5 dias e o pós tratamento com ácido glutâmico foi capaz de reduzir as taxas de calcificação das amostras implantadas no tecido subcutâneo de ratos. Ainda que tenham sido observadas distorções morfológicas na MEC das amostras tratadas com a técnica laboratorial de descelularização, esse tratamento não afetou as propriedades térmicas e mecânicas do tecido. Diante do exposto, esse protocolo pode ser uma estratégia promissora para otimização de protocolos já existentes por um possível efeito sinérgico entre as técnicas anticalcificantes. Para validar essa hipótese e ampliar a compreensão dos mecanismos de calcificação de biopróteses, são necessários outros estudos utilizando implantação de biopróteses cardíacas.

REFERÊNCIAS

1. Rostagno C. Heart valve disease in elderly. *World J Cardiol.* 2019;11(2):71–83.
2. Singhal P, Luk A, Butany J. Bioprosthetic heart valves: impact of implantation on biomaterials. *Int Scholar Res Notices Biomater.* 2013:1–14. doi: 10.5402/2013/728791.
3. Glushkova T V, Ovcharenko EA, Sevostyanova V V, Klyshnikov KY. [Calcification Patterns of the Components of the Cardiovascular System and Their Substitutes: Composition, Stucture and Localization of Calcific Deposits]. *Kardiologgia* . 2018 May;(5):72–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29870327>
4. Bonetti A, Marchini M, Ortolani F. Ectopic mineralization in heart valves: New insights from in vivo and in vitro procalcific models and promising perspectives on noncalcifiable bioengineered valves. *J Thorac Dis.* 2019;11(5):2126–43.
5. Dong H, Liu M, Martin C, Sun W. A residual stiffness-based model for the fatigue damage of biological soft tissues. *J Mech Phys Solids.* 2020;143:104074. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmps.2020.104074>.
6. Whelan A, Williams E, Fitzpatrick E, Murphy BP, Gunning PS, O'Reilly D, et al. Collagen fibre-mediated mechanical damage increases calcification of bovine pericardium for use in bioprosthetic heart valves. *Acta Biomater.* 2021;128(2021):384–92.
7. Schoen FJ, Tsao JW, Levy RJ. Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization. *Am J Pathol.* 1986;123(1):134–45. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1888152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
8. Rezvova MA, Kudryavceva YA. Modern Approaches to Chemical Modification of Proteins in Biological Tissues : Consequences and Application. 2018;44(1):19–31.
9. Rostagno C. Heart valve disease in elderly. *World J Cardiol.* 2019;11(2):71–83.
10. Lee C, Kim SH, Choi SH, Kim YJ. High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment: In vitro material assessment and in vivo anticalcification effect. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2011;39(3):381–7.
11. Oury C. Prosthetic Aortic Valves: Challenges and Solutions. 2018;5(May):1–5.
12. Meuris B, Praetere H De, Strasly M, Trabucco P. A novel tissue treatment to reduce mineralization of bovine pericardial heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg [Internet].* 2018;156(1):197–206. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.01.099>.

13. Tam H. Fixation of Bovine Pericardium-Based Tissue Biomaterial with Irreversible Chemistry Improves Biochemical and Biomechanical Properties. *J Cardiovasc Transl Res*. 2017 April; 10(2): 194–205. Available from: <https://doi:10.1007/s12265-017-9733-5>.
14. Woodroof EA. Use of glutaraldehyde and formaldehyde to process tissue heart valves. *J Bioeng*. 1978 Apr;2(1–2):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/98522>.
15. Ionescu MI, Pakrashi BC, Holden MP, Mary DA, Wooler GH. Results of aortic valve replacement with frame-supported fascia lata and pericardial grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1972 Sep;64(3):340–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5054873>.
16. Relland J, Perier P, Lecointe B. The Third Generation Carpentier-Edwards Bioprosthesis : Early Results. *J Am Coll Cardiol*. 1985;6(5):1149–54. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(85\)80323-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(85)80323-5).
17. Dalgliesh AJ, Parvizi M, Noble C, Griffiths LG. Effect of cyclic deformation on xenogeneic heart valve biomaterials. *PLoS One*. 2019;14(6):1–21.
18. Lei Y, Ning Q, Tang Y, Wang Y. Exogenous hyaluronic acid and chondroitin sulfate crosslinking treatment for increasing the amount and stability of glycosaminoglycans in bioprosthetic heart valves. *J Mater Sci Mater Med*. 2019;30(3):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-019-6237-7>.
19. Liao K, Frater RWM, LaPietra A, Ciuffo G, Iardi CF, Seifter E. Time-dependent effect of glutaraldehyde on the tendency to calcify of both autografts and xenografts. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(SUPPL. 2):343–7.
20. Lee C, Lim HG, Lee CH, Kim YJ. Effects of glutaraldehyde concentration and fixation time on material characteristics and calcification of bovine pericardium: Implications for the optimal method of fixation of autologous pericardium used for cardiovascular surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2017;24(3):402–6.
21. Hofferberth SC, Baird CW, Hoganson DM, Quiñonez LG, Emani SM, del Nido PJ, et al. Mechanical properties of autologous pericardium change with fixation time: Implications for Valve Reconstruction. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2019;31(4):852–4.
22. Chen W, Schoen FJ, Levy RJ. Mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves. *Circulation*. 1994 Jul;90(1):323–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8026014>.
23. Braile-Sternieri MCVB, Goissis G, Giglioti A de F, Ramirez VDA, Pereira NP, de Vasconcellos A, et al. In vivo evaluation of Vivere bovine pericardium valvular bioprosthesis with a new anti-calcifying treatment. *Artif Organs*. 2020;(Apr):1–12.
24. Jiang Z, Wu Z, Deng D, Li J, Qi X, Song M, et al. Improved Cytocompatibility and Reduced Calcification of Glutaraldehyde-Crosslinked Bovine Pericardium by Modification With Glutathione. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10(May):1–13.

25. Kim SS, Lim SH, Cho SW, Gwak SJ, Hong YS, Chang BC, et al. Tissue engineering of heart valves by recellularization of glutaraldehyde-fixed porcine valves using bone marrow-derived cells. *Exp Mol Med*. 2006;38(3):273–83.
26. Kim KC, Kim SH, Kim YJ. Detoxification of glutaraldehyde treated porcine pericardium using L-arginine & NABH(4). *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;44(2):99–107.
27. Yoshioka SA, Goissis G. Thermal and spectrophotometric studies of new crosslinking method for collagen matrix with glutaraldehyde acetals. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(3):1215–23.
28. Grabenwoger M, Grimm M, Eybl E, Leukauf C, Muller MM, Plenck H Jr, et al. Decreased tissue reaction to bioprosthetic heart valve material after L-glutamic acid treatment. A morphological study. *J Biomed Mater Res*. 1992;26(9):1231–40.
29. Grimm M, Grabenwoger M, Eybl E, Muller MM, Wolner E. Improved biocompatibility of bioprosthetic heart valves by L-glutamic acid treatment. *J. Card. Surg*. 1992;7(1):58–64.
30. Ferreira AD, Costa FD, Santos EA, Gomes CH, Collatusso C, Lopes SA, et al. L-glutamic acid in the prevention of the calcification of bovine pericardial fixed in glutaraldehyde: study in rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2007;22(3):303–9.
31. Goissis G, Braile DM, Carnevalli NC, Ramirez VA. Mechanical, thermal and morphological properties of glutaraldehyde cross-linked bovine pericardium followed by glutamic acid treatment. *Mater Res*. 2009;12:113–9.
32. Collatusso C, Roderjan JG, De Noronha L, Klosowski A, Suss PH, Guarita-Souza LC, et al. Decellularization as a method to reduce calcification in bovine pericardium bioprosthetic valves. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2019;29(2):302–11.
33. Tuladhar SR, Mulderrig S, Della Barbera M, Vedovelli L, Bottigliengo D, Tessari C, et al. Bioengineered percutaneous heart valves for transcatheter aortic valve replacement: a comparative evaluation of decellularised bovine and porcine pericardia. *Mater Sci Eng C [Internet]*. 2021;123(January):111936. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111936>
34. Heuschkel MA, Leitolis A, Roderjan JG, Suss PH, Luzia CAO, da Costa FDA, et al. In vitro evaluation of bovine pericardium after a soft decellularization approach for use in tissue engineering. *Xenotransplantation*. 2019;26(2):1–11.
35. Lauten A, Laube A, Schubert H, Bischoff S, Nietzsche S, Horstkötter K, Poudel-Bochmann B, Franz M, Lichtenberg A, Figulla HR, Akhyari P. Transcatheter treatment of tricuspid regurgitation by caval valve implantation--experimental evaluation of decellularized tissue valves in central venous position. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2015 Jan 1;85(1):150-60. doi: 10.1002/ccd.25380.
36. Aguiari P, Iop L, Favaretto F, Fidalgo CM, Naso F, Milan G, Vindigni V, Spina M, Bassetto F, Bagno A, Vettor R, Gerosa G. In vitro comparative assessment of decellularized bovine pericardial patches and commercial bioprosthetic heart valves. *Biomed Mater*. 2017 Feb 3;12(1):015021. doi: 10.1088/1748-605X/aa5644.

37. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods (San Diego, Calif)*. 2015;84:25–34.
38. Coffey S, Cairns BJ, Iung B. The modern epidemiology of heart valve disease. *Heart*. 2016;102(1):75–85.
39. Paniagua Gutierrez JR, Berry H, Korossis S, Mirsadraee S, Lopes SV, da Costa F, et al. Regenerative potential of low-concentration SDS-decellularized porcine aortic valved conduits in vivo. *Tissue Eng Part A*. 2015;21:332–42.
40. Halfwerk FR, Rouwkema J, Gossen JA, Grandjean JG. Supercritical carbon dioxide decellularised pericardium: Mechanical and structural characterisation for applications in cardio-thoracic surgery. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018;77:400–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.10.002>.
41. Grefen L, König F, Grab M, Hagl C, Thierfelder N. Pericardial tissue for cardiovascular application: an in-vitro evaluation of established and advanced production processes. *J Mater Sci Mater Med*. 2018;29(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-018-6186-6>.
42. Botes L, Laker L, Dohmen PM, van den Heever JJ, Jordaan CJ, Lewies A, Smit FE. Advantages of decellularized bovine pericardial scaffolds compared to glutaraldehyde fixed bovine pericardial patches demonstrated in a 180-day implant ovine study. *Cell Tissue Bank*. 2022 Jan 17. doi: 10.1007/s10561-021-09988-8.
43. Felzemburgh VA. Pericárdio bovino descelularizado no tratamento de queimadura. Dissertação de Mestrado em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas – Universidade Federal da Bahia; 2018.
44. Silva CF. Pericárdio bovino acelularizado no implante de prótese mamária em ratos. Salvador. Dissertação de Mestrado em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas – Unievrsidade Federal da Bahia; 2019.
45. Li Q, Gao Y, Zhang J, Tang Y, Sun Y, Wu L, et al. Crosslinking and functionalization of acellular patches via the self-assembly of copper@tea polyphenol nanoparticles. *Regen Biomater*. 2022;9(May).
46. Thampi P, Nair D, R. L, N. V, Venugopal S, Ramachandra U. Pathological effects of processed bovine pericardial scaffolds-a comparative in vivo evaluation. *Artif Organs*. 2013;37(7):600–5.
47. Lee S, Levy RJ, Christian AJ, Hazen SL, Frick NE, Lai EK, et al. Calcification and oxidative modifications are associated with progressive bioprosthetic heart valve dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(5):1–13.
48. Li KYC. Bioprosthetic Heart Valves: Upgrading a 50-Year Old Technology. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6(April):1–6.

49. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, Tornos P, Vanoverschelde JL, Vermeer F, Boersma E, Ravaud P, Vahanian A. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J* 2003; 24: 1231-1243 DOI: 10.1016/S0195-668X(03)00201-X.
50. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* 2006; 368: 1005-1011 DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69208-8.
51. Berry C, Lloyd SM, Wang Y, Macdonald A, Ford I. The changing course of aortic valve disease in Scotland: temporal trends in hospitalizations and mortality and prognostic importance of aortic stenosis. *Eur Heart J* 2013; 34: 1538-1547 DOI: 10.1093/eurheartj/ehs339].
52. Isaacs AJ, Shuhaiber J, Salemi A, Isom OW, Sedrakyan A. National trends in utilization and in-hospital outcomes of mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacements. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2015 May;149(5):1262-9.e3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022522315001142>.
53. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Apr 30;63(4–5):242–68. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X11000123>.
54. Siddiqui RF, Abraham JR, Butany J. Bioprosthetic heart valves: modes of failure. *Histopathology*. 2009 Aug;55(2):135–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2008.03190>.
55. Human P, Zilla P. Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure. *Ann Thorac Surg*. 2001 May;71(5 Suppl):S385-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11388230>
56. Schoen FJ, Levy RJ, Piehler HR. Pathological considerations in replacement cardiac valves. *Cardiovasc Pathol* 1992;1:29-52.
57. Akins CW, Hilgenberg AD, Vlahakes GJ, MacGillivray TE, Torchiana DF, Madsen JC. Results of bioprosthetic versus mechanical aortic valve replacement performed with concomitant coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*. 2002 Oct ;74(4):1098–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12400752>.
58. Dürrleman N, Pellerin M, Bouchard D, et al. Prosthetic valve thrombosis: twenty-year experience at the Montreal Heart Institute. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:1388-92.
59. Hart EA, Jansen R, Meijs TA, et al. Anticoagulant bridging in left-sided mechanical heart valve patients. *Int J Cardiol* 2017;232:121-6.
60. Al-Lawati AA, Venkitraman M, Al-Delaime T, et al. Pregnancy and mechanical heart valves replacement; dilemma of anticoagulation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:223-7.
61. Larsen SH, Houliind K, Hansen OK, et al. Medium-term follow-up of mechanical valves inserted in children. *Cardiol Young* 2006;16:579-85.

62. Bjoerk VO, Hultquist G. Teflon and pericardial aortic valve prostheses. *J thorac cardiovasc surg.* 1964 Jun;47:693–701. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14174962>.
63. Manji RA, Menkis AH, Ekser B, Cooper DKC. Porcine bioprosthetic heart valves: The next generation. *Am Heart J.* 2012 Aug;164(2):177–85. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002870312003675>.
64. Maestro MM, Turnay J, Olmo N, et al. Biochemical and mechanical behavior of ostrich pericardium as a new biomaterial. *Acta Biomater* 2006;2:213–9.
65. Rassoli A, Fatourae N, Guidoin R. Structural Model for Viscoelastic Properties of Pericardial Bioprosthetic Valves. *Artif Organs.* 2018;42(6):630–9.
66. Schoen FJ. Evolving Concepts of Cardiac Valve Dynamics: The Continuum of Development, Functional Structure, Pathobiology, and Tissue Engineering. *Circulation.* 2008 Oct 28;118(18):1864–80. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.805911>.
67. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: Progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(3):1072–80.
68. Holt, J.P., 1970. The normal pericardium. *Am. J. Cardiol.* 26 (5), 455–465 (Epub 1970/11/01).
69. Dee U. Silverthorn. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada.* 2. ed. São Paulo: a Manole; 2003.
70. G.T. Popa and E. Lucinescu. *Pericardium and Heart.* *J. Anat., Lond.,* 67:78, 1932.
71. Khor, E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials,* v.18, p.95-105, 1997.
72. Lawrence F. Brass and Howard B. Bensusan; The Role of Collagen Quaternary Structure in the Platelet:Collagen Interaction; *J Clin Invest.* 1974 December; 54(6): 1480–1487. doi: 10.1172/JCI107896.
73. Daamen, W. F.; Nillesen, S. T. M.; Hafmans, T.; Veerkamp J. H.; Luyn, M. J. A.; Kuppevelt, T. H. Tissue response of defined collagen-elastin scaffolds in young and adult rats with special attention to calcification. *Biomaterials,* v.26, p.81-92, 2005.
74. Lee, C. H.; Singla, A.; Lee, Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharma.* 2001;221:1-22.
75. Faraj, K. A.; Kuppevelt, T. H.; Daamen, W. F. Construction of collagen scaffolds that mimic the three-dimensional architecture of specific tissues. *Tissue Eng.* 2007;13:2387-94.
76. Eckert CE, Fan R, Mikulis B, Barron M, Carruthers CA, Friebe VM, et al. On the biomechanical role of glycosaminoglycans in the aortic heart valve leaflet. *Acta Biomater.*

- 2013 Jan;9(1):4653–60. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706112004680>.
77. Bowes, J. H.; Cater, C. W. The reaction of glutaraldehyde with proteins and other biological materials. *J. Microsc.* 1965;85:193-200.
78. Bracaglia LG, Fisher JP. Extracellular Matrix-Based Biohybrid Materials for Engineering Compliant, Matrix-Dense Tissues. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(16):2475–87.
79. Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Levy RJ. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *Am J Pathol.* 1987;127(1):122–30. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1899585&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
80. Human P, Zilla P. Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure. *Ann Thorac Surg.* 2001 May;71(5 Suppl):S385-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11388230>.
81. Rocha AO, Barros HP, Fazan VPS. *Técnicas anatômicas*. São Paulo: SBA; 2020.
82. Park S, Kim SH, Lim HG, Lim C, Kim YJ. The anti-calcification effect of dithiobispropionimide, carbodiimide and ultraviolet irradiation cross-linking compared to glutaraldehyde in rabbit implantation models. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;46(1):1–13.
83. Jing L et al. Curcumin-crosslinked acellular bovine pericardium for the application of calcification inhibition heart valves. *Biomed. Mater.* in press. 2020. Available from: <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab6f46>.
84. Park CS, Kim YJ, Lee JR, Lim H-G, Chang J-E, Jeong S, et al. Anticalcification effect of a combination of decellularization, organic solvents and amino acid detoxification on glutaraldehyde-fixed xenopericardial heart valves in a large-animal long-term circulatory model. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2017;25(May):391–9. Available from: <https://academic.oup.com/icvts/article-lookup/doi/10.1093/icvts/ivx13>.
85. Polak R, Pitombo RNM. Care during freeze-drying of bovine pericardium tissue to be used as a biomaterial: A comparative study. *Cryobiology.* 2011;63(2):61–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.05.001>.
86. Nimni ME, Myers D, Ertl D, Han B. Factors which affect the calcification of tissue-derived bioprostheses. *J Biomed Mater Res.* 1997 Jun 15;35(4):531–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9189831>.
87. Gong G, Ling Z, Seifert E, Factor SM, Frater RW. Aldehyde tanning: the villain in bioprosthetic calcification. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1991;5(6):288–99; discussion 293. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1908254>.

88. Goissis G, Braile D, Araujo RB, Ramirez VA. Reticulação progressiva de pericárdio bovino com glutaraldeído para confecção de válvulas cardíacas biológicas. *Polímeros*. Jun1998. DOI: 10.1590/S0104-14281998000200008
89. Simionescu DT. Prevention of calcification in bioprosthetic heart valves: challenges and perspectives. *Expert Opin Biol Ther*. 2004 Dec 22;4(12):1971–85. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.4.12.1971>
90. Salgaller ML, Bajpai PK. Immunogenicity of glutaraldehyde-treated bovine pericardial tissue xenografts in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1985;19:1-12.
91. Sadowski J, Bartuś K, Kapelak B, Chung A, Stapor M, Bochenek M. Aortic valve replacement with a novel anti-calcification technology platform. *Kardiol Pol*. 2015 May 20;73(5):317–22. Available from: <http://ojs.kardiologiapolska.pl/kp/article/view/9061>.
92. Jorge-herrero E, Fernández P, Turnay J, Olmo N, Calero P, García R, Freile I, Castillo-olivares JL. Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. *Biomaterials*. 1999;20:539-45.
93. Chapman JA, Tzaphlidou M, Meek KM, Kadler KE. The collagen fibril--a model system for studying the staining and fixation of a protein. *Electron Microsc Rev*. 1990;3(1):143–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715773>.
94. Bouten C, Driessen-Mol A, Baaijens FPT. In situ heart valve tissue engineering: simple devices, smart materials, complex knowledge, *Expert Rev. Med. De-vices*. 2012; 9:453–5. DOI 10.1586/erd.12.43.
95. Osnabrugge RLJ, Mylotte D, Head SJ, Van Mieghem NM, Nkomo VT, LeReun CM, Bogers AJCC, Piazza N, Kappetein AP. Aortic stenosis in the elderly, *J. Am. Coll. Cardiol*. 62 (2013) 1002–1012. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.015.
96. Whelan A, Williams E, Nolan DR, Murphy B, Gunning PS, O'Reilly D, Lally C. Bovine Pericardium of high fibre dispersion has high fatigue life and increased collagen content; potentially an untapped source of heart valve leaflet tissue, *Ann. Biomed. Eng.*2000;49:1022–32. doi: 10.1007/ s10439- 020- 02644- 4.
97. Vyavahare N, Ogle M, Schoen FJ, Zand R, Gloeckner DC, Sacks M, et al. Mechanisms of bioprosthetic heart valve failure: fatigue causes collagen denaturation and glycosaminoglycan loss. *J Biomed Mater Res*. 1999 Jul;46(1):44–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10357134>
98. Hammermeister, K., Sethi, G.K., Henderson, W.G., Grover, F.L., Oprian, C., Rahimtoola, S.H., 2000. Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial. *J. Am. Coll. Cardiol*. 36 (4), 1152–8.
99. Meuris B. Calcification of Aortic Wall Tissue in Prosthetic Heart Valves: Initiation, Influencing Factors and Strategies Towards Prevention. 2007. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/7768242>.

100. D'Alessandro CC, Komninou MA, Badria AF, Korossis S, Koutsoukos P, Mavrilas D. Calcification Assessment of Bioprosthetic Heart Valve Tissues Using an Improved in Vitro Model. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2020;67(9):2453–61.
101. Sellaro TL, Hildebrand D, Lu Q, Vyavahare N, Scott M, Sacks MS. Effects of collagen fiber orientation on the response of biologically derived soft tissue biomaterials to cyclic loading. *J Biomed Mater Res A.* 2007 Jan;80(1):194–205. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30871>.
102. Rucker RB. Calcium binding to elastin. *Adv Exp Med Biol.* 1974;48(0):185–209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4372871>.
103. Chandy T, Vasudev SC, Rao GHR. Changes in pericardial calcification due to antiplatelet agents: In vitro studies. *Artif Organs.* 1998;22(8):666–71.
104. Chiang YP, Chikwe J, Moskowitz AJ, Itagaki S, Adams DH, Egorova NN. Survival and long-term outcomes following bioprosthetic vs mechanical aortic valve replacement in patients aged 50 to 69 years. *JAMA.* 2014 Oct 1;312(13):1323–9. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2014.12679>.
105. Thubrikar MJ, Deck JD, Aouad J, Nolan SP. Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves. *J Thorac. Cardiovasc. Surg.* 86 (1983) 115–125 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6865456>. Accessed August 21, 2018.
106. Manji RA, Lee W, Cooper DKC (2015) Xenograft bioprosthetic heart valves: past, present and future. *Int J Surg* 23:280–284.
107. Manji RA, Hara H, Cooper DK (2015) Characterization of the cellular infiltrate in bioprosthetic heart valves explanted from patients with structural valve deterioration. *Xenotransplantation* 22:406–407.
108. Capoulade R, Chan KL, Yeang C, et al. Oxidized phospholipids, lipoprotein(a), and progression of calcific aortic valve stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2015;66:1236–46.
109. Chang HW, Kim SH, Kim K-H, Kim YJ. Combined anti-calcification treatment of bovine pericardium with amino compounds and solvents. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2011 Jun 1;12(6):903–7. Available from: <https://academic.oup.com/icvts/article-lookup/doi/10.1510/icvts.2010.259747>.
110. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011 Apr;32(12):3233–43. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211000895>.
111. Jamieson WR, Munro AI, Miyagishima RT, Allen P, Burr LH, Tyers GF. Carpentier-Edwards standard porcine bio-prosthesis: clinical performance to seventeen years. *Ann Thorac Surg* 1995;60:999–1006.
112. Liao KK, Li X, John R, Amatya DM, Joyce LD, Park SJ, Bianco R, Morton R, Iii B. Mechanical stress: an independent determinant of early bioprosthetic calcification in humans, (2008). [10.1016/j.athoracsur.2008.03.061](https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2008.03.061).

113. Hodde J, Hiles M. Constructive soft tissue remodelling with a biologic extracellular matrix graft: Overview and review of the clinical literature. *Acta Chir Belg.* 2007;107(6):641–7.
114. Johnston DR, Soltesz EG, Vakil N, Rajeswaran J, Roselli EE, Sabik JF, et al. Long-term durability of bioprosthetic aortic valves: implications from 12,569 implants. *Ann Thorac Surg.* 2015 Apr;99(4):1239–47. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003497514020918>.
115. Rao KP, Shanthi C. Reduction of calcification by various treatments in cardiac valves. *J Biomater Appl.* 1999 Jan;13(3):238–68. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/088532829901300305>.
116. Kim KM. Cellular mechanism of calcification and its prevention in glutaraldehyde treated vascular tissue. *Z Kardiol* 2001;90 Suppl 3:99-105.
117. Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, Pikula S, Azzar G, Radisson J, Bandorowicz-Pikula J, Buchet R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim. Pol.*2003;50:1019-38.
118. Schoen FJ, Levy RJ, Nelson AC, Bernhard WF, Nashef A, Hawley M. Onset and progression of experimental bioprosthetic heart valve calcification. *Lab Invest* 1985 May;52(5):523-32.
119. Marinho E, Carbonari RC, Malmonge SM, Leão CR. Mechanical behavior of bovine pericardium treated with hyaluronic acid derivative for bioprosthetic aortic valves. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2019;107(7):2273–80.
120. Simionescu DT, Lovekamp JJ, Vyavahare NR. Glycosaminoglycan-degrading enzymes in porcine aortic heart valves: implications for bioprosthetic heart valve degeneration. *J Heart Valve Dis* 2003;12:217-25.
121. Valente M, Bortolotti U, Thiene G. Ultrastructural substrates of dystrophic calcification in porcine bioprosthetic valve failure. *Am J Pathol* 1985 Apr;119(1):12-22
122. Bailey MT, Pillarisetti S, Xiao H, Vyavahare NR. Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Jul 1;66(1):93-102.
123. Lee JS, Basalyga DM, Simionescu A, Isenburg JC, Simionescu DT, Vyavahare NR. Elastin calcification in the rat subdermal model is accompanied by up-regulation of degradative and osteogenic cellular responses. *Am J Pathol* 2006 Feb;168(2):490-8.
124. LaBella FS, Vivian S, Thornhill DP. Amino acid composition of human aortic elastin as influenced by age. *J Gerontol.* 1966 Oct;21(4):550-5.
125. Jorge-Herrero E, Garcia Paez JM, Del Castillo-Olivares Ramos JL. Tissue heart valve mineralization: Review of calcification mechanisms and strategies for prevention. *J Appl Biomater Biomech.*2005;3(2):67–82.

126. Ha T-K, Her N-G, Lee M-G, Ryu B-K, Lee J-H, Han J, et al. Caveolin-1 increases aerobic glycolysis in colorectal cancers by stimulating HMGA1-mediated GLUT3 transcription. *Cancer Res.* 2012 Aug 15;72(16):4097–109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22706202>.
127. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* 2004;37(5):790–6, 798–802.
128. Zilla P, Fullard L, Trescony P, Meinhart J, Bezuidenhout D, Gorlitzer M, et al. Glutaraldehyde detoxification of aortic wall tissue: a promising perspective for emerging bioprosthetic valve concepts. *J Heart Valve Dis.* 1997;6(5):510–20.
129. Manji RA, Zhu LF, Nijjar NK, Rayner DC, Korbitt GS, Churchill TA, et al. Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection. *Circulation* 2006;114(4):318–27.
130. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials.* 2000 Nov;21(22):2215–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11026628>.
131. Lei Y, Deng L, Tang Y, Ning Q, Lan X, Wang Y. Hybrid Pericardium with VEGF-Loaded Hyaluronic Acid Hydrogel Coating to Improve the Biological Properties of Bioprosthetic Heart Valves. *Macromol Biosci.* 2019;19(6):1–9.
132. Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Roberts WC: Structure of bovine parietal pericardium and of unimplanted Ionescu-Shiley pericardial valvular bioprostheses. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981, 81:747-757.
133. Chanda J, Kuribayashi R, Abe T. Prevention of calcification in glutaraldehyde-treated porcine aortic and pulmonary valves. *Ann Thorac Surg.* 1997 Oct;64(4):1063–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9354528>.
134. Bailey KM, Liu J, Virginia W. Caveolin-1 Up-regulation during Epithelial to Mesenchymal Transition Is Mediated by Focal Adhesion Kinase *. *J Biol Chem [Internet].* 2008 May 16 [cited 2014 Jun 10];283(20):13714–24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2376249&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
135. Meuris B, Verbeken E, Flameng W. Prevention of porcine aortic wall calcification by acellularization: necessity for a non-glutaraldehyde-based fixation treatment. *J Heart Valve Dis.* 2005 May;14(3):358-63-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15974531>.
136. Brizard CP, Brink J, Horton SB, Edwards GA, Galati JC, Neethling WM. New engineering treatment of bovine pericardium confers outstanding resistance to calcification in mitral and pulmonary implantations in a juvenile sheep model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;148:3194–201.

137. Konakci KZ, Bohle B, Blumer R, Hoetzenecker W, Roth G, Moser B et al. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur J Clin Invest* 2005;35:17–23.
138. Naso F, Stefanelli U, Buratto E, Lazzari G, Perota A, Galli C et al. Alpha-gal inactivated heart valve bioprostheses exhibit an anti-calcification propensity similar to knockout tissues. *Tissue Eng Part A* 2017;23: 1181–95.
139. Parmaksiz M, Dogan A, Odabas S, et al. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed Mater.* 2016;11:1 - 14.
140. Vorotnikova E, Mcintosh D, Dewilde A, et al. Extracellular matrix derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biol.* 2010;29:690-700.
141. Thiene G, Valente M. Anticalcification strategies to increase bioprosthetic valve durability. *J Heart Valve Dis.* 2011 Jan;20(1):37–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21404896>.
142. Bet, M. R.; Goissis, G.; Vargas, S.; Selistre, H. S. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. *Biomaterials.*2003;24:131-7.
143. Jorge-herrero E, Fonseca C, Barge AP, Turnay J, Olmo N, Fernández P, et al. Biocompatibility and Calcification of Bovine Pericardium Employed for the Construction of Cardiac Bioprostheses Treated With Different Chemical Crosslink Methods. 2010;34(5):168–76.
144. Goissis G, de Fátima Giglioti A, Braile DM. Preparation and characterization of an acellular bovine pericardium intended for manufacture of valve bioprostheses. *Artif Organs.* 2011;35(5):484–9.
145. Li M, Mondrinos MJ, Chen X, Gandhi MR, Ko FK, Lelkes PI. Elastin Blends for Tissue Engineering Scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A.* 2006;79(4):963–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16948146>
146. Jang W, Choi S, Kim SH, Yoon E, Lim HG, Kim YJ. A comparative study on mechanical and biochemical properties of bovine pericardium after single or double crosslinking treatment. *Korean Circ J.* 2012;42(3):154–63.
147. Luo Y, Huang S, Ma L. A novel detergent-based decellularization combined with carbodiimide crosslinking for improving anti-calcification of bioprosthetic heart valve. *Biomed Mater.* 2021 May 24;16(4). doi: 10.1088/1748-605X/ac0088. PMID: 33979785.
148. Mirnajafi A, Zubiato B, Sacks MS. Effects of cyclic flexural fatigue on porcine bioprosthetic heart valve heterograft biomaterials. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 94(1):205–13. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32659>

149. Nina VJS et al. Endotelização in vivo das biopróteses cardíacas: preservação convencional versus não-aldeídica. *Rev. Bras. Cir Cardiovas.* 2004; 19(2):144-151.
150. X. Ye, H. Wang, J. Zhou, H. Li, J. Liu, Z. Wang, A. Chen, Q. Zhao. The effect of Heparin-VEGF multilayer on the biocompatibility of decellularized aortic valve with platelet and endothelial progenitor cells. *Rev PLoS One* 2013; 8, e54622.
151. Jeong S, Yoon EJ, Lim HG, Sung SC, Kim YJ. The Effect of Space Fillers in the Cross-Linking Processes of Bioprosthesis. *Biores Open Access.* 2013;2(2):98–106. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/biores.2012.0289>.
152. Badria A, Koutsoukos P, Korossis S, Mavrilas D. The effect of heparin hydrogel embedding on glutaraldehyde fixed bovine pericardial tissues: Mechanical behavior and anticalcification potential. *J Mater Sci Mater Med.* 2018;29(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-018-6184-8>.
153. Sharma CP, Hari PR. The effect of anesthetics and analgesics on protein adsorption, platelet adhesion, and plasma recalcification time at blood-polymer interface. *Artif Organs* 1991; 15:498–506.
154. Packham MA. Platelet function inhibitors. *Thromb Haemost (Stuttgart)* 1983;50:610–9.
155. Sinha P, Zurakowski D, Susheel Kumar TK, He D, Rossi C, Jonas RA. Effects of glutaraldehyde concentration, pretreatment time, and type of tissue (porcine versus bovine) on postimplantation calcification. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;143(1):224–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2011.09.043>.
156. FRIESS, W. Collagen: biomaterial for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998;45:113-36.
157. VARDAXIS, N. J.; BOON, M. E.; RUIJGROK, J. M. Calcification of cross-linked collagen-elastin membrane implants *in vivo* and their proposed use bone regeneration. *Biomaterials.* 1996;17:1489-97.
158. Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., Badylak, S.F., 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006;27 (19):3675–83.
159. GOISSIS, G.; BRAILE, D. M.; GIGLIOTI, A. F. Desenvolvimento de processo automático para a reticulação progressiva de matrizes de colágeno com glutaraldeído. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 1999;92-97.
160. GOISSIS, G.; LACERDA, C.; BARBOSA, M. P.; PINATTI, A. Surface tension control of collagen biomaterials by the selective hydrolysis of internal carboxyamides of the protein matrix. *Rev. Bras. Eng. Biomed.*, v.15, p.55-61, 1999.
161. Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, Howard SL, Oshry LJ. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. *Am J Pathol.* 1983 Nov;113(2):143–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6605687>.

162. Rosa GRS, Costa FDA, Vilani RGDC, Souza FP, Reichert L, Costa ISEA. Use of ethanol in preventing calcification of porcine pulmonar heterograft: experimental study in sheep. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2006;21(3):304–13.
163. Grimm M, Eybl E, Grabenwoger M, Griesmacher A, Bock P, Muller MM, et al. Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium. An in vitro and in vivo approach toward improvement of bioprosthetic heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991;102(2):195–201.
164. Grabenwoger M, Grimm M, Eybl E, Leukauf C, Muller MM, Plenck H Jr, et al. Decreased tissue reaction to bioprosthetic heart valve material after L-glutamic acid treatment. A morphological study. *J Biomed Mater Res.* 1992;26(9):1231–40.
165. Girardot JM. Prevention of prosthesis calcification. U.S. Patent No. 4,976,733. December 11, 1990.
166. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* 2004;37(5):790–6, 798–802.
167. Yoshioka SA, Goissis G. Thermal and spectrophotometric studies of new crosslinking method for collagen matrix with glutaraldehyde acetals. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(3):1215–23.
168. Meng Z, Li Z, Zhang E, Zhang L, Liu Q, Wu Y. Sevelamer Attenuates Bioprosthetic Heart Valve Calcification. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8(Sep.):1–11.
169. Arruda Filho MB, Aguiar LD, Marques SR de B, Cavalcanti LRP, Sá MPBO. Oral use of phenytoin to reduce calcification in bovine pericardium and porcine aortic leaflets implants in rats. *Brazilian J Cardiovasc Surg.* 2021;36(3):295–300.
170. Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis* 2007;16:567-73; discussion 573-4.
171. Lim HG, Kim SH, Choi SY, et al. Anticalcification effects of decellularization, solvent, and detoxification treatment for genipin and glutaraldehyde fixation of bovine pericardium. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012;41:383-90.
172. Naso F, Gandaglia A, Iop L, et al. First quantitative assay of alpha-Gal in soft tissues: presence and distribution of the epitope before and after cell removal from xenogeneic heart valves. *Acta Biomater* 2011;7:1728-34.
173. Kluin J et al. In situ heart valve tissue engineering using a bioresorbable elastomeric implant – From material design to 12 months follow-up in sheep. *Biomaterials* 125, 101–117 (2017). PubMed: 28253994.

ANEXO



Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO TEMPO DE TRATAMENTO COM GLUTARALDEÍDO EM BIOPRÓTESES CARDÍACAS DE PERICÁRDIO BOVINO: ESTUDO EXPERIMENTAL DE EQUIVALÊNCIA", protocolada sob o CEUA nº 9262310518, sob a responsabilidade de **Fabiana Palm Rosa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde) (CEUA/ICS.UFBA) na reunião de 22/10/2018.

We certify that the proposal "EFFECTS OF TREATMENT TIME WITH GLUTARALDEIHO IN BOVINE PERICARDIAL CARDIAC BIOPROTHES: AN EQUIVALENCE EXPERIMENTAL STUDY", utilizing 50 Heterogenics rats (50 males), protocol number CEUA 9262310518, under the responsibility of **Fabiana Palm Rosa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Bahia (Health Sciences Institute) (CEUA/ICS.UFBA) in the meeting of 10/22/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **02/2019 a 08/2019** Área: **Biotecnologia**

Origem: **SUPRILAB SUPRIMENTO DE LABORATORIO E BIOTERIO LTDA**

Espécie: **Ratos heterogênicos** sexo: **Machos** idade: **2 a 3 meses** N: **50**

Linagem: **Rattus norvegicus. Wistar** Peso: **250 a 300 g**

Local do experimento: **FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA - UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA.**

Salvador, 21 de janeiro de 2019

Dra. Luciana Lyra Casais-e-Silva

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)

MSc. Marcos Borges Ribeiro

Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)



Comissão de Ética no Uso de Animais

Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



Salvador, 21 de maio de 2020
CEUA N 9262310518

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Fabiana Paim Rosa
Área: Biotecnologia

Título da proposta: "EFEITOS DO TEMPO DE TRATAMENTO COM GLUTARALDEÍDO EM BIOPRÓTESES CARDÍACAS DE PERICÁRDIO BOVINO: ESTUDO EXPERIMENTAL DE EQUIVALÊNCIA".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICS.UFBA (ID 000014)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 20/abril/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicito aumento do "n" amostral de 50 animais para 75 animais. A ampliação do número de animais permitirá a criação de um grupo experimental adicional para estudo de implantes acelularizados, visando compará-los com implantes celularizados de pericárdio bovino empregados originalmente em nosso estudo. Acreditamos que tal alteração pode aumentar a robustez do presente projeto que está vinculado a uma tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos órgãos e sistemas da aluna Raísa Cavalcante Dourado. "

Comentário da CEUA: " O projeto original pretende avaliar os efeitos da redução do tempo de tratamento do pericárdio bovino em glutaraldeído, utilizando 10 grupos com 05 animais cada, totalizando 50 animais. O pedido de aditivo para acréscimo de 25 animais para a composição de um grupo que não receberá o pericárdio bovino. O projeto é de grande relevância para compreensão do tempo mínimo necessário para a utilização do glutaraldeído nas biopróteses cardíacas e, dessa forma reduzir a formação de calcificação, prolongando o tempo útil da válvula. Os animais serão mantidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal. O acréscimo do grupo experimental irá aumentar a credibilidade da pesquisa, permitindo a comparação dos efeitos nos tecidos com a presença do pericárdio bovino (PB) com os que não receberam o PB. Diante do exposto, emito parecer favorável. Em tempo lembramos que na reunião plenária de setembro de 2019 este projeto passou para a coordenação do Professor Dr. Márcio Cajazeira Aguiar, em consequência ao afastamento, por motivo de saúde, da Professora Dra. Fabiana Paim Rosa. Na oportunidade solicitamos ao novo coordenador atualização do cronograma de atividades para renovação da vigência deste projeto. "

Dr. Marcos Borges Ribeiro
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)

Dra. Deboraci Brito Prates
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>