

Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído: comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos

Anti-calcifying treatment of glutaraldehyde fixed bovine pericardium: comparisons and evaluation of possible synergic effects

José Augusto BAUCIA¹, Ricardo Mendes LEAL NETO², José Roberto ROGERO², Nanci do NASCIMENTO²

RBCCV 44205-814

Resumo

Objetivo: Avaliar possível efeito sinérgico dos agentes anticalcificantes mais promissores investigados na literatura, por meio de tratamento seqüencial.

Método: Pericárdios bovinos fixados com glutaraldeído foram tratados com: aquecimento a 50°C, éter dietílico 80%, quitosana 0,125%, heparina, NaBH₄ e formaldeído 4%. Amostras foram avaliadas pela microscopia óptica, determinação da temperatura de desnaturação do colágeno e ensaio mecânico de tração e implantadas subcutaneamente em ratos. Após quatro meses do implante, as amostras foram explantadas e o conteúdo de Ca²⁺ determinado pela espectrometria de absorção atômica.

Resultados: Níveis de Ca²⁺ (em µg/mg): Controle -194,45;

aquecimento a 50°C - 6,87; éter dietílico - 3,69; quitosana - 68,89; quitosana+heparina - 6,81; formaldeído - 107,34; tratamento seqüencial - 0,17. O comportamento mecânico variou de acordo com os tratamentos empregados.

Conclusão: O tratamento seqüencial foi efetivo na inibição da calcificação e o tecido apresentou comportamento mecânico adequado à confecção de biopróteses.

Descritores: Bioprótese. Glutaral. Calcinose.

Abstract

Objective: To evaluate a possible synergic effect of the most promising anti-calcifying agents investigated in literature by sequential treatment.

1- Doutor. Cirurgião Cardiovascular.

2 - Doutor. Professor e Pesquisador do IPEN – USP.

Trabalho realizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) - Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Endereço para correspondência:

José Augusto Baucia. Rua Joaquim Cruz Rios Filho, 212. Praia Ipitanga. Lauro de Freitas, BA. CEP: 42700-000. Tel/Fax: (71) 3378-3170. E-mail: jabaucia@hotmail.com

Artigo recebido em outubro de 2005
Artigo aprovado em maio de 2006

Method: Glutaraldehyde-fixed bovine pericardium was treated by: heating to 50°C, 80% ether, 0.125% chitosan, heparin, NaBH₄ and 4% formaldehyde. Samples were evaluated by optic microscopy, shrinking and mechanical tests and implanted subcutaneously in rats. Four months later the samples were explanted and Ca²⁺ levels measured by atomic absorption spectroscopy.

Results: Ca²⁺ levels were (in µg/mg): control - 194.45; heating at 50°C - 6.87; ether - 3.69; chitosan - 68.89; heparin

- 6.81; formaldehyde - 107.34; sequential treatment - 0.17. The mechanical characteristics changed according to the treatments employed.

Conclusion: Sequential treatment was effective to inhibit calcification and the tissue showed an adequate mechanical structure for the manufacture of bioprosthesis.

Descriptors: Bioprosthesis. Glutaral. Calcinosi.

INTRODUÇÃO

Os tecidos biológicos utilizados na confecção de biopróteses cardíacas compreendem a válvula aórtica porcina e o pericárdio bovino. Os tecidos colágenos, entretanto, apresentam rápida degradação e necessitam ser estabilizados, com objetivo de prolongar a estrutura e integridade mecânica original e remover ou neutralizar as suas propriedades antigênicas, para que possam ser empregados como biomateriais.

Diversos agentes químicos foram utilizados no tratamento de tecidos colágenos [1-6], entretanto, o glutaraldeído, introduzido por Carpentier [7], no final dos anos 60, continua sendo o mais largamente empregado.

Embora o tratamento com glutaraldeído forneça tecido biológico adequado à confecção de biopróteses, a calcificação tardia pós-implante constitui a causa predominante de sua falência e continua sendo o grande desafio dos nossos dias.

O estudo da calcificação e meios para controlá-la ou postergá-la têm sido o foco de muitas pesquisas nas últimas duas décadas, apresentando vários possíveis candidatos efetivos em interromper ou retardar uma ou mais etapas do processo, em pequenos animais de experimentação [8-30].

O objetivo do presente experimento é avaliar possível efeito sinérgico dos agentes anticalcificantes descritos na literatura, por meio de tratamento seqüencial. Por seqüencial entende-se a exposição sucessiva do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído a diversos agentes anticalcificantes.

MÉTODO

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

A primeira foi a avaliação dos efeitos anticalcificantes de diversos agentes, com mecanismos de ação diferentes,

no pericárdio bovino, que, pelo fato de ser submetido à mesma técnica de fixação com o glutaraldeído, permitiu análise comparativa, em termos quantitativos, dos níveis de Ca²⁺ pós-implante, bem como do seu comportamento mecânico.

A segunda foi a avaliação de possível efeito sinérgico entre os agentes anticalcificantes, por meio do tratamento seqüencial.

Um fluxograma da metodologia empregada é apresentado na Figura 1.

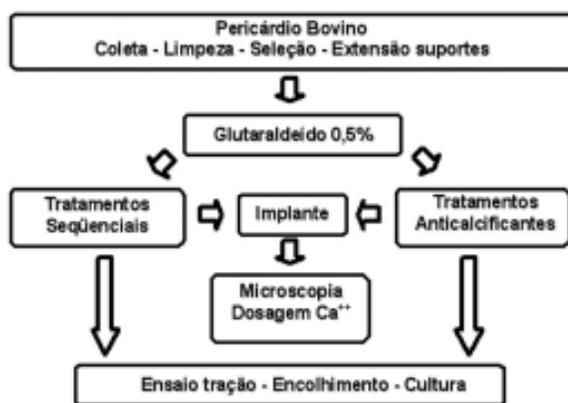


Fig. 1 - Fluxograma da metodologia empregada.

Tratamento do pericárdio bovino

O pericárdio bovino foi coletado em frigorífico, submetido à fiscalização do Departamento de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura e Departamento de Vigilância Sanitária da Secretaria de Saúde Estadual, imediatamente após o abate do animal. Vinte e quatro membranas, com espessura e homogeneidade similares, foram estendidas em suportes ovais plásticos e submetidas à ação fixadora do glutaraldeído em solução aquosa a 0,5%,

à 4°C, pH 7,4, com emprego de tampão fosfato, mantidas ao abrigo da luz durante 10 dias e com trocas da solução após 24 e 72 horas.

As membranas foram divididas em oito grupos, de acordo com o tratamento subsequente:

- Grupo 1 - Nenhum tratamento (constituiu o grupo controle);
- Grupo 2 - Tratamento térmico com temperatura constante de 50°C, em banho-maria, por dois meses;
- Grupo 3 - Éter dietílico 70%, pH 3,0, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, por 4 horas, com quatro trocas sucessivas;
- Grupo 4 - Solução de quitosana 0,125%, pH 6,0, à 4°C, por 72 horas;
- Grupo 5 - Solução de quitosana 0,125%, pH 6,0, à 4°C, por 72 horas, solução de heparina parcialmente despolimerizada 0,1%, pH 7,4, à 4°C, por 7 dias e solução de NaBH₄ 0,1M, pH 8,8, à temperatura ambiente por 24 horas;
- Grupo 6 - Solução de NaBH₄ 0,1M;
- Grupo 7 - Solução de formaldeído 4%, pH 5,0 à temperatura ambiente;
- Grupo 8 - Tratamento seqüencial, consistindo de temperatura constante à 50°C, em banho-maria, por dois meses; éter dietílico 70%, pH 3,0, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, por quatro horas, com quatro trocas sucessivas; solução de quitosana 0,125%, pH 6,0, à 4°C, por 72 horas, solução de heparina parcialmente despolimerizada 0,1%, pH 7,4, à 4°C, por 7 dias, solução de NaBH₄ 0,1M, pH 8,8, à temperatura ambiente por 24 horas e solução de formaldeído 4%.

Para eliminar os resíduos dos compostos químicos ao final de cada tratamento e entre os tratamentos seqüenciais, as membranas foram lavadas em solução de NaCl 0,9%, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, por 24 horas, com quatro trocas sucessivas. Os pericárdios foram mantidos em solução de NaCl 0,9%, com exceção do grupo 8 que foi mantido em solução de formaldeído 4%.

O formaldeído foi incluído nesta investigação porque as válvulas cardíacas de pericárdio bovino são conservadas em formaldeído 4%, após sua estabilização com o glutaraldeído.

Despolimerização parcial da heparina

O procedimento utilizado para a despolimerização parcial

da heparina foi o emprego de 31.500 UI de heparina e 10 mg de NaNO₂ em 1 L de solução salina de NaCl 0,9%; o pH foi inicialmente ajustado em 2,0, com a adição de HCl 1M, levado a reagir por uma hora, à 2°C, e ajustado subsequentemente em 7,4, com a adição de NaOH 1M. A solução foi mantida à temperatura ambiente.

Avaliação do pericárdio bovino

A avaliação da integridade bioquímica, estrutural e funcional do pericárdio fixado pré-implantado foi realizada por meio de:

- **Microscopia óptica:** amostras de cada grupo foram seccionadas, coradas pela Hematoxilina-Eosina e pelo método de Von Kossa e examinadas pela microscopia óptica;

- **Teste de encolhimento:** A temperatura de encolhimento abrupto das amostras, que é a requerida para liberar as pontes de H da tripla hélice e modificar aleatoriamente a configuração do colágeno, foi o método empregado para a determinação do grau de estabilização do tecido após a fixação. Temperaturas acima de 82°C asseguram fixação adequada do tecido. Cinco amostras de cada grupo, cortadas em tiras de 3,0 x 1,0 cm, foram imersas em banho-maria com solução salina de NaCl 0,9% e submetidas a uma tração de 0,5 g. A temperatura do banho-Maria foi elevada progressivamente, na razão de 4°C/min, até ocorrer o encolhimento abrupto da amostra.

- **Ensaio de tração:** Cinco amostras de cada grupo foram submetidas ao ensaio de tração, em máquina de ensaio INSTRON 4400R, para determinação do alongamento e tensão. As amostras foram cortadas em tiras de 3,0 x 0,4 cm, presas às pinças do aparelho e mantidas imersas em solução salina de NaCl 0,9%, à temperatura constante de 37°C. Uma força inicial de aproximadamente 0,5 g foi aplicada e o ensaio foi realizado com velocidade de deslocamento constante de 10 mm/min até o rompimento da amostra. Foram registradas curvas de força x deslocamento. Para o cálculo da tensão de tração, considerou-se a área inicial (largura x espessura) das amostras e o alongamento foi determinado pelo deslocamento das pinças do aparelho. Para determinar a espessura, as amostras foram colocadas entre duas lamínulas de vidro e a medição foi feita com paquímetro digital. O alongamento foi medido até o ponto equivalente à tensão máxima suportada pelo tecido e a resistência mecânica definida como sendo o valor de tensão máxima suportada. A curva selecionada para análise como representativa de cada grupo foi a que mais se aproximou do valor médio das tensões máximas. Tensões máximas acima de 17,6 N/mm² são consideradas adequadas.

Determinação quantitativa de Ca²⁺

Cinco amostras de cada grupo foram desidratadas em estufa a 50°C e mineralizadas em forno de Mufla a 800°C. As

amostras mineralizadas foram dissolvidas em HNO_3 2,5 M e enviadas para a determinação quantitativa do Ca^{2+} pela espectroscopia de absorção atômica com espectrômetro Perkin Elmer, modelo Analyst 100, no comprimento de onda de 422,7 nm. A curva de calibração foi obtida usando-se solução padrão Perkin Elmer de 1,000 mg/L, com adição de cloreto de lantânio a 1%. A quantidade total de Ca^{2+} foi expressa em mg por mg de tecido seco.

Implante em ratos

Vinte e quatro ratos Wistar, com idade média de 30 dias, foram utilizados no experimento. Os animais foram obtidos no biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, seguindo os princípios da Comissão de Ética em Pesquisa. As normas estabelecidas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) foram respeitados.

Os ratos foram anestesiados com éter dietílico 70%, tricotomizados e seis amostras do pericárdio bovino de cada grupo, medindo 2,0 x 1,5 cm, foram implantadas em lojas subcutâneas dissecadas na região dorsal dos ratos (duas por animal).

Decorridos 4 meses do implante, os animais foram sacrificados e as amostras explantadas dissecadas, retirando-se o tecido do hospedeiro e lavadas em solução salina de NaCl 0,9%.

Cinco amostras de cada grupo foram desidratadas, mineralizadas e dissolvidas em HNO_3 , de acordo com a técnica descrita, e encaminhadas para determinação quantitativa de Ca^{2+} e a restante foi preparada para avaliação pela microscopia óptica.

Análise estatística

Os dados foram calculados em média \pm desvio padrão da média. As diferenças entre os grupos foram testadas empregando-se o teste *t* de Student e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Microscopia óptica

A integridade estrutural do colágeno nas amostras pré-implante não diferiu entre os diversos grupos, observando-se a preservação de estrutura colágena homogênea. Nas amostras explantadas, pode-se avaliar a intensidade da calcificação do tecido em relação ao tratamento empregado. Foi observada variabilidade no depósito mineral entre os diversos grupos, entre animais do mesmo grupo e em menor escala em diferentes regiões da mesma amostra, identificando-se regiões onde o processo de calcificação foi mais acentuado do que em outras.

Na amostra submetida ao tratamento seqüencial, não foram identificados depósitos de cálcio (Figura 2).

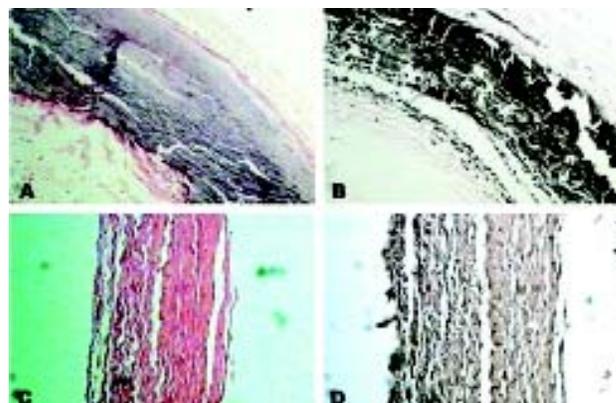


Fig. 2 - Micrografias das amostras de pericárdio bovino explantadas dos grupos controle e tratamento seqüencial. A. Grupo Controle - Hematoxilina-Eosina. B. Grupo Controle - Von Kossa. C. Tratamento Seqüencial - Hematoxilina-Eosina. D. Tratamento Seqüencial - Von Kossa. Aumento 80X.

Teste de encolhimento

Todas as amostras apresentaram valores de temperatura superiores a 82°C (valor considerado adequado para o pericárdio bovino fixado), indicando fixação adequada do tecido.

Análise mineral

Os resultados quantitativos de Ca obtidos nas amostras dos diversos grupos pós-implante são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Dosagem de Ca^{2+} , nas amostras pós-implante, obtida em função dos diversos tratamentos empregados

Tratamentos	Ca^{2+} ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	σ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Controle	194,45	19,50
Temperatura	6,87	2,35
Éter	3,69	1,26
Quitosana	68,89	57,01
Quitosana + heparina	6,81	3,17
Formaldeído	107,34	49,88
NaBH_4	79,43	52,43
Seqüencial	0,17	0,04

Comportamento mecânico

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

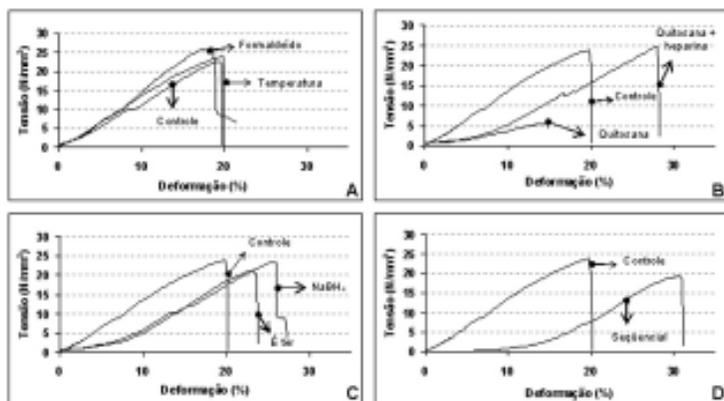


Fig. 3 - Curvas de tensão x deformação obtidas em função dos diversos tratamentos empregados.

DISCUSSÃO

Microscopia óptica

A variabilidade no depósito mineral observada entre os diversos grupos, entre animais do mesmo grupo e, em menor escala, em diferentes regiões da mesma amostra, reflete o observado na prática médica, onde uma porcentagem de válvulas cardíacas apresenta intensa calcificação anos após o implante, enquanto outras apresentam calcificações focais e mesmo ausência de depósitos de cálcio identificáveis pela microscopia óptica. A análise dos resultados, entretanto, não fica prejudicada por esta variabilidade, pois ela se reflete no desvio-padrão da média empregada na análise estatística.

Análise mineral

Temperatura: O tratamento térmico a 50°C foi efetivo na inibição da calcificação das amostras implantadas. A dosagem de Ca^{2+} foi de $6,87 \pm 2,35 \mu g/mg$ vs $194,45 \pm 19,50 \mu g/mg$ no grupo controle, valor este muito próximo ao observado por Carpentier et al. [25], em amostras submetidas ao tratamento térmico e explantadas após três meses do implante subcutâneo em ratos ($6,7 \pm 2,3 \mu g/mg$ vs $245,4 \pm 4 \mu g/mg$, no grupo controle).

Éter dietílico: O tratamento com éter etílico foi efetivo na inibição da calcificação das amostras implantadas. A dosagem de Ca^{2+} foi de $3,69 \mu g/mg \pm 1,26 \mu g/mg$ vs $194,45 \pm 19,50 \mu g/mg$, no grupo controle. Rossi et al. [21] estudaram os efeitos do éter sulfúrico acidificado na calcificação do pericárdio bovino, tratado inicialmente com glutaraldeído 2,5% por duas horas e seqüencialmente com glutaraldeído 0,5%, tamponado com fosfato 0,13M (pH 7,4), após implante subcutâneo em ratos por até 28 dias. Houve atenuação significativa da calcificação, comprovada por microscopia óptica, nas amostras tratadas com éter sulfúrico. O depósito

de cálcio após 28 dias do implante foi semelhante ao observado no grupo controle, após sete dias do implante.

Os resultados observados por microscopia óptica na presente investigação foram superiores aos obtidos por Rossi et al. [21], com ausência de depósitos de cálcio, após quatro meses do implante.

Quitosana: A dosagem de Ca^{2+} obtida nas amostras tratadas com quitosana foi significativamente menor que a do grupo controle ($68,89 \pm 57,01 \mu g/mg$ vs $194,45 \pm 19,50 \mu g/mg$, respectivamente). Chanda et al. [19] empregaram a quitosana 4%, por três dias, a 4°C no tratamento do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído 0,25% por cerca de dois meses. A dosagem de Ca^{2+} obtidas, após implante subcutâneo em ratos por até três meses, foi de $1,10 \pm 0,27 mg/g$ vs $200,8 \pm 17,5 mg/g$ no grupo controle.

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

Heparina: O comportamento anticalcificante da heparina depende do substrato de ligação intermediário utilizado, pois nem todos os compostos aminados reduzem igualmente a calcificação [14]. Como cada molécula de quitosana permite a ligação de múltiplas moléculas de heparina, seu emprego proporciona grande incorporação da heparina no tecido, o que aumenta o efeito estérico.

Como a reação entre os grupos aldeídos e os grupos amins da molécula de heparina leva à formação de bases de Schiff, que são instáveis, o $NaBH_4$ foi empregado com a finalidade de convertê-las em amins secundárias, mais estáveis.

Chanda et al. [26] utilizaram a heparina no pericárdio porcino tratado com concentrações crescentes de glutaraldeído (0,1 a 0,25%), a 37°C, por um mês. O substrato de ligação empregado foi a quitosana 0,1% e a gentamicina 0,015%, aplicadas ao tecido por uma semana à temperatura ambiente. O período de reação da heparina 0,1% com o tecido foi de uma semana, à temperatura ambiente. Os resultados obtidos após o implante subcutâneo em ratos por cinco meses demonstraram redução do conteúdo de Ca^{2+} no grupo submetido à heparina ($0,652 \pm 0,240 mg/g$), quando comparado ao grupo controle ($228,32 \pm 37,39 mg/g$).

A presente investigação confirmou os efeitos anticalcificantes da heparina com o emprego da quitosana como substrato de ligação. Uma constatação importante na análise dos resultados diz respeito à potencialização do efeito anticalcificante exercida pela incorporação da heparina ao pericárdio bovino tratado com a quitosana. Houve redução significativa nos níveis de Ca^{2+} do tecido tratado com quitosana com a adição da heparina ($68,89 \pm 57,01 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs $6,81 \pm 3,17 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente).

NaBH₄: A dosagem de Ca^{2+} com o emprego do NaBH₄ foi de $79,43 \pm 52,43 \mu\text{g}/\text{mg}$, comprovando seu efeito anticalcificante.

Na literatura, as referências ao emprego do NaBH₄ encontram-se associadas à incorporação da heparina ao tecido devido a sua capacidade de converter as instáveis bases de Schiff em aminas secundárias, mais estáveis. O emprego do NaBH₄ como único agente anticalcificante, embora não investigado anteriormente, justifica-se por sua propriedade em reduzir os grupos aldeídos livres na superfície do tecido a grupos hidroxilas, neutralizando-os.

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

A conservação em formaldeído 4% não foi devidamente valorizada em estudos anteriores da calcificação pós-implante. Gong et al. [30], embora não descrevendo as respectivas dosagens de Ca^{2+} , relataram menor calcificação com a conservação do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído 0,625% em formaldeído 4% por 24 horas, no implante em ratos por 70 dias. Essa diferença, entretanto, não foi estatisticamente significativa.

Tratamento Sequencial: Como a calcificação é um processo multifatorial, no tratamento sequencial, foram empregados agentes anticalcificantes com diferentes mecanismos de ação.

A dosagem de Ca^{2+} pós-implante confirmou o efeito sinérgico dos agentes anticalcificantes empregados ($0,17 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{mg}$ no tratamento sequencial vs $194,45 \pm 19,50 \mu\text{g}/\text{mg}$, no grupo controle).

Comportamento mecânico

Na análise do comportamento mecânico das amostras submetidas aos diversos tratamentos anticalcificantes, deve ser levada em conta a sua finalidade. Assim, genericamente, maior alongação e maior resistência mecânica do tecido são desejáveis à confecção de válvulas cardíacas.

O tratamento térmico não alterou significativamente o comportamento mecânico do tecido, sendo considerado adequado. A deformação e a resistência mecânica foram similares ao observado no grupo controle (Figura 3A)

A amostra tratada com o formaldeído foi considerada adequada. Apresentou deformação semelhante ao grupo controle e uma maior resistência mecânica (Figura 3A). Enquanto, a amostra tratada com quitosana apresentou comportamento mecânico inadequado. Embora tenha ocorrido aumento na deformação, houve grande redução na resistência mecânica quando comparado ao grupo controle (Figura 3B).

A incorporação de heparina acarretou diferenças significativas no comportamento mecânico do tecido. O comportamento mecânico foi considerado adequado, observou-se aumento, tanto na deformação, como na resistência mecânica, quando comparado ao grupo controle (Figura 3B).

Assim, a incorporação da heparina alterou significativamente o comportamento mecânico do tecido, transformando um tecido totalmente inadequado - o submetido exclusivamente a quitosana - em tecido com as melhores propriedades mecânicas aqui avaliadas.

A amostra submetida ao éter dietílico apresentou comportamento mecânico adequado. Houve aumento na deformação e discreta redução na resistência mecânica, quando comparado ao grupo controle (Figura 3C).

O comportamento mecânico da amostra tratada com o NaBH₄ foi considerado adequado. O seu emprego como único agente anticalcificante acarretou aumento na deformação da amostra, sem alterar a resistência mecânica, quando comparado ao grupo controle (Figura 3C).

O comportamento mecânico da amostra submetida ao tratamento sequencial foi considerado adequado (Figura 3D). A amostra apresentou maior deformação do que o observado no grupo controle e resistência mecânica superior a $17,6 \text{ N}/\text{mm}^2$ (valor considerado adequado para o pericárdio bovino fixado).

Embora a mineralização obtida experimentalmente em implantes subcutâneos seja similar à observada clinicamente em biopróteses explantadas, a extrapolação dos resultados deve ser realizada com a devida cautela, pois neste modelo o tecido não está sujeito ao estresse dinâmico e às interações com os elementos sanguíneos, fatores que comprovadamente influenciam na calcificação das biopróteses cardíacas.

CONCLUSÕES

O sinergismo almejado com o tratamento sequencial proposto realmente ocorreu. O tratamento foi efetivo em inibir a calcificação do pericárdio bovino tratado com

glutaraldeído, após 4 meses do implante subcutâneo em ratos e o tecido apresentou um comportamento mecânico adequado à confecção de válvulas cardíacas.

Outra constatação que pode ser depreendida pelo comportamento mecânico das amostras é a de que ensaios mecânicos devem ser incluídos rotineiramente na avaliação do pericárdio bovino, quando submetido a tratamentos anticalcificantes.

REFERÊNCIAS

1. Khor E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials*. 1997;18(2):95-105.
2. Cheung DT, Perelman N, Ko EC, Nimni ME. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissues. *Connect Tissue Res*. 1985;13(2):109-15.
3. Cheung DT, Tong D, Perelman N, Ertl D, Nimni ME. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde IV. In vitro and in vivo stability of a crosslinked collagen matrix. *Connect Tissue Res*. 1990;25(1):27-34.
4. Pereira CA, Lee JM, Haberer SA. Effect of alternative crosslinking methods on the low strain rate viscoelastic properties of bovine pericardial bioprosthetic material. *J Biomed Mater Res*. 1990;24(3):345-61.
5. Lee JM, Pereira CA, Kan LW. Effect of molecular structure of poly(glycidylether) reagents on crosslinking and mechanical properties of bovine pericardial xenograft materials. *J Biomed Mater Res*. 1994;28(9):981-92.
6. Moore MA, Bohachevsky IK, Cheung DT, Boyan BD, Chen WM, Bickers RR et al. Stabilization of pericardial tissue by dye-mediated photooxidation. *J Biomed Mater Res*. 1994;28(5):611-8.
7. Carpentier A. From valvular xenograft to valvular bioprosthesis (1965 - 1977). *Med Instrum*. 1977;11(2):98-101.
8. Jorge-Herrero E, Fernandez P, Gutierrez M, Castillo-Olivares JL. Study of the calcification of bovine pericardium: Analysis of implication of lipids and proteinoglycans. *Biomaterials*. 1991;12(7):683-9.
9. Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M. 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.
10. Bernacca GM, Dimitri WR, Fisher AC, Mackay TG, Wheatley DJ. Chemical modification of bovine pericardium and its effect on calcification in the rat subdermal model. *Biomaterials*. 1992;13(6):345-52.
11. Schoen FJ, Harasaki H, Kim KM, Anderson HC, Levy RJ. Biomaterial-associated calcification: pathology, mechanisms, and strategies for prevention. *J Biomed Mater Res*. 1988;22(A1 Suppl):11-36.
12. Schoen FJ, Levy RJ. Heart valve bioprostheses: antiminerallization. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1992;6(Suppl 1):S91-3.
13. 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.
14. Chanda J. Posttreatment with amino compounds effective in prevention of calcification of glutaraldehyde treated pericardium. *Artif Organs*. 1994;18(5):408-10.
15. Carpentier SM, Shen M, Chen L, Cunan CM, Martinet B, Carpentier A. Biochemical properties of heat-treated valvular bioprostheses. *Ann Thorac Surg*. 2001;71(5 Suppl):S410-2.
16. Chanda J. Prevention of calcification of heart valve bioprostheses: An experimental study in rat. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(2 Suppl):S339-42.
17. Chanda J, Kuribayashi R, Abe T. Heparin in calcification prevention of porcine pericardial bioprostheses. *Biomaterials*. 1997;18(16):1109-13.
18. Chanda J, Kuribayashi R, Abe T. Role of lipid in calcification of porcine pulmonary and aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;115(1):259-61.
19. Chanda J, Rao SB, Mohanty M, Lal AV, Muraleedharan CV, Bhuvaneshwar GS et al. Prevention of calcification of tissue valves. *Artif Organs*. 1994;18(10):752-7.
20. Kuribayashi R, Chanda J, Abe T. Efficacy of the chitosan posttreatment in calcification prevention of the glutaraldehyde-treated porcine aortic noncoronary cusp implanted in the right ventricular outflow tract in dogs. *Artif Organs*. 1996;20(7):761-6.
21. Rossi MA, Braile DM, Teixeira MD, Souza DR, Peres S. Lipid extraction attenuates the calcific degeneration of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *J Exp Pathol (Oxford)* 1990;71(2):187-96.

-
22. Vincentelli A, Latrémouille C, Zegdi R, Shen M, Lajos PS, Chachques JC et al. Does Glutaraldehyde induce calcification of bioprosthetic tissues? *Ann Thorac Surg*. 1998;66 (6 Suppl):S255-8.
 23. Chanda J, Kuribayashi R, Abe T. Heparin coupling in inhibition of calcification of vascular bioprostheses. *Biomaterials*. 1999;20(19):1753-7.
 24. Gatti AM, Galloni M, Monari E, Noera G, Pasquino E, Vallana F. Calcification of chemically treated bovine pericardium. *Int J Artif Organs*. 1991;14(10):647-54.
 25. Carpentier SM, Chen L, Shen M, Fornes P, Martinet B, Quintero LJ et al. Heat treatment mitigates calcification of valvular bioprostheses. *Ann Thorac Surg*. 1998;66 (6 Suppl):S264-6.
 26. Chanda J, Kuribayashi R, Abe T. Prevention of calcification in glutaraldehyde-treated porcine aortic and pulmonary valves. *Ann Thorac Surg*. 1997;64(4):1063-6.
 27. Neethling WM, Van Den Heever JJ, Meyer JM, Barnard HC. Processing factors as determinants of tissue valve calcification. *J Cardiovasc Surg. (Torino)* 1992;33(3):285-91.
 28. Chanda J. Anticalcification treatment of pericardial prostheses. *Biomaterials*. 1994;15(6):465-9.
 29. Nimni ME, Myers D, Ertl D, Han B. Factors which affect the calcification of tissue-derived bioprostheses. *J Biomed Mater Res*. 1997;35(4):531-7.
 30. Gong G, Ling Z, Seifter E, Factor SM, Frater RW. Aldehyde tanning: The villain in bioprosthetic calcification. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1991;15(6):288-99.