

TRATAMENTO DO PERICÁRDIO BOVINO PARA UTILIZAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS

Gamero FU^{1,2}, Cestari IA¹, Canzian M.³, Stolf NAG¹, Leirner AA¹ e Cestari IN¹

1 Divisão de Bioengenharia, InCor – Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

2 Programa Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

3 Serviço de Anatomia Patológica, InCor – Instituto do Coração Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

4 Departamento de Cirurgia, InCor – Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Abstract: We investigated new strategies for treating bovine pericardium (BP). BP samples were decellularized, partially crosslinked with glutaraldehyde (GA) and impregnated with poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB). Mechanical properties were evaluated by stress-strain measurements. Proinflammatory activity and degradation was evaluated by subcutaneous implantation in rats with histological analyses after 21 days. Decellularization was efficient and showed structural preservation. Partially crosslinked samples treated with P3HB showed tissue regeneration with neovascularization sites and cellular repopulation. These results suggest that these strategies may render the BP as a useful scaffold material in tissue engineering efforts.

Key-words: scaffold; tissue engineering; bovine pericardium; biodegradable polymers.

Introdução

O pericárdio bovino é utilizado na fabricação de próteses valvulares cardíacas e para tal é tratado com glutaraldeído [1,2]. O glutaraldeído reage com o tecido formando ligações cruzadas com as fibras de colágeno, o que reduz a antigenicidade e evita sua degradação após o implante. No entanto, o pericárdio assim tratado sofre invariavelmente a deposição de cristais de cálcio com a conseqüente degeneração funcional da prótese.

Novas técnicas de engenharia de tecidos têm sido empregadas no desenvolvimento de próteses valvulares [3, 4] buscando conferir às biopróteses propriedades como remodelamento e regeneração, especialmente relevante para a utilização em pacientes pediátricos. Uma estratégia frequente de engenharia de tecidos é a utilização de arcabouços obtidos pela descclularização de tecidos biológicos. A descclularização reduz a resposta inflamatória e a trombogenicidade, tornando o tecido biocompatível e passível de ser recolonizado por células.

Liang et al. [5] utilizaram a descclularização associada à reticulação parcial do tecido por genipin, obtendo diversos graus de ligações cruzadas. Os autores demonstraram que a ocorrência de infiltração de células inflamatórias, fibroblastos, células endoteliais e glóbulos vermelhos foi dependente do grau de reticulação induzido.

Com a finalidade de reduzir a trombogenicidade e melhorar as características mecânicas de válvulas

porcinas, Stamm et al. [6] utilizaram os polímeros biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) (P3HB) e poli(4-hidroxibutirato) após a descclularização enzimática.

Nesse trabalho apresentamos uma nova estratégia de tratamento do pericárdio bovino para sua eventual utilização em biopróteses. Investigamos as propriedades mecânicas e resposta tecidual do pericárdio bovino descclularizado, tratado parcialmente com glutaraldeído para controlar o grau de reticulação e impregnado com P3HB para modificar suas propriedades biológicas e mecânicas.

Materiais e Métodos

Obtenção e tratamento do pericárdio bovino – A coleta do pericárdio foi realizada em abatedouro, logo após o abate dos animais, seguindo os procedimentos padronizados por Ionescu et al. [7] e Braile [8] para a confecção de próteses valvulares. Após coleta e limpeza, o pericárdio foi conservado em glicerina.

Descclularização – O pericárdio bovino foi retirado da glicerina, reidratado e então descclularizado por processo enzimático. A descclularização foi feita imergindo as membranas de pericárdio em meio contendo solução salina tampão (PBS, Gibco, Grand Island, Nova York, EUA) e tripsina (Tipo IX de pâncreas porcino T-0134, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) 0.025% (peso/volume) por 48 horas a 4 °C, com troca do meio após 24 horas e lavagem final em solução salina por 90 minutos, com troca de solução a cada 30 minutos.

Reticulação com glutaraldeído – O pericárdio fresco foi tratado por tempos variáveis com glutaraldeído segundo os protocolos abaixo:

Tratamento padrão: O grau máximo de reticulação pelo glutaraldeído foi obtido através de protocolo similar ao utilizado na manufatura de válvulas comerciais, sendo o grupo designado GA. O pericárdio foi imerso em glutaraldeído em solução aquosa 0,5 %, a 4 °C, pH 7,4, com emprego de tampão fosfato, mantidos ao abrigo da luz durante 10 dias, com troca de solução nas primeiras 24 e 72 horas. Após este período de 10 dias, o pericárdio foi lavado com solução salina para a retirada de resíduos, agitando-se continuamente por 90 minutos, com troca de meio a cada 30 minutos. Após a lavagem, o pericárdio foi conservado em formaldeído 4% e antes da utilização experimental, foi lavado por 15 minutos em solução salina, com troca de meio a cada 5 minutos.

Tratamento parcial: Amostras de pericárdio foram

imersas por períodos de 2½ (G2½), 5 (G5), 10 (G10), 15 (G15), 20 (G20), 30 (G30) e 60 (G60) minutos em solução de glutaraldeído 0,5 % (volume/volume). Após o período de tratamento, as amostras foram lavadas em solução salina.

Deposição do polímero – Amostras de pericárdio descelularizado, tratadas parcialmente com glutaraldeído foram desidratadas em etanol e impregnadas com o P3HB (Copersucar São Paulo, Brasil) segundo o descrito por Stamm *et al.* [7].

Quantificação de α -aminoácidos – O grau de ligações cruzadas produzido pelo glutaraldeído nas amostras de pericárdio foi determinado através da reação de ninidrina (hidrato de tricetoidrindeno). Foram dissolvidos 200 mg de ninidrina numa mistura de 7,5 ml de etilenoglicol e 2,5 ml de tampão acetato 4N. Foram então adicionados 250 μ l de solução de cloreto de estanho (0,1 mg/ μ l) e agitado até a obtenção de uma coloração rosa na mistura. Foram utilizadas amostras liofilizadas de 30 mg dos grupos G2½, G5, G10, G15, G20, G30 e G60, D, F e GA. As amostras foram autoclavadas por 20 minutos em 2 ml de solução de Krebs-Henseleit. Para realização da reação de ninidrina, 10 μ l da solução de cada amostra autoclavada foram adicionados à 300 μ l do reativo de ninidrina e mantidas a 100 °C por 10 minutos com a leitura realizada em espectrofotômetro a 600 nm de comprimento de onda.

Ensaio de estabilidade térmica – Corpos de provas dos grupos D, G5, G15, G30 e GA foram cortados em direções e locais aleatórios em forma de fitas retangulares de 50 x 10 mm. Cada corpo de provas foi posicionado em um equipamento confeccionado pela Divisão de Bioengenharia do InCor-HCFMUSP, onde foi estirado sem carga, imerso em solução salina e submetido a aquecimento à razão de aproximadamente 1°C por minuto. Quando o corpo de provas sofreu encolhimento com um súbito aumento de sua tensão, as temperaturas do início e final do encolhimento foram anotadas, definindo-se a média desses valores como sendo a temperatura de encolhimento. A temperatura da solução fisiológica na qual o corpo de provas ficou imerso foi monitorada utilizando-se um termômetro digital e registradas manualmente pelo experimentador.

Ensaio mecânicos de tensão-deformação estática – Os ensaios de tensão-deformação foram realizados de acordo com a norma ASTM D638, para um corpo de prova tipo V e velocidade de ensaio 15 mm/min. Foi utilizada uma máquina universal de ensaio (Kratos 5002, Kratos Equipamentos Industriais LTDA, Cotia, São Paulo, Brasil) com célula de carga com a capacidade para 100 kgf (980,665 N), utilizando um fundo de escala de 10 kgf (98,0665 N). As amostras foram cortadas em direções aleatórias. Foi medida a espessura e largura de cada corpo de prova para o cálculo da área da seção transversal. Os valores analógicos de força *versus* deslocamento foram digitalizados (12 bits, ± 1 Volt, Sistema de aquisição Lynx ADS200, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e registrados, com uma frequência de amostragem de 30 Hz, em computador. Os valores

registrados foram analisados utilizando uma rotina computacional desenvolvida na Divisão de Bioengenharia do InCor, que calcula os valores de tensão e traça as curvas de tensão *versus* deformação para cada ensaio realizado, fornecendo os valores de tensão de ruptura. Esta rotina calcula também o coeficiente angular da região elástica dessa curva que fornece a rigidez elástica, também chamada de módulo de Young.

Biocompatibilidade *in vivo* – Foram utilizados ratos Wistar machos com peso entre 70 e 90 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP. As amostras de pericárdio foram esterilizadas em radiação gama a 25 kGy. Após anestesia peritoneal com pentobarbital (40 mg/kg, IP) as amostras de pericárdio bovino (10 x 5 mm) foram implantadas no subcutâneo dos ratos, suturadas ao músculo dorsal e a incisão fechada. Após 21 dias do implante, os animais foram sacrificados com pentobarbital (150 mg/kg i.p.) e as amostras encaminhadas para análise histológica.

Análise histológica – Foi feita a análise histológica do pericárdio bovino fresco, do pericárdio após a descelularização, depois de tratado com glutaraldeído nos diferentes protocolos experimentais e das amostras explantadas. As amostras foram fixadas em 10% formol, cortadas longitudinalmente ou transversalmente e incrustadas em bloco de parafina, cortados com micrótomo e coradas com hematoxilina-eosina (HE) ou coloração de Verhoeff para visualização das fibras elásticas. Nas amostras explantadas foram avaliados os seguintes parâmetros: reação granulomatosa, infiltrado inflamatório mononuclear, formação de tecido de granulação, presença de células estromais e neoformação de vasos.

Análise estatística – Foram calculadas as médias e os desvios padrão dos valores obtidos no teste de tensão-deformação. A análise estatística utiliza o teste t pareado ou Mann-Whitney Rank Sum test, com $P < 0,05$ considerado significativo.

Resultados

Determinação do grau de ligações cruzadas – A figura 19 apresenta os valores médios de densidade óptica e os desvios padrão obtidos dos grupos estudados para determinação do grau de ligações cruzadas através do teste com o reagente ninidrina.

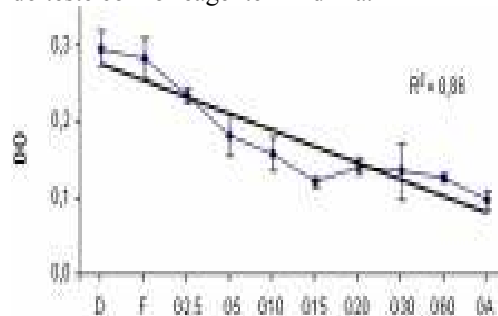


Figura 1. Valores de densidade óptica (DO, unidades arbitrárias) nos grupos estudados e a equação da reta obtida no teste de ninidrina.

Ensaios de estabilidade térmica – A tabela 1 apresenta as temperaturas médias \pm desvios padrão dos valores das temperaturas de encolhimento em que os pericárdios sofreram encolhimento.

Tabela 1. Valores médios e desvios padrão obtidos no ensaio de estabilidade térmica.

Grupo n=5	Temp de encolhimento °C
D	66,8 \pm 0,3
G5	69,4 \pm 0,2
G15	78,4 \pm 0,6
G30	82,9 \pm 0,8
GA	88,0 \pm 0,3

A partir dos resultados dos testes de ninidrina e estabilidade térmica, escolhemos o tempo de 15 minutos para os ensaios in vivo com impregnação pelo P3HB.

Ensaios mecânicos – As médias e os desvios padrão dos valores da área da seção transversal das amostras (A), da rigidez elástica (E), e da tensão de ruptura (σ rup) obtidos nos testes de tensão-deformação estão apresentados na tabela 2. Os resultados da análise estatística são apresentados na tabela 3.

Tabela 2. Valores médios e desvios padrão obtidos nos ensaios mecânicos.

Grupo (n=40)	A [mm ²]	E [MPa]	σ rup [MPa]
F	1.04 \pm 0.18	115.27 \pm 58.56	12.02 \pm 7.19
D	1.06 \pm 0.19	116.07 \pm 55.88	12.15 \pm 6.47
GA	0.88 \pm 0.15	142.28 \pm 91.38	16.43 \pm 10.10
G15	0.94 \pm 0.18	150.73 \pm 71.05	16.50 \pm 7.97
G15+P3HB	0.84 \pm 0.19	156.15 \pm 68.34	26.18 \pm 10.96

F= pericárdio fresco; D descelularizado; GA tratado com glutaraldeído para reticulação máxima; G15 tratado com glutaraldeído por 15 minutos; G15 + P3HB, tratado com glutaraldeído por 15 min e impregnado com poli(3-hidroxibutirato).

Análise histológica – A descelularização foi eficaz, retirando as células do pericárdio bovino e preservando as fibras elásticas e de colágeno, como mostra a fig. 2.

A análise histológica demonstrou que no grupo composto por pericárdio descelularizado (grupo D) ocorreu a formação de granulomas indicando absorção do tecido pelo organismo do rato. Nos grupos G5 e G15 foi possível observar infiltração celular e neo vascularização, com degradação parcial do pericárdio. Nos grupos tratados com glutaraldeído por 30 e 60 minutos (grupos G30 e G60) foi encontrada a presença

de células apenas na periferia do tecido implantado, como mostrado na fig. 3.

Tabela 3. Comparação estatística dos valores obtidos nos testes de tensão-deformação.

Grupos	Módulo de Young	Tensão de Ruptura
F versus D	p = 0.814	p = 0.704
D versus GA	p = 0.301	p = 0.079
D versus G15	p = 0.036*	p = 0.009*
G15 versus G15P3HB	p = 0.729	p < 0.001*
GA versus G15P3HB	p = 0.324	p < 0.001*

F= pericárdio fresco; D descelularizado; GA tratado com glutaraldeído para reticulação máxima; G15 tratado com glutaraldeído por 15 minutos; G15 + P3HB, tratado com glutaraldeído por 15 min e impregnado com poli(3-hidroxibutirato). * p<0.05.



Figura 2. Exame histológico de amostras de pericárdio bovino descelularizado à 4 °C. Observa-se à esquerda a ausência de células na coloração por HE e à direita a presença de fibras elásticas em tom escuro coradas com a coloração Verhoeff. Aumento de 200X.

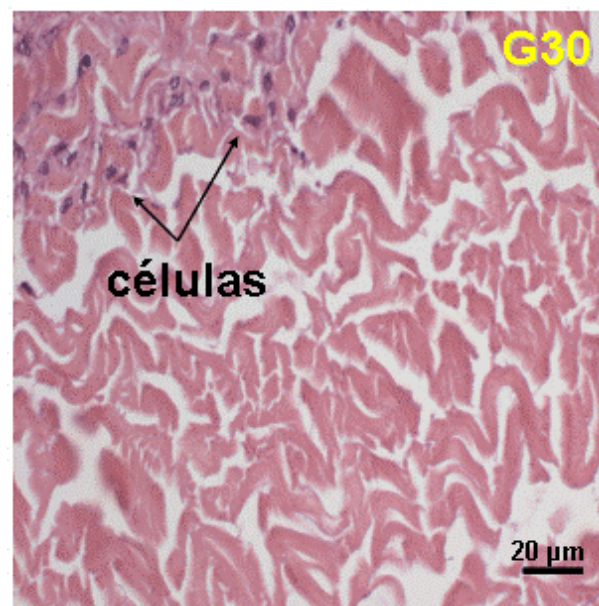


Figura 3. Análise histológica das amostras de pericárdio bovino descelularizado e tratado com

glutaraldeído por 30 min. Observe a ausência de células na região central da figura, com células de reação tipo corpo estranho na periferia do tecido. Aumento 200X.

No grupo tratado com glutaraldeído por 15 minutos e impregnado com P3HB foi observado a infiltração de células estromais e formação de neovascularização, como mostrado na figura 4.

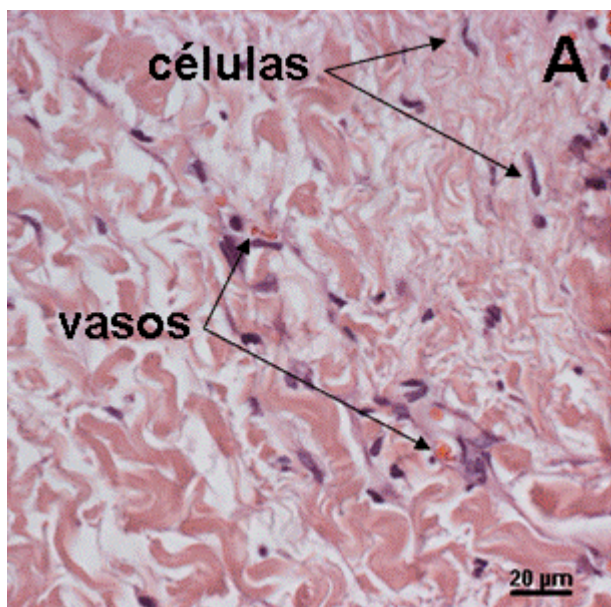


Figura 4. Análise histológica do grupo G15PHB. Observe a presença de células estromais e neovascularização. Lâminas coradas com hematoxilina-eosina. Barra de calibração 20 µm. Aumento 400X.

Discussão e Conclusão

Foi observado nesse estudo que a descclularização associada ao tratamento parcial com glutaraldeído e a deposição de polímeros permitem o repovoamento celular do pericárdio bovino, inclusive com a presença de neovascularização. Essas propriedades sugerem que o pericárdio assim tratado possa ser útil na produção de arcabouços para a construção de válvulas cardíacas por engenharia de tecidos. Os resultados demonstram que as propriedades do pericárdio, particularmente a resistência mecânica, podem ser modificadas pela impregnação com polímeros biodegradáveis. Estudos recentes com pericárdio descclularizado bovino [9] e humano [10] têm obtido resultados promissores. Porém existem ainda dificuldades para identificar diferenças nas propriedades mecânicas antes e após o tratamento com glutaraldeído, provavelmente devido ao uso de testes de medição uniaxial. Não há na literatura relatos acerca da utilização de pericárdio bovino descclularizado parcialmente tratado com glutaraldeído e impregnado com polímeros biodegradáveis. Assim, este trabalho abre novas possibilidades no processamento de material biológico para a produção de estruturas híbridas em engenharia de tecidos.

Referências

- [1] Carpentier A, Lemaigre G, Robert L, Carpentier S, Dubost C. Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 58(4): 467-83, 1969.
- [2] 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*, 64(3): 340-53, 1972.
- [3] Schmidt D, Achermann J, Odermatt B, Breyman C, Mol A, Genoni M, Zund G, Hoerstrup SP. Prenatally fabricated autologous human living heart valves based on amniotic fluid derived progenitor cells as single cell source. *Circulation*. 2007 Sep 11;116 (11 Suppl):I64-70.
- [4] Schmidt D, Stock UA, Hoerstrup SP. Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007 Aug 29;362 (1484):1505-12.
- [5] Liang HC, Chang Y, Hsu CK, Lee MH, Sung HW. Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern. *Biomaterials*, 25(17):3541-52, 2004.
- [6]. Stamm C, Khosravi A, Grabow N, Schmoehl K, Treckmann N, Drechsel A, Nan M, Schmitz KP, Haubold A, Steinhoff G. Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering, *Ann Thorac Surg*,78(6):2084-93, 2004.
- [7]. Ionescu MI, Tandon AP, Mary DA, Adib A. Heart valve replacement with the Ionescu-Shiley pericardial xenograft, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 73(1):31-42, 1977.
- [8]. Braile, D. M. Prótese vascular de pericárdio bovino. Desenvolvimento em posição mitral. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1990. 110p. Tese (Doutorado).
- [9]. Oswal D, Korossis S, Mirsadraee S, Wilcox H, Watterson K, Fisher J, Ingham E. Biomechanical characterization of decellularized and cross-linked bovine pericardium. *J Heart Valve Dis*. 2007 Mar;16(2):165-74.
- [10]. Mirsadraee S, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Hunt J, Fisher J, Ingham E. Biocompatibility of acellular human pericardium. *J Surg Res*. 2007 Dec;143(2):407-14.