

Ácido L-glutâmico na prevenção da calcificação de pericárdio bovino fixado em glutaraldeído: estudo em ratos

L-glutamic acid in the prevention of the calcification of bovine pericardial fixed in glutaraldehyde: study in rats

Andrea Dumsch de Aragon FERREIRA¹, Francisco Diniz Affonso da COSTA², Eduardo Antonio Andrade dos SANTOS³, Evandro Antonio SARDETO⁴, Carlos Henrique Gori GOMES⁵, Claudinei COLLATUSSO⁵, Sérgio Augusto Veiga LOPES⁴, Ângela PERRUZZO⁶, Iseu de Santo Elias Affonso da COSTA⁷

RBCCV 44205-905

Resumo

Objetivo: Avaliar a eficácia do ácido L-glutâmico na prevenção da calcificação do pericárdio bovino implantado no subcutâneo de ratos.

Método: Utilizaram-se 54 ratos Wistar, distribuídos em seis grupos, de acordo com o segmento de pericárdio bovino implantado. Inicialmente, todos os pericárdios foram fixados com glutaraldeído 0,5% por 72h. No grupo I, após a fixação, o pericárdio foi preservado em glutaraldeído 0,2% até o implante. O grupo II foi estocado em solução de Paraben. No grupo III e IV, após a fixação inicial, os pericárdios foram tratados com ácido L-glutâmico 8% com pH 7,4 e 3,5, respectivamente, sendo em seguida estocados em Paraben. Os grupos V e VI foram semelhantes aos grupos III e IV, exceto pela concentração do ácido L-glutâmico que foi de 0,8%. Os explantes foram feitos com 15, 30 e 60 dias, e as amostras submetidas à análise histológica com

hematoxilina-eosina e Von Kossa, além da mensuração de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica.

Resultados: A mensuração por espectrofotometria de absorção atômica demonstrou aumento progressivo da calcificação nos grupos I, II e III, aos 15, 30 e 60 dias. Nos grupos IV, V e VI, os níveis de cálcio permaneceram sem alteração nos períodos estudados. A análise microscópica demonstrou calcificação progressiva nos grupos I, II e III. Nos grupos IV, V e VI, a calcificação, quando observada, foi focal e de grau leve.

Conclusão: O uso do ácido L-glutâmico em segmentos de pericárdio bovino, fixados pelo glutaraldeído, foi efetivo na prevenção da calcificação, quando implantados no subcutâneo de ratos por até 60 dias.

Descritores: Ácido glutâmico. Glutaral. Pericárdio. Calcinosis.

1. Mestre; Cirurgiã Cardíaca do Serviço de Cirurgia Cardíaca da Santa Casa de Curitiba.

2. Livre Docente; Chefe do Serviço de Cirurgia Cardíaca da Santa Casa de Curitiba.

3. Médico Especialista em Radiologia da Santa Casa de Curitiba.

4. Mestre; Cirurgião Cardíaco da Santa Casa de Curitiba.

5. Especializando (Médico Residente em Cirurgia Cardíaca da Santa Casa de Curitiba).

6. Bioquímica Responsável da Cardioprótese.

7. Livre Docente; Médico Cirurgião Cardíaco da Santa Casa de Curitiba.

Trabalho realizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC PR, Curitiba, PR.

Endereço para correspondência:

Andrea Dumsch de Aragon Ferreira, Praça Rui Barbosa, 694 – Centro, Curitiba – PR. CEP 80010-030. Fone/Fax: 41 3232-0990.

E-mail: addumsch@yahoo.com.br

Artigo recebido em 21 de setembro de 2006

Artigo aprovado em 14 de julho de 2007

Abstract

Objective: To evaluate the efficiency of L-glutamic acid to prevent calcification of glutaraldehyde bovine pericardium implanted in rats' subcutaneous tissues.

Methods: Fifty four Wistar rats were divided in six groups according to the type of the bovine pericardium implanted. At first, all pericardia were initially cross-linked with 0.5% glutaraldehyd (GDA) fixative for 72 h. In Group I, after the initial fixation, the pericardia were preserved in 0.2% GDA fixative until the implantation, whereas in Group II they were stocked in Paraben solution. In Groups III and IV, after the initial fixation in 0.5% GDA fixative, the pericardia were treated with 8% L-glutamic acid at pH 7.4 and 3.5, respectively, being subsequently stocked in Paraben solution. Groups V and VI were similar to III and IV, except for the concentration of L-Glutamic acid which was 0.8%. Explantation was done at 15, 30, and 60 days, and the

specimens submitted to histological analysis with Hematoxylin and eosin (HE) and Von Kossa stains, besides calcium quantification with atomic spectrofotometry.

Results: Microscopic analysis demonstrated severe and progressive calcification in groups I, II, and III, whereas in groups IV, V, and VI calcification, when present, was mild and focal. Spectrofotometry confirmed these findings, revealing calcium contents of 1.93µg/mg of tissue at 60 days in the control group. Groups IV and VI showed the least calcium contents (0.063 e 0.066, respectively).

Conclusions: The use of L-glutamic acid in segments of bovine pericardium with glutaraldehyde fixative was effective in preventing the calcification when implanted in rats' subcutaneous up to 60 days.

Descriptors: Glutamic acid. Glutaral. Pericardium. Calcinosis.

INTRODUÇÃO

A fixação de próteses valvares com glutaraldeído (GDA) tem sido amplamente utilizada nas últimas três décadas [1]. Seu emprego contribui para a estabilização do colágeno e para a redução da rejeição [2]. Apesar disso, a calcificação das cúspides valvares tratadas com o GDA ainda representa a principal causa de falência destes implantes [3,4].

Alguns autores têm suposto que a fixação do tecido biológico pelo GDA, por si só, pode ser agente facilitador da calcificação, pois a liberação gradual do glutaraldeído monomérico pós-implante, a partir das rupturas de ligações de glutaraldeído polimérico, resulta em efeito citotóxico, inibindo o processo de proliferação endotelial, expondo resíduos celulares ricos em fosfolipídios que comprovadamente funcionam como sítios primários do processo de calcificação, devido à grande polaridade da molécula de GDA monomérica [3-9].

Em vista disto, diversos tratamentos químicos alternativos, visando a diminuir ou retardar o processo de calcificação, têm sido propostos.

Estudos experimentais demonstraram que o tratamento do pericárdio bovino com o ácido L-glutâmico, previamente fixado em GDA, melhorou sua biocompatibilidade, por neutralizar os efeitos tóxicos do glutaraldeído, reduzindo de forma significativa a calcificação. Além disto, o pH ácido favorece a despolimerização do glutaraldeído polimérico, facilitando a saída do tecido de moléculas monoméricas não ligadas [4,8].

A aplicação de um método eficiente na produção de biopróteses é desejável, pois poderia levar ao aumento da durabilidade e, conseqüentemente, diminuir a necessidade

de reoperações, particularmente em países em desenvolvimento, nos quais o emprego de próteses biológicas é mais freqüente.

O objetivo deste trabalho foi analisar a eficácia do ácido L-glutâmico nas concentrações 0,8% e 8%, e com variação de pH entre pH 3,5 (ácido) e pH 7,4 (fisiológico), na prevenção da calcificação de segmentos de pericárdio bovino fixados em GDA e implantados na tela subcutânea de ratos jovens.

MÉTODO

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Operatória da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), no Laboratório da Cardioprótese Ltda, no Laboratório de Patologia Clínica da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba e no Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento (LACTEC).

O Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUC-PR aprovou este experimento, sob o registro na CEPA/PUC-PR número 62.

Foram utilizados 54 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, com idade média de $33,0 \pm 3$ dias e peso médio de $90,0 \pm 4$ g.

Os animais foram divididos em 6 grupos (I, II, III, IV, V e VI), com nove animais cada, conforme o tratamento químico do pericárdio bovino implantado (Tabela 1).

Cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos, de acordo com o tempo de evolução pós-operatória por ocasião da eutanásia dos animais para o explante dos segmentos do pericárdio bovino, com 15, 30 e 60 dias (Tabela 2).

Tabela 1. Classificação do grupo de acordo com o tratamento químico dos segmentos de pericárdio bovino

Grupo	Tempo I Fixação do tecido	Tempo 2 Tratamento adicional	Tempo 3 Estocagem
I	Fixados em GDA 0,5% por 72h	-	Solução de GDA 0,2%, pH 7,4
II	Fixados em GDA 0,5% por 72h	-	SSI com Paraben
III	Fixados em GDA 0,5% por 72h	Ácido L-glutâmico 0,8%, pH 7,4 em água destilada por 48h	SSI com Paraben
IV	Fixados em GDA 0,5% por 72h	Ácido L-glutâmico 0,8%, pH 3,5 em água destilada por 48h	SSI com Paraben
V	Fixados em GDA 0,5% por 72h	Ácido L-glutâmico 8%, pH 7,4 em água destilada por 48h	SSI com Paraben
VI	Fixados em GDA 0,5% por 72h	Ácido L-glutâmico 8%, pH 3,5 em água destilada por 48h	SSI com Paraben

GDA – Glutaraldeído; SSI – Solução Salina Isotônica

Tabela 2. Distribuição dos subgrupos do estudo de acordo com o tempo de explante

Grupos	Tempo de observação	Subgrupo
I GDA *(GDA) n=9	15 dias	1A n=3
	30 dias	1B n=3
	60 dias	1C n=3
II GDA **(Paraben) n=9	15 dias	1A n=3
	30 dias	1B n=3
	60 dias	1C n=3
III ***AG 0,8% pH 7,4 n=9	15 dias	1A n=3
	30 dias	1B n=3
	60 dias	1C n=3
IV AG 0,8% pH 3,5 n=9	15 dias	1A n=3
	30 dias	1B n=3
	60 dias	1C n=3
V AG 8% pH 7,4 n=9	15 dias	1A n=3
	30 dias	1B n=3
	60 dias	1C n=3
VI AG 8% pH 3,5 n=9	15 dias	1A n=3
	30 dias	1B n=3
	60 dias	1C n=3

*GDA (*GA) – Armazenado em glutaraldeído; ** GA (Paraben) – Armazenado em Paraben; ***AG – Ácido glutâmico

Obtenção do pericárdio bovino

Os pericárdios bovinos foram obtidos em frigorífico de animais em idade de abate comercial, logo após o seu sacrifício. Estes foram dissecados e liberados da gordura mediastínica e pleural, lavados e transportados em solução gelada de Ringer Lactato a 4°C até o laboratório, onde foram processados.

Procedimentos químicos

Em todos os grupos, os segmentos de pericárdio foram previamente fixados em GDA a 0,5% em solução tampão fosfato, com pH = 7,4, por 72 horas, em temperatura ambiente (fixação padrão). Após esta fase, foi realizado o tratamento dos segmentos de pericárdio de forma diferente entre os grupos (Tabela 1).

O grupo I ou grupo controle recebeu o tratamento convencional empregado em biopróteses comercialmente disponíveis, isto é, após a fixação inicial com GDA a 0,5%, foi estocado em solução tamponada com GDA a 0,2%. Os pericárdios do grupo II foram fixados de forma igual ao grupo I, diferindo deste apenas na sua estocagem, que foi feita em solução com Paraben. No grupo III, após serem fixados em GDA 0,5%, os segmentos pericárdicos foram tratados com solução tamponada contendo ácido L-glutâmico 0,8% com pH = 7,4, por 48 horas, sendo posteriormente armazenados em SSI com Paraben. No grupo IV, após a mesma fixação, os segmentos pericárdicos foram tratados com solução de ácido L-glutâmico a 0,8% com pH=3,5 por 48 horas, sendo posteriormente armazenados em SSI com Paraben.

Os grupos V e VI foram tratados de forma semelhante, após fixação, os segmentos pericárdicos foram mantidos

em solução de ácido L-glutâmico a 8%, diferindo apenas no pH (grupo V pH=7,4 e grupo VI pH=3,5).

Técnica operatória

Foi praticada incisão de aproximadamente 2cm na região dorsal e confeccionada loja subcutânea para o implante do pericárdio bovino sob a pele do animal.

Observação pós-operatória

Os ratos foram marcados com canetas demográficas e colocados em gaiolas apropriadas. Em cada gaiola ficaram cinco animais. Os ratos foram mantidos no biotério, sendo submetidos à eutanásia com 15, 30 e 60 dias, com dose letal de tiopental sódico, 400 mg/kg, por via intraperitoneal. Posteriormente, foi realizada incisão longitudinal na região dorsal e remoção dos implantes para análise microscópica e mensuração do cálcio por espectroscopia de absorção atômica com atomização em chama.

Análise microscópica

Os explantes foram fixados em solução de formalina a 10% e encaminhados para análise microscópica. O exame histológico foi realizado por um mesmo observador, sem conhecimento do grupo ao qual pertencia o espécime.

A avaliação da calcificação distrófica foi então realizada por meio de microscópio tetraocular (American Optical x8), com a coloração de HE (hematoxilina-eosina) e classificada em quatro níveis, de acordo com o percentual da peça comprometido por calcificação (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação da calcificação distrófica

Graus de calcificação	
1	Classificação distrófica compreendendo 0-10% da superfície da peça
2	Classificação distrófica compreendendo 10%-30% da superfície da peça
3	Classificação distrófica compreendendo 30%-70% da superfície da peça
4	Classificação distrófica compreendendo mais de 70% da superfície da peça

Mensuração do cálcio

A determinação quantitativa do cálcio foi realizada por espectroscopia de absorção atômica, com espectrômetro Perkin Elmer®, 4100.

A quantidade total de cálcio foi expressa em miligramas por amostra e extrapolada para µg/mg de tecido pré-implantado. Deste modo, foi possível estimar a quantidade

de cálcio incorporada por miligrama de tecido seco implantado e não do tecido seco explantado, cujo peso reflete não só na quantidade de cálcio incorporada, como também a infiltração das células do hospedeiro.

Análise estatística

As variáveis, tanto a quantificação de cálcio por espectroscopia de absorção atômica, quanto a análise da calcificação distrófica, foram inicialmente submetidas à avaliação de sua distribuição por meio de testes de normalidade, coeficiente de variação e análise de histogramas.

Para avaliar as possíveis diferenças existentes entre os seis grupos nos índices de calcificação distrófica foi aplicado o modelo de Análise da Variância (ANOVA) de Kruskal-Wallis e de Friedman, considerando a distribuição assimétrica das variáveis e ausência de homocedasticidade entre os grupos.

Para todos foram utilizados os testes bicaudais, considerando que as diferenças poderiam estar distribuídas para ambos os lados da curva, com nível de significância mínimo de 5%. O tamanho da amostra foi estimado considerando um erro de tipo I de 5% (alfa) e erro do tipo II de 10%.

RESULTADOS

Análise da calcificação nos grupos de estudo por espectroscopia de absorção atômica

Grupo I ou controle - O grupo controle apresentou calcificação progressiva conforme o dia de sacrifício dos animais (Tabela 4).

Grupo II - No grupo II, também se pode observar calcificação progressiva ao longo do tempo, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p = 0,11$) em relação ao grupo I (Tabela 4, Figura 1).

Grupo III - Os pericárdios do grupo III também apresentaram calcificação progressiva (Tabela 4).

Grupo IV - No grupo IV, observou-se significativa redução da calcificação do pericárdio, mesmo após 60 dias de permanência na tela subcutânea dos animais, com diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos I ($p = 0,001$), grupo II ($p = 0,01$) e grupo III ($p = 0,008$) - Tabela 4.

Grupo V - No grupo V, observaram-se níveis de calcificação significativamente diferentes dos grupos I ($p = 0,04$), II ($p = 0,001$) e III ($p = 0,03$) e em menor proporção em relação ao grupo IV ($p = 0,09$) - Tabela 4.

Grupo VI - No grupo VI, os resultados foram tão satisfatórios quanto o grupo IV, não havendo tendência de calcificação aos 60 dias (Tabela 4).

Tabela 4. Calcificação atômica (espectroscopia de absorção atômica, em microgramas) aos 15, 30 e 60 dias

Grupo	Rato	15 dias	30 dias	60 dias
Grupo I	R1	0,520	1,250	1,500
	R2	0,600	0,840	2,100
	R3	0,410	1,200	2,200
Média		0,510	1,096	1,933
Grupo II	R1	0,270	0,750	3,400
	R2	0,190	1,300	3,300
	R3	0,200	1,500	1,400
Média		0,220	1,183	2,700
Grupo III	R1	0,350	0,700	1,500
	R2	0,300	1,500	0,400
	R3	0,150	0,200	1,800
Média		0,266	0,8	1,233
Grupo IV	R1	0,110	0,005	0,070
	R2	0,009	0,080	0,070
	R3	0,012	0,100	0,050
Média		0,043	0,061	0,063
Grupo V	R1	0,015	0,006	0,200
	R2	0,009	0,008	0,070
	R3	0,012	0,030	0,800
Média		0,013	0,014	0,356
Grupo VI	R1	0,007	0,008	0,070
	R2	0,007	0,011	0,060
	R3	0,006	0,007	0,070
Média		0,006	0,008	0,066

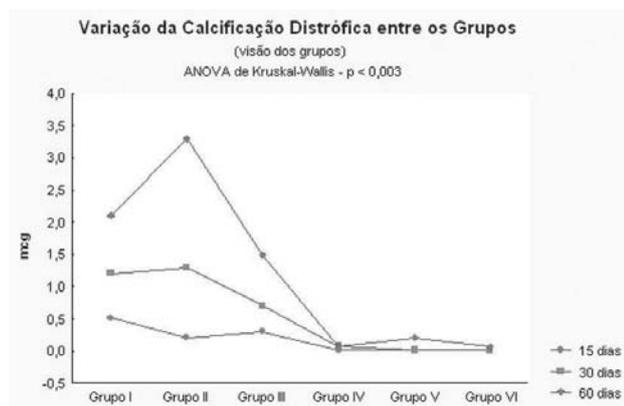


Fig.1 - Calcificação em 60 dias após implante - fotomicrografia mostrando os graus de calcificação do pericárdio bovino de acordo com os tratamentos empregados nos grupos I, II, III, IV, V e VI, com 60 dias de implante na tela subcutânea dos animais. (HE 40x)

Análise microscópica (histológica) da calcificação distrófica nos grupos de estudo

Com 15 dias de sacrifício dos animais

A análise microscópica confirmou os dados obtidos pela espectroscopia de absorção atômica. Após 15 dias, os pericárdios dos grupos I, II e III já evidenciavam calcificação distrófica, mais acentuadamente na porção central do tecido. Já nos grupos IV, V e VI, a calcificação esteve ausente ou era de intensidade mínima e de caráter focal.

Com 30 dias de sacrifício dos animais

Com 30 dias, verificou-se que, de forma semelhante ao que se observou aos 15 dias, a calcificação compreendendo maiores taxas percentuais de tecido ocorreu com maior frequência nos grupos I, II e III, enquanto que, nos grupos IV, V e VI, a calcificação ocorreu no seu grau mais leve (0-10% da peça).

Com 60 dias de sacrifício dos animais

Com 60 dias, verificou-se que, de forma semelhante do que se observou aos 15 e 30 dias, a calcificação compreendendo maiores taxas percentuais de tecido ocorreu com maior frequência nos grupos I, II e III, enquanto que, nos grupos IV, V e VI, a calcificação ocorreu no seu grau mais leve (0-10% da peça) - Figura 2.

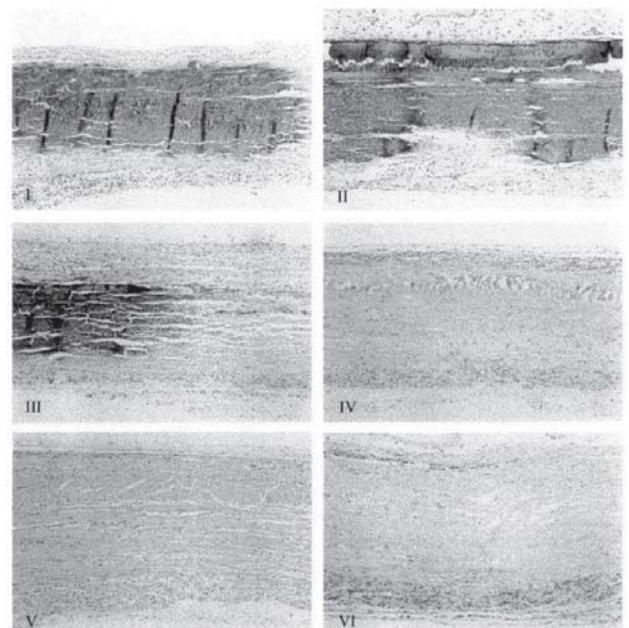


Fig. 2 - Fotomicrografia mostrando os graus de calcificação do pericárdio bovino de acordo com os tratamentos empregados nos grupos I, II, III, IV, V e VI com 60 dias de implante na tela subcutânea dos animais (HE 40x)

O conjunto de gráficos da Figura 3 ilustra a evolução em cada grupo, segundo o tempo da eutanásia dos animais, evidenciando a redução progressiva da extensão da calcificação distrófica do segmento pericárdico, de acordo com o tratamento aplicado (Figura 3).

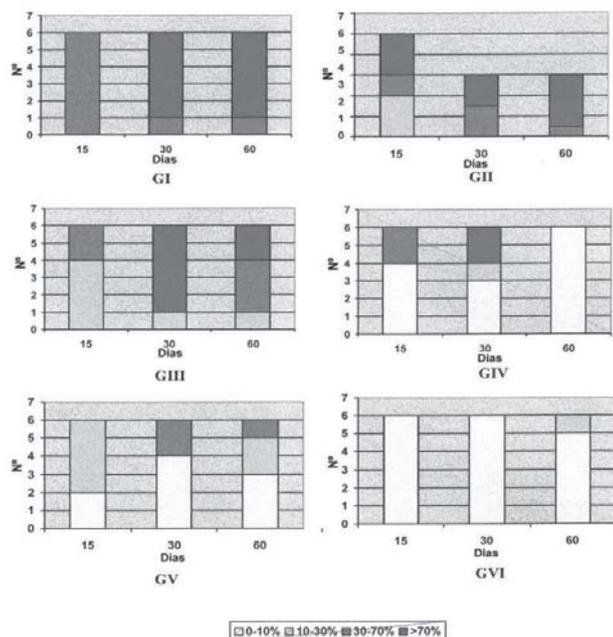


Fig. 3 – Gráficos ilustrando a distribuição do grau de calcificação distrófica de acordo com os diferentes tipos de tratamento aplicados ao segmento pericárdico e de acordo com o tempo de sacrifício dos animais

DISCUSSÃO

Leukauf et al. [10] analisaram os efeitos do tratamento com ácido L-glutâmico em pericárdios bovinos previamente fixados pelo GDA. Observaram que a sementeira “*in vitro*” de células endoteliais sobre tecidos não tratados resultava em morte dessas células em menos de 48 horas, enquanto que nos tecidos tratados com ácido glutâmico houve adequada proliferação celular, porém com baixa aderência ao tecido subjacente. No mesmo estudo, os autores fizeram o implante de enxertos tubulares de pericárdio bovino em artérias carótidas de carneiros. Verificaram que, nos tratados somente com GDA, a superfície interna estava recoberta por camada de fibrina, com trombos contendo plaquetas e macrófagos, e apenas raras células endoteliais. Já nos enxertos tubulares tratados com ácido L-glutâmico, houve reendotelização parcial, inclusive com produção de matriz extracelular, indicando melhor biocompatibilidade do tecido tratado [10].

Em um trabalho subsequente, Grimm et al. [8] analisaram a efetividade do tratamento com ácido L-glutâmico na

prevenção da calcificação de pericárdios bovinos fixados em GDA. Fragmentos de pericárdio implantados na tela subcutânea de ratos Sprague-Dawley, por períodos de até 63 dias, evidenciaram significativa redução, não somente da reação inflamatória, como também da calcificação distrófica. Nos explantes tardios, com mais de 60 dias, o nível de cálcio nos pericárdios convencionais foi de 1,69 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido, enquanto naqueles tratados com ácido L-glutâmico foi de apenas 0,13 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido [8]. Esses valores são semelhantes aos encontrados neste estudo, nos quais os pericárdios do grupo controle apresentaram 1,93 μg de cálcio/mg de tecido, enquanto que nos pericárdios dos grupos IV e VI, onde o tratamento com ácido L-glutâmico se mostrou mais efetivo, os níveis de cálcio foram de 0,066 e 0,063 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido nos enxertos explantados com 60 dias. Nos grupos III e IV, o ácido L-glutâmico foi empregado em concentrações idênticas, ou seja, 0,8%, mas com pH diferente, observando-se que os resultados do grupo IV foram melhores (pH ácido).

Quando se avaliaram os resultados obtidos com a utilização de ácido L-glutâmico a 8% e pH 7,4 (grupo V), pode-se observar que com 60 dias, neste grupo, ocorreu maior grau de calcificação do que nos grupos IV e VI, pH 3,5; porém o grupo V apresentou resultados melhores do que os obtidos no grupo III, no qual a concentração do ácido foi dez vezes menor (0,8%).

Grimm et al. [8], em seus experimentos, também testaram o ácido L-glutâmico em solução tamponada e em pH ácido (3,5), e concluíram que as valvas preparadas em pH fisiológico (8,4) favorecem a incorporação significativa de polímeros de glutaraldeído no tecido. Estes polímeros são moléculas grandes e pesadas e que podem se decompor e servir como uma reserva contínua de aldeídos tóxicos. Sendo assim, o ácido glutâmico no pH fisiológico compromete o seu potencial anticalcificante, pois a ligação química ácido-base é instável [8].

O benefício observado com o emprego de um pH mais ácido (3,5), provavelmente, resulta de dois mecanismos independentes: a) o meio ácido durante a exposição ao ácido L-glutâmico favorece a formação de aldeídos monoméricos, que são moléculas menores e mais leves, facilitando a lavagem e remoção do tecido; b) quando ocorre a ligação química entre o ácido e o aldeído, há transformação em éster e acetato, evitando que aldeído tóxico livre seja liberado no tecido.

Neste estudo, ficou evidente a redução significativa dos níveis de calcificação obtido com o tratamento do segmento pericárdico com ácido L-glutâmico.

Estudos devem ser feitos para evidenciar se a ação anticalcificante do ácido L-glutâmico mantém-se em biopróteses de pericárdio bovino, implantadas no sistema circulatório.

CONCLUSÕES

O tratamento de segmentos de pericárdio bovino com solução de 0,8% de ácido L-glutâmico em pH 3,5, fixados pelo GDA, foi efetivo na prevenção da calcificação quando implantados na tela subcutânea de ratos jovens, por até 60 dias. O tratamento com 8% de ácido L-glutâmico em pH 3,5 também se mostrou efetivo, porém o ácido L-glutâmico nesta concentração pode ser tóxico a outros tecidos. Sendo assim, para produção comercial de próteses cardíacas o melhor tratamento seria solução de 0,8% de ácido L-glutâmico com pH 3,5.

REFERÊNCIAS

1. Hendriks M, Everaerts F, Verhoeven M. Alternative fixation of bioprostheses. *J Long Term Eff Med Implants*. 2001;11(3-4):163-83.
2. Carpentier A, Lemaigre G, Robert L, Carpentier S, Dubost C. Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1969;58(4):467-83.
3. Nimni ME, Bernick S, Cheung DT, Ertl DC, Nishimoto SK, Paule WJ, et al. Biochemical differences between dystrophic calcification of cross-linked collagen implants and mineralization during bone induction. *Calcif Tissue Int*. 1988;42(5):313-20.
4. 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.
5. Schoen FJ, Levy RJ. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res*. 1999;47(4):439-65.
6. 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.
7. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg*. 2005;79(3):1072-80.
8. Grimm M, Eybl E, Grabenwoger M, Griesmacher A, Losert U, Bock P, 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.
9. Carpentier A, Blondeau P, Laurens P, Mancel P, Laurent D, Dubost C. Replacement of mitral and tricuspid valves by heterografts. *Ann Chir Thorac Cardiovasc*. 1968;7(1):33-8.
10. Leukauf C, Szeles C, Salaymeh L, Grimm M, Grabenwoger M, Losert U, et al. In vitro and in vivo endothelialization of glutaraldehyde treated bovine pericardium. *J Heart Valve Dis*. 1993;2(2):230-5.