

Biocompatibilidade de materiais empregados na confecção de próteses cardiovasculares: comparação entre pericárdio bovino e Dacron^(R)*

The biocompatibility of cardiovascular graft materials: a comparison between bovine pericardial tissue and Dacron^(R)

Terezinha de J. A. Pinto**, Takako Saito**, Álvaro Glerean***

PINTO, T. de J. A. et al. Biocompatibilidade de materiais empregados na confecção de próteses cardiovasculares: comparação entre pericárdio bovino e Dacron^(R). *Rev. Saúde Pública*, 27: 185-9, 1993. Durante os últimos 25 anos, numerosos estudos têm sido efetuados visando a biocompatibilidade de materiais de uso médico-hospitalar. Isto se deve ao desenvolvimento de materiais destinados às próteses particularmente na área cardiovascular, o que motivou pesquisas relativas à problemática da compatibilidade entre superfícies biológicas ou sintéticas e o sangue. O presente trabalho objetivou comparar a avaliação da biocompatibilidade do pericárdio bovino, um dos materiais mais empregados na fabricação de válvulas cardíacas protéticas, após tratamento com glutaraldeído e formaldeído, com o material sintético conhecido como "tricot" de Dacron^(R). Tanto fragmentos de pericárdio submetidos a diferentes tratamentos, como os de Dacron^(R) foram implantados subcutaneamente na região abdominal de ratos Wistar, por períodos de 1 a 3 meses. O exame de cortes histológicos obtidos por métodos convencionais evidenciou ausência de biocompatibilidade principalmente para o pericárdio tratado com formaldeído. Para o Dacron^(R), foi constatado, comparativamente, uma perfeita biocompatibilidade. A cultura de células *in vitro*, com o uso de linhagens RC-IAL e Hela pelo método de revestimento com ágar, foi empregada exclusivamente para o material de origem biológica e evidenciou um grau intenso de toxicidade associado ao resíduo do agente de tratamento. Concluiu-se que existe a necessidade do aperfeiçoamento da técnica de lavagem da prótese biológica antes da implantação.

Descritores: Prótese das valvas cardíacas. Bioprótese. Testes de materiais. .

Introdução

Aspectos relacionados com a biocompatibilidade de produtos de uso médico-hospitalar têm sido intensamente estudados nos últimos 25 anos¹³, especialmente em relação ao material protético destinado à área cardiovascular e os problemas detectados relacionam-se com o contato do sangue com a superfície de materiais naturais ou artificiais⁸. Desde 1969, a aplicação do pericárdio

de origem animal em implantes em humanos tem passado por estágios de aperfeiçoamento e já é grande o número de receptores com válvulas cardíacas confeccionadas com esse material².

A vantagem do material de origem biológica está justamente na menor propensão às complicações trombóticas, além das boas características hemodinâmicas¹. O aspecto inerente à compatibilidade sanguínea implica série de características intrínsecas ao material de implante, ou seja, não destruir ou sensibilizar os elementos celulares do sangue, não alterar as proteínas plasmáticas, não causar respostas imunes diversas, não induzir à carcinogenicidade ou mutagenicidade, não produzir reações tóxicas ou alérgicas, não depletar eletrólitos, não ser adversamente afetado pela esterilização, apresentar estabilidade no ambiente fisiológico e não provocar calcificação^{2,11}.

Um dos produtos mais empregados na confecção da prótese valvular tem sido o pericárdio bovino, convencionalmente associado ao Dacron^(R)⁶, preferencialmente às próteses estritamente inorgânicas.

Objetiva-se, no presente trabalho, avaliar a biocompatibilidade de ambos materiais acima citados,

* Trabalho realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo nº 40.4292/85

** Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP - Brasil

*** Disciplina de Histologia - Departamento de Morfologia da Escola Paulista de Medicina - São Paulo, SP - Brasil

Separatas/Reprints: T. de J. A. Pinto - Caixa Postal 30786 - 05340-901 - São Paulo, SP - Brasil

Edição subvencionada pela FAPESP. Processo Medicina 93/0208-5.

submetidos a diferentes tipos de tratamento, tendo sido empregado o glutaraldeído como propiciador de ligações cruzadas no pericárdio, além de esterilizante conservante, ou sua associação ao formaldeído e, por sua vez, à heparina.

Material e Método

Tipo de material

Os materiais utilizados foram o pericárdio bovino submetido aos diversos métodos de tratamento empregados na preparação de válvulas e o Dacron^(R), um tecido poliéster, que representou o material sintético e normalmente utilizado no revestimento do anel da bioprótese ou mesmo na confecção de próteses valvulares.

Preparo do pericárdio

Etapa 1: Imediatamente após o abate, o pericárdio foi selecionado e imerso em solução fisiológica a pH 7,4 e mantido a 10°C. Esta condição foi respeitada durante o transporte do material até o laboratório.

Etapa 2: Após o processo de eliminação da gordura e seleção ao microscópio, o material foi mantido em banho de solução fisiológica e conservado até o momento do preparo das amostras.

Etapa 3: No momento do preparo, o pericárdio foi imerso numa solução de glutaraldeído a 0,5% em tampão fosfato pH 7,4, previamente esterilizada. No primeiro dia foram realizadas trocas a intervalos de 3h. A manutenção posterior por período mínimo de 15 dias foi efetuada nesse líquido e no refrigerador.

Etapa 4: Parte do material processado conforme a *Etapa 3* foi imerso numa solução aquosa de formaldeído a 4%, tamponada com acetato de sódio a 0,2M. A manutenção do pericárdio nesta solução obedeceu às condições da *Etapa 3*.

Material sintético

O Dacron^(R) testado consistiu de "tricot" de poliéster com espessura de $0,37 \pm 0,02$ mm, apresentado como produto terminado estéril para uso como prótese vascular. Dispensou tratamentos adicionais, exceto pela fragmentação e imersões conforme descrito no preparo de amostras.

Preparo de amostras

Tanto as amostras processadas conforme descrito nas *Etapas* de 2 a 4 como o material sintético foram cortadas, sob condições assépticas, em frag-

mentos de 12 x 7 mm. Esses fragmentos foram então submetidos a etapas posteriores que compreenderam, conforme o caso, imersão em solução fisiológica, com agitação manual periódica e 3 trocas a cada 15 min, imersão em solução aquosa contendo 300 UI/mL de heparina, por 15 min.

Resultaram então amostras que puderam ser agrupadas de I a VI, a saber:

- Grupo I* - Pericárdio bovino + solução fisiológica + glutaraldeído + formol + lavagem com solução fisiológica + heparina.
- Grupo II* - Pericárdio bovino + solução fisiológica + glutaraldeído + lavagem com solução fisiológica + heparina.
- Grupo III* - Pericárdio bovino + solução fisiológica + glutaraldeído + formol + lavagem com solução fisiológica.
- Grupo IV* - Pericárdio bovino + solução fisiológica + glutaraldeído + lavagem com solução fisiológica.
- Grupo V* - Dacron^(R) + solução fisiológica + heparina.
- Grupo VI* - Dacron^(R) + solução fisiológica.

Em seguida procedeu-se à implantação das amostras.

Implantação das amostras

Foram utilizados 72 ratos Wistar de ambos os sexos, com idade mínima de 8 meses, igualmente distribuídos entre os 6 grupos de amostras. Após a anestesia com éter etílico, procedeu-se à depilação da região abdominal central, assepsia local e incisão longitudinal com cerca de 7 mm de comprimento. Com auxílio de tesoura, foram preparadas pequenas bolsas em cada extremidade das incisões, pelo afastamento do tecido subcutâneo e então alojado em cada uma um fragmento. Foram testadas 24 réplicas para cada grupo, de forma a permitir 8 para cada tempo de implantação, tendo sido de 30 dias o intervalo entre as avaliações. Após sutura e aplicação de "spray" de polimetil acrilato, os ratos foram mantidos em biotério com acesso livre à água e ração durante um período máximo de 3 meses.

Preparações histológicas

Decorridos 30, 60 e 90 dias, os ratos foram sendo sacrificados por destroncamento cervical e a porção da parede abdominal com os implantes, retirada, e as peças fixadas numa solução de formaldeído a 10% tamponada a pH 7,0 com tampão fosfato, por 7 dias. Cada peça foi depois dividida em 3 partes codificadas.

O processamento histológico foi convencional, ou seja, desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Tomou-se o cuidado de incluir as três partes da mesma amostra num mesmo bloco a fim de permitir observação comparativa na mesma preparação após coloração pela Hematoxilina e Eosina de cortes com 5 μ m. A observação visou ao estudo da interação entre o implante e o tecido adjacente, em termos de intensidade e características.

Efeito citotóxico

Fragmentos obtidos conforme a *Etapa 4*, cortados em condições assépticas, em dimensão aproximada de 12 x 7 mm, foram imersos sequencialmente num total de 3, 5 ou 8 banhos de solução fisiológica, mantidos em cada um por período de 5 min, na proporção de 8 fragmentos em 50 mL da solução. Portanto, resultaram os *Grupos III.a e IV.a*, a saber:

Grupo III.a: pericárdio bovino + solução fisiológica + glutaraldeído + formol + 3, 5 ou 8 lavagens em solução fisiológica;

Grupo IV.a: pericárdio bovino + solução fisiológica + glutaraldeído + 3, 5 ou 8 lavagens em solução fisiológica.

Os fragmentos destes dois grupos foram avaliados quanto à citotoxicidade, por método de revestimento de ágar com vermelho neutro, sobre monocamada de linhagens celulares RC-IAL e Hela^{3,9}, em comparação aos controles positivo (látex tóxico) e negativo (porcelana). A resposta das amostras foi expressa como média das leituras das 8 réplicas, tendo sido Índice de Zona (IZ) a distância de difusão do agente tóxico entre a amostra e linha limítrofe de inibição e crescimento celulares, e Índice de Lise (IL) a percentagem de células lisadas no halo de inibição de crescimento. Índice de Resposta (IR) é a relação entre o Índice de Zona e o Índice de Lise (IZ/IL)³.

Resultados

Os resultados relativos ao teste de citotoxicidade são apresentados na Tabela 1.

Os dados pertinentes a avaliações histológicas são apresentados na Tabela 2.

Discussão

O processamento do pericárdio bovino foi, basicamente, aquele adotado industrialmente com

Tabela 1. Índice de resposta citotóxica (IR) "in vitro" do pericárdio bovino, submetido a diferentes tratamentos, frente a duas linhagens de células.

Grupos/ controle	Lavagens					
	3		5		8	
	RC-IAL	Hela	RC-IAL	Hela	RC-IAL	Hela
Grupo III.a	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Grupo IV.	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Controle						
Positivo	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5

IR = IZ/IL

IZ3 = Distância de 0,2 a 1,0 cm

IZ4 = distância de 1,0 a 2,0 cm

IL4 = lise celular de 60 a 80%

IL5 = lise celular acima de 80%

vistas à confecção de válvulas cardíacas, acrescido de tratamento que simula as condições de comercialização destas próteses, além do aspecto recomendado para uso clínico. A adição do banho em formol foi fundamentada exatamente no aspecto de esterilização e manutenção do material pronto até o momento de implante. Alternativamente, o material comercializado pode ser encontrado imerso em solução de glutaraldeído, o que também se reproduziu no presente trabalho como condição de tratamento do material, embora pouco comum no nosso meio.

Já a lavagem final, com apenas solução fisiológica ou adicionalmente banho em solução de heparina, foram variáveis aplicadas tanto ao material biológico quanto ao Dacron^(R).

Preocupação pertinente à remoção completa do agente de conservação das próteses, quando seguindo prática usualmente adotada, conduziu à investigação de seus níveis ainda tóxicos. A característica de preparo prévio do pericárdio, assim como sua textura, levando-o a propiciar maior retenção dos aldeídos, direcionou a que apenas este fosse o material de escolha nos testes com objetivo de avaliação de citotoxicidade residual. Embora não se tenha localizado material bibliográfico justificando, sabe-se do uso generalizado do formol no Brasil e de válvulas importadas com emprego exclusivo do glutaraldeído.

Este fato objetivou a avaliação adicional pela técnica *in vitro*, uma vez que é mais sensível^{3,9}, para o que foram selecionadas duas situações, as dos *Grupos III.a e IV.a*.

O questionamento inicialmente feito quanto ao esquema de lavagem da prótese ser efetivo na remoção das soluções de conservação, é respondido pelos dados apresentados na Tabela 1. Dados comparativos entre os controles negativo e positivo validam aqueles inerentes aos *Grupos III.a e*

Tabela 2. Avaliações histológicas decorrentes da implantação de pericárdio bovino (Grupos I a IV) e Dacron^(R) (Grupos V e VI) em ratos, ao longo do tempo (30 a 90 dias).

Grupos	30 dias	60 dias	90 dias
Grupo I	Reação intensa, presentes leucócitos e neutrófilos; fibroblastos em atividade sintética.	Reação ainda intensa, presença de leucócitos, neutrófilos e fibroblastos.	Reação intensa, com tendência a expulsão do material. Presença de plasmócitos, leucócitos, neutrófilos e fibroblastos.
Grupo II	Alternância de campos com implante inócuo, com encapsulamento e campos com presença local intensa de leucócitos e neutrófilos.	Alternância de campos com encapsulamento e com tecido de granulação.	Alternância de campos com encapsulamento e com tecido de granulação; em formação o encapsulamento.
Grupo III	Implante inócuo, com encapsulamento, contrastando com reação intensa envolvendo leucócitos, neutrófilos e fibroblastos.	Manutenção das características contrastantes entre ausência de reação e reação inflamatória intensa. Presença de plasmócitos.	Reação ainda intensa, envolvendo processo de cicatrização e reepitelização.
Grupo IV	Afluxo de neutrófilos e fibroblastos em contraste com implante tipicamente inócuo.	Aumento na tendência de integração das células ao redor do colágeno.	Perfeita integração, com condensação de células ao redor do colágeno.
Grupo V	Pele íntegra, encapsulamento; fibroblastos fabricam colágeno e preenchem espaço entre fibras do Dacron ^(R) .	Integração de colágeno e fibroblastos intercalando com fibras do material sintético. Presença de células de defesa esparsas.	Integração de colágeno e fibroblastos intercalando com fibras do material sintético. Neoformação capilar presente.
Grupo VI	Idem Grupo V.	Idem Grupo V.	Idem Grupo V.

IV.a, indicando que os conservantes ainda se encontram em níveis citopáticos.

Assim, aparenta inexistir vantagem na utilização do glutaraldeído também como agente de esterilização e conservação das próteses cardíacas. Em ambas as situações, permanece como aspecto preocupante o residual extremamente tóxico ao qual se expõe o paciente e que se constitui em fator de agressão adicional ao mesmo. A proposta de lavagem em maior número de trocas de solução fisiológica (8 lavagens) em relação ao preconizado na prática clínica (3 lavagens) indicou ser insuficiente, embora os dados não possam garantir no que diz respeito à presença de formol ser ou não mais citotóxico.

Quanto às avaliações dos implantes, seus dados evidenciam aspecto vantajoso na eliminação do formol, haja vista as condições tipicamente agressivas à fisiologia tissular no Grupo I, que se mantém como tendência no Grupo III.

Contraopondo-se, os Grupos II e IV evidenciaram condições de biocompatibilidade que, em períodos equivalentes de tempo, atingiram melhor interação histológica. Deve-se lembrar que o glutaraldeído agrega vantagens adicionais quanto a ausência de características antigênicas e imunogênicas¹.

Fazendo paralelo entre metodologias *in vitro* e *in vivo*, o aspecto de intensa citotoxicidade observado pela primeira, para ambos os agentes de conservação, torna-se aparentemente seletivo quando avaliado *in vivo* e, portanto, na situação que melhor simula a condição real de uso.

Assim, sabendo ser imprescindível, no caso do pericárdio, a adição de agentes formadores de ligações cruzadas¹⁰, visando a conferir adequada resistência mecânica ao material, associada às evidências de maior compatibilidade do glutaraldeído, deve ser considerada pelos técnicos brasileiros envolvidos na fabricação de material protético dessa natureza.

O tratamento de próteses com heparina tem sido enaltecido por vários pesquisadores^{4,7,8,12}. Na presente avaliação, este procedimento, ainda que sem ligação específica por ter sido apenas por imersão, não demonstrou qualquer influência. É bem verdade que, em considerando o modelo biológico com implantação subcutânea, não envolvendo contato direto com sangue, pode ser, também, considerada limitação metodológica.

No caso do Dacron^(R), independentemente do tratamento com heparina, a extensa área de reação e de perfeita integração, caracterizando, além do

aspecto biocompatível, o aspecto vantajoso do "tricot", com fibras permitindo e propiciando desenvolvimento celular intercalando-se com o material sintético, tem conduzido a aproveitamento desta característica no revestimento biológico em próteses de Dacron^(R)5.

O Dacron^(R), já consagrado para fins protéticos, apresentou resposta que comprova perfeita compatibilidade5, cujo efeito pode servir de padrão para análise comparativa. Assim, tanto formol como glutaraldeído demonstraram ser tóxicos, embora em níveis diferentes.

Concluiu-se, assim, que a prática de lavagem da prótese valvular biológica merece aperfeiçoamento, visto permanecer o residual dos agentes de esterilização em níveis ainda tóxicos.

Agradecimentos

À sra. Aurea Silveira da Cruz, chefe substituta da Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, pelo auxílio nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*; ao Dr. Jaime Antonio A. Sertie, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - São Paulo, SP, pela orientação quanto à técnica de implante.

PINTO, de J. A. et al. [The biocompatibility of cardiovascular graft materials: a comparison between bovine pericardial tissue and Dacron^(R)]. *Rev. Saúde Pública*, 27: 185-9, 1993. During the past 25 years, numerous studies relating to medical device biocompatibility have apedared world-wide. Development of biomaterials for grafting cardiovascular applications has contributed to an increase in knowledge of the compatibility between synthetic or biological surfaces and blood. The biocompatibility of one of the materials most commonly used in the fabrication of xenograft heart valves, bovine pericardium, treated with glutaraldehyde and formaldehyde is assessed comparison to a synthetic material, Dacron^(R) tricot. An *in vitro* tissue culture assay, by the agar overlay method, using RC-IAL and Hela cell lines, was applied to treated pericardium and attested the intense toxicity of the treating agents. The subcutaneous grafting of treated pericardium and Dacron^(R) was carried out in Wistar rats of 1 to 3 months of age. After the use of the usual histological methods, an evaluation of hematoxylin-eosin stained specimens demonstrated an absence of histocompatibility, mainly as regards for the formaldehyde treated pericardium. Comparatively, the evaluation of implanted Dacron^(R) confirmed it's perfect biocom-

patibility. In conclusion, some improvement in xenograft heart valves is necessary, before the surgical implantation procedure takes place.

Keywords: Heart valve prosthesis. Bioprosthesis. Material testing.

Referências Bibliográficas

1. BAJPAI, P. K. Immunological aspects of treated natural tissue prostheses. In: Williams, D. F. ed. *Biocompatibility of tissue analogs*, Boca Raton, CRC Press, 1985. v.1 p. 5-25.
2. BRUCK, S. D. Possible causes for the calcification of glutaraldehyde - treated tissue heart valves and blood contacting elastomers during prolonged use in medical devices: a physico-chemical view. *Biomaterials*, 2: 14-8, 1981.
3. FEHN, J. & SCHOTTLER. Tissue culture methods for determining biocompatibility. In: Brown, S. A., ed. *Cell culture test methods*. Philadelphia, ASTM, 1983. p. 19-24. (ASTM Technical Publication, 810).
4. HORI, M.; OHSHIMA, N.; IDEZUKI, Y. Preparation and evaluation of a new athrombogenic heparinized hydrophylic polymer for use in cardiovascular system. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, 19: 188-94, 1973.
5. HYMAN, M. & HYMAN, W. A. Thromboresistance in biomaterials. *Med. Device Diagn. Ind.*, 4: 37-40, 50, 1982.
6. KAMBIC, H. E.; KANTROWITZ, A.; SUNG, P. *Vascular graft update: safety and performance*. Philadelphia, ASTM, 1984. 349 p. (ASTM Technical Publication, 898).
7. LARSSON, R. L.; HJELTE, M. B.; ERIKSSON, J. C.; LAGERGREN, H. R.; OLSSON, P. The stability of glutaraldehyde - stabilized - heparinized surfaces in contact with blood. *Thrombos. Haemostas*, 37: 262-73, 1977.
8. LINDON, J.; ROSENBERG, R.; MERRIL, E.; SALZMAN, E. Interaction of human platelets with heparinized agarose gel. *J. Lab. Clin. Med.*, 91: 47-59, 1978.
9. PINTO, T. J. A. Controle de qualidade de produtos médicos-hospitalares. Característica de biocompatibilidade em materiais poliméricos. São Paulo, 1984. [Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
10. RICHARDS, F. M. & KNOWLES, J. R. Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent. *J. Mol. Biol.*, 37: 231-3, 1968.
11. STARK, N. J. How to organize a biocompatibility testing program: a case study. *Med. Device Diagn. Ind.*, 13: 68-79, 1991.
12. TANZAWA, H.; MORI, Y.; HARUMIYA, N.; MIYAMA, H.; HORI, M.; OSHIMA, N.; IDEZUKI, Y. Preparation and evaluation of a new athrombogenic heparinized hydrophylic polymer for use in cardiovascular system. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, 19: 188-94, 1973.
13. WALLIN, R. F.; UPMAN, P. J. How to sample materials for biocompatibility testing. *Med. Device Diagn. Ind.*, 13: 76-79, 1991.

Recebido para publicação em 3.11.1992
Reapresentado em 14.5.1993
Aprovado para publicação em 31.5.1993