

Efeitos da radiação gama no comportamento mecânico e na calcificação do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído

Effects of gamma irradiation on mechanical behavior and calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium

José Augusto BAUCIA¹, Ricardo Mendes LEAL NETO², José Roberto ROGERO², Nanci do NASCIMENTO², Carmem Aparecida Cruz REYES³

RBCCV 44205-871

Resumo

Objetivo: Avaliar o comportamento mecânico e os efeitos no processo de calcificação pós-implante do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído submetido a várias doses de radiação gama.

Método: Pericárdios bovinos fixados com glutaraldeído foram submetidos a radiação gama, nas doses de 0 a 10000 Gy. Seis amostras de cada grupo 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): 0 Gy (controle) - 194,45; 50 Gy - 154,64; 100 Gy - 169,37; 200 Gy - 163,64; 500

Gy - 199,89; 1000 Gy - 184,02; 2000 Gy - 198,95; 5000 Gy - 227,95 e 10000 Gy - 362,62. Houve alteração significativa no comportamento mecânico do tecido irradiado, quando comparado ao grupo controle, mesmo com o emprego de baixas doses de radiação.

Conclusão: O emprego da radiação gama no pericárdio bovino tratado com glutaraldeído não reduziu os níveis de Ca²⁺ em implantes subcutâneos em ratos por quatro meses e promoveu alteração significativa no comportamento mecânico do tecido, com redução na sua resistência, quando comparados ao grupo controle.

Descritores: Glutaral. Calcinose. Raios gama. Pericárdio, efeitos de radiação.

1. Doutor; Cirurgião Cardiovascular.
2. Doutor; Professor e Pesquisador do IPEN – USP.
3. Bacharel; Farmacêutica.

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 28 de setembro de 2006
Artigo aprovado em 16 de janeiro de 2007

Abstract

Objective: To evaluate the effect of gamma irradiation on glutaraldehyde-fixed bovine pericardium.

Method: Glutaraldehyde-fixed bovine pericardium was exposed to gamma radiation (doses from 0 to 10000 Gy). Six samples from each of nine groups were evaluated by optic microscopy, and shrinking and mechanical tests and the denaturation temperature was determined. Additionally, they were subcutaneously implanted in rats and after four months they were explanted and Ca^{2+} levels measured by atomic absorption spectroscopy.

Results: The Ca^{2+} levels were (in $\mu g/mg$): control (0 Gy) - 194.45; 50 Gy - 154.64; 100 Gy - 169.37; 200 Gy - 163.64; 500 Gy - 199.89; 1000 Gy - 184.02; 2000 Gy - 198.95; 5000 Gy - 227.95; 10000 Gy - 362.62. Gamma irradiation caused a significant effect on the biomechanical properties of the tissue.

Conclusion: Exposure to gamma irradiation did not reduce Ca^{2+} levels and caused a significant reduction in the tensile strength of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium.

Descriptors: Glutaral. Calcinosis. Gamma rays. Pericardium, radiation effects.

INTRODUÇÃO

Tecidos colágenos tratados com o glutaraldeído têm sido empregados na confecção de biopróteses cardíacas, entretanto, a calcificação tardia pós-implante constitui a causa predominante de sua falência.

O tratamento com o glutaraldeído não elimina todas as atividades metabólicas dos tecidos colágenos. Foi demonstrada uma retenção na atividade hidrolítica da enzima fosfatase alcalina da ordem de 10 a 75% [1], sugerindo o seu envolvimento no processo de calcificação.

A calcificação é um evento de múltiplas causas, onde fatores do hospedeiro, do implante e biomecânicos estão envolvidos, iniciando-se com a formação de cristais de hidroxiapatita nas membranas celulares, que contêm altas concentrações de fosfolípídeos e elevada atividade da enzima fosfatase alcalina [2].

O estudo da calcificação e de meios para controlá-la ou postergá-la tem sido o foco de pesquisas, nas últimas duas décadas [3-7], muitas das quais atuando na redução da atividade enzimática da fosfatase alcalina por extração ou inibição [8-15].

Não existem relatos na literatura sobre os efeitos da radiação gama na calcificação do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído, entretanto, alterações na conformação espacial da fosfatase alcalina induzidas pela radiação gama podem, em teoria, inibir a sua atividade enzimática e interferir no processo de calcificação.

O objetivo da presente investigação é avaliar o comportamento mecânico e os efeitos no processo de calcificação pós-implante do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, submetido a várias doses de radiação gama, comparando-os com o grupo controle não exposto à radiação.

MÉTODO

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, sendo selecionados, após uma limpeza inicial com retirada do tecido gorduroso peripericárdico, e transportados em solução salina de NaCl 0,9% e $MgSO_4$ 1,0 g, pH 7,4 a 4°C. No laboratório, o pericárdio bovino foi submetido a uma nova limpeza, selecionando-se 4 unidades com espessura e homogeneidade similares. Estes pericárdios foram emoldurados em suportes ovais plásticos de 15,0 x 12,0 cm.

Os pericárdios foram submetidos à fixação pelo glutaraldeído em solução aquosa a 0,5%, tamponado a pH 7,4 (tampão fosfato) e mantidos ao abrigo da luz, por 10 dias, a 4°C, com trocas da solução no 1º, 4º e 7º dias. Ao término do processo de fixação, os pericárdios foram retirados dos suportes plásticos, lavados em solução salina de NaCl 0,9%, sob agitação contínua, com várias trocas da solução, divididos em seis grupos e submetidos à ação da radiação gama. Grupo 1: 0 Gy - controle, grupo 2: 50 Gy, grupo 3: 100 Gy, grupo 4: 200 Gy, grupo 5: 500 Gy, grupo 6: 1000 Gy, grupo 7: 2000 Gy, grupo 8: 5000 Gy e grupo 9: 10000 Gy.

Determinação da radiosensibilidade da enzima fosfatase alcalina

Embora a fosfatase alcalina com atividade hidrolítica possa ser extraída de forma reprodutível no pericárdio bovino fresco, ela não pode ser detectada quimicamente após fixação com o glutaraldeído por 24 horas [16].

Tendo em vista essa dificuldade técnica, optou-se por avaliar a radiosensibilidade da fosfatase alcalina *in vitro*, em uma solução aquosa da enzima pura, com atividade conhecida e a atividade remanescente mensurada frente a várias doses de radiação gama. Esta solução foi fracionada em nove alíquotas, acondicionadas em recipientes de vidro e submetidas à radiação gama em gama-câmara (fonte: Co^{60} , atividade de 22413,1 x 10¹⁰ Bq e taxa de dose de 5010 Gy/h), nas seguintes doses contínuas: 0 Gy, 50 Gy, 100 Gy, 200 Gy, 500 Gy, 1000 Gy, 2000 Gy, 5000 Gy e 10000 Gy.

A atividade resultante da fosfatase alcalina em cada alíquota foi determinada pela formação do p-nitrofenol, com leitura da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 450 nm.

Determinação da temperatura de encolhimento

A temperatura de encolhimento abrupto das amostras, que é temperatura 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.

Cinco amostras de cada grupo, cortadas em tiras de 3,0 x 1,0 cm e imersas em banho-maria com solução salina de NaCl 0,9%, foram dispostas de modo a apresentarem uma de suas extremidades fixa no fundo do aparelho e a outra submetida 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 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.

Controle da esterilidade

A esterilidade das amostras foi assegurada por meio de culturas em estufa a 25°C, por 14 dias, empregando-se como meios de cultura o Tioglicolato e o Sabouraud.

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 HNO₃ 2,5 M e enviadas para a determinação quantitativa do Ca²⁺ 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 Ca²⁺ foi expressa em µg por mg de tecido seco.

Implante em ratos

Vinte e sete ratos fêmeas Wistar, com idade média de 30 dias foram utilizados no experimento. Os animais foram obtidos no biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e a pesquisa aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa da instituição (protocolo 001/2005 - IPEN). 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, tricotomizados e amostras do tecido, medindo 2,0 x 1,5 cm, foram implantadas em duas lojas subcutâneas dissecadas na região dorsal, perfazendo um total de 6 amostras de cada grupo. Decorridos quatro meses, as amostras foram explantadas, dissecadas para retirada do tecido do hospedeiro, e lavadas em solução de NaCl 0,9%. Cinco amostras de cada grupo foram encaminhadas para determinação do conteúdo de Ca²⁺ e a remanescente foi avaliada pela microscópica óptica, empregando-se a coloração de vonKossa.

Análise estatística

Os dados foram calculados em média ± desvio-padrão. As diferenças entre as médias dos grupos foram testadas empregando-se o teste *t* Student. Os resultados foram considerados significativos quando *p* < 0,05.

RESULTADOS

Radiosensibilidade da enzima fosfatase alcalina

A inibição da atividade enzimática foi crescente com o incremento da dose de radiação gama empregada, obtendo-se uma redução superior a 98% da sua atividade inicial, com dose igual ou superior a 5000 Gy (Figura 1).

Microscopia óptica

Nas amostras irradiadas pré-implante, observou-se a preservação de uma estrutura colágena homogênea. Nas amostras explantadas, houve intensa calcificação em todos os grupos (Figura 2).

Temperatura de encolhimento

Em todas as amostras, a temperatura foi superior a 82°C (valor considerado adequado para o pericárdio bovino fixado), independente da dose de radiação empregada.

Comportamento mecânico

Ocorreram alterações significativas no comportamento mecânico dos tecidos irradiados que apresentaram maiores deformações e menores resistências, quando comparados ao grupo controle. As curvas tensão x deformação representativas de cada grupo são apresentadas na Figura 3.

Análise mineral

Não foi observada redução nos níveis de cálcio nas amostras irradiadas e houve um aumento significativo do conteúdo de Ca²⁺ nas amostras submetidas à dose de 10000 Gy, quando comparadas ao grupo controle (p < 0,05). Os resultados quantitativos de Ca²⁺ obtidos nas amostras dos diversos grupos, pré e pós-implante, são apresentados na Tabela 1.

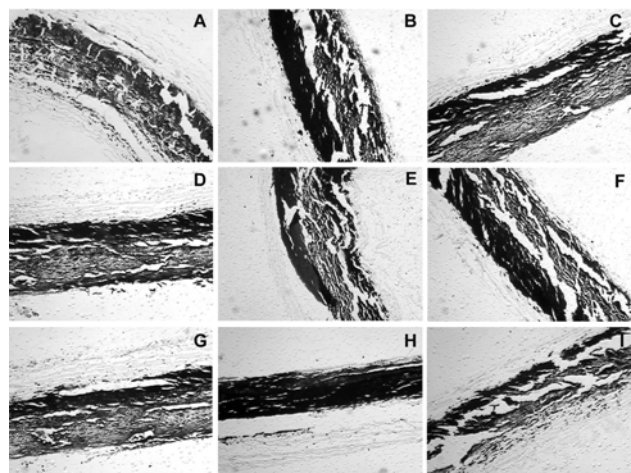


Fig. 1 - Micrografias das amostras de pericárdio bovino explantadas. A. 0 Gy; B. 50 Gy; C. 100 Gy; D. 200 Gy; E. 500 Gy; F. 1000 Gy; G. 2000 Gy; H. 5000 Gy; I. 10000 Gy - Von Kossa, Aumento 80 X.

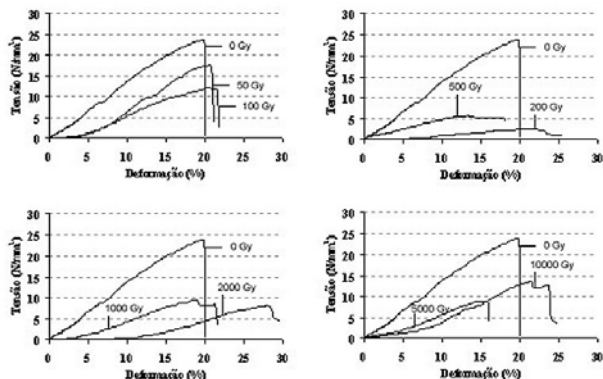


Fig. 2 - Curvas de tensão x deformação obtidas em função da dose de radiação gama empregada (0 Gy = controle).

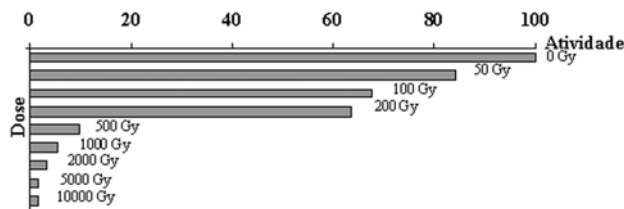


Fig. 3 - Atividade hidrolítica da enzima fosfatase alcalina em solução aquosa em função da dose de radiação gama empregada (n = 5).

Tabela 1. Dosagens de Ca²⁺ das amostras pré e pós-implante, obtidas em função da dose de radiação gama empregada.

Dose	Pré-Implante		Pós-Implante	
	Ca ²⁺ (µg/mg)	σ (µg/mg)	Ca ²⁺ (µg/mg)	σ (µg/mg)
0 Gy	0,66	0,02	194,45	19,50
50 Gy	0,77	0,04	154,64	34,36
100 Gy	0,64	0,04	169,37	30,77
200 Gy	0,75	0,02	163,64	27,55
500 Gy	0,73	0,02	199,89	81,97
1000 Gy	0,95	0,02	184,02	44,10
2000 Gy	0,66	0,03	198,95	49,95
5000 Gy	0,69	0,04	227,95	54,24
10000 Gy	0,78	0,02	362,62	20,27

DISCUSSÃO

Existem poucos relatos sobre os efeitos da radiação gama no colágeno, a maioria restrita ao colágeno fresco.

Cassel [17], empregando doses de 5 a 220 x 10⁴ JKg⁻¹, em pele bovina e tendão de cauda de canguru, observou decréscimo na temperatura de encolhimento e aumento na solubilidade e concluiu que a radiação gama causa a quebra das cadeias peptídicas.

Bowes e Moss [18] estudaram os efeitos da radiação gama no colágeno purificado obtido da cauda de bois. No colágeno irradiado em estado seco, observaram acentuada alteração na resistência à tração, mesmo em baixas doses, redução na temperatura de encolhimento e aumento na solubilidade. No colágeno irradiado em solução, observaram temperatura de encolhimento acima de 100 °C e discreto efeito na solubilidade.

Os efeitos da radiação gama na estrutura do colágeno tratado com glutaraldeído foram descritos por Grant et al. [19], que observaram uma marcante proteção contra os efeitos destrutivos da radiação gama com doses de até 25 x 10⁴ JKg⁻¹ pela microscopia eletrônica.

Hafeez et al. [20] estudaram as propriedades mecânicas do pericárdio bovino fresco submetido a radiação gama na dose de 25 kGy e observaram alterações nas propriedades mecânicas do tecido, com diminuição significativa na sua resistência.

Na nossa investigação, a fosfatase alcalina em solução aquosa mostrou-se altamente radiosensível e, embora o seu comportamento enzimático frente à radiação gama não tenha sido descrito anteriormente, os resultados obtidos eram esperados, visto que a inibição da atividade de outras enzimas com o emprego da radiação gama encontra-se descrita na literatura [21,22].

A integridade estrutural do colágeno fixado nas amostras pré-implante não foi alterada com o emprego de radiação gama, entretanto, houve uma alteração significativa no comportamento mecânico do tecido irradiado, quando comparado ao grupo controle, mesmo com o emprego de baixas doses de radiação. As deformações foram maiores e as resistências mecânicas menores do que as observadas no grupo controle e não proporcionais às doses empregadas.

Apesar da acentuada radiosensibilidade da enzima fosfatase alcalina, com redução na sua atividade inicial superior a 98%, na dose de 5000 Gy, não houve redução da calcificação no tecido irradiado e, na dose de 10000 Gy, houve aumento significativo dos níveis de Ca^{2+} ($362,61 \pm 20,27 \mu\text{g}/\text{mg} \times 194,45 \pm 19,50 \mu\text{g}/\text{mg}$ no grupo controle).

Embora os dados obtidos em uma solução aquosa da enzima pura não possam ser automaticamente transportados para o tecido fixado, pode-se inferir que a radiação gama não se comportou como um agente anticalcificante no pericárdio bovino tratado com glutaraldeído.

CONCLUSÕES

O emprego da radiação gama no pericárdio bovino tratado com glutaraldeído resultou em elevação dos níveis de Ca^{2+} em implantes subcutâneos em ratos por quatro meses e promoveu uma alteração significativa no comportamento mecânico do tecido, com redução na sua resistência, quando comparados ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

1. Levy RJ, Schoen FJ, Flowers WB, Staelin ST. Initiation of mineralization in bioprosthetic heart valves: studies of alkaline phosphatase activity and its inhibition by $AlCl_3$ or $FeCl_3$ preincubations. *J Biomed Mater Res.* 1991;25(8):905-35.

2. Schoen FJ, Levy RJ. Bioprosthetic heart valve calcification: membrane-mediated events and alkaline phosphatase. *Bone and Mineral.* 1992;17:129-33.
3. Soncini da Rosa GR, Costa FDA, Mesquita L, Costa ISEA. Estudo comparativo da eficácia do etanol e do ácido L-glutâmico na prevenção da calcificação das cúspides e parede aórtica porcina: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2002;17(2):40-51.
4. Nina VJS, Pomerantzeff PMA, Casagrande ISJ, Chung D, Brandão CMA, Nascimento SAB, et al. Endotelização in vivo das biopróteses cardíacas: preservação convencional versus não-aldeídica. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2004;19(2):144-51.
5. Costa JNL, Pomerantzeff PMA, Braile DM, Ramirez VA, Goissis G, Stolf NAG. Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2005;20(1):14-22.
6. Baucia JA, Leal Neto RM, Rogero JR, Nascimento N. Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído: comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2006;21(2):180-7.
7. Soncini da Rosa GR, Costa FDA, Vilani RGO, Souza FP, Reichert L, Costa ISEA. Utilização do etanol na prevenção da calcificação em heteroenxerto valvar pulmonar porcino: estudo experimental em ovinos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2006;21(3):304-13.
8. Webb CL, Schoen FJ, Flowers WE, Alfrey AC, Horton C. Inhibition of mineralization of glutaraldehyde-pretreated bovine pericardium by $AlCl_3$. Mechanisms and comparisons with $FeCl_3$, $LaCl_3$ and $Ga(NO_3)_3$ in rat subdermal model studies. *Am J Pathol.* 1991;138(4):971-81.
9. Pathak YV, Boyd J, Levy RJ, Schoen FJ. Prevention of calcification of glutaraldehyde pretreated bovine pericardium through controlled release polymeric implants: studies of Fe^{3+} , Al^{3+} , protamine sulphate and levamisole. *Biomaterials.* 1990;11(9):718-23.
10. Hirsch D, Drader J, Pathak YV, Yee R, Schoen FJ, Levy RJ. Synergistic inhibition of the calcification of glutaraldehyde pretreated bovine pericardium in a rat subdermal model by $FeCl_3$ and ethanedihydroxydiphosphonate: preincubation and polymeric controlled release studies. *Biomaterials.* 1993;14(9):705-11.
11. Webb CL, Flowers WE, Boyd J, Rosenthal EL, Schoen FJ, Levy RJ. Al^{3+} binding studies and metallic cation effects on bioprosthetic heart valve calcification in the rat subdermal model. *ASAIO Trans.* 1990;36(2):56-9.
12. Webb CL, Flowers WE, Horton C, Schoen FJ, Levy RJ. Long-term efficacy of Al^{3+} for prevention of bioprosthetic heart valve calcification. *ASAIO Trans.* 1990;36(3):M408-10.

-
13. Hirsch D, Schoen FJ, Levy RJ. Effects of metallic ions and diphosphonates on inhibition of pericardial bioprosthetic tissue calcification and associated alkaline phosphatase activity. *Biomaterials*. 1993;14(5):371-7.
 14. Nimni ME, Ertl D, Villanueva J, Nimni BS. Inhibition of ectopic calcification of glutaraldehyde crosslinked collagen and collagenous tissues by a covalently bound diphosphonate (APD). *Am J Cardiovasc Pathol*. 1990;3(3):237-45.
 15. Johnston TP, Schoen FJ, Levy RJ. Prevention of calcification of bioprosthetic heart valve leaflets by Ca²⁺ diphosphonate pretreatment. *J Pharm Sci*. 1988;77(9):740-4.
 16. 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.
 17. Cassel JH. Effects of gamma radiation on collagen. *J American Leather Chemists' Assoc*. 1959;54:432-49.
 18. Bowes JH, Moss JA. The effect of gamma radiation on collagen. *Radiat Res*. 1962;16:211-23.
 19. Grant RA, Cox RW, Kent CM. The effects of gamma irradiation on the structure and reactivity of native and cross-linked collagen fibres. *J Anat*. 1973;115(Pt 1):29-43.
 20. Hafeez YM, Zuki AB, Yusof N, Asnah H, Loqman MY, Noordin MM, et al. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on biomechanical properties of bovine pericardium. *Cell Tissue Bank*. 2005;6(2):85-9.
 21. Nascimento N, Seebart CS, Francis B, Rogero JR, Kaiser II. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon*. 1996;34(1):123-31.
 22. Kopp PM, Read JF, Charlesby A. Comparison of the effect of alpha-and-gamma-radiation on an enzyme. *Nature* 1966;211(5052):959-60.