



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DOUTORADO

CLAUDINEI COLLATUSSO

**ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DA DESCELULARIZAÇÃO COMO
METODOLOGIA ANTICALCIFICANTE EM BIOPRÓTESES DE
PERICÁRDIO BOVINO**

CURITIBA

2018

CLAUDINEI COLLATUSSO

**ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DA DESCELULARIZAÇÃO COMO
METODOLOGIA ANTICALCIFICANTE EM BIOPRÓTESES DE
PERICÁRDIO BOVINO**

Tese de doutorado apresentada ao
Curso de Pós Graduação da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná como
requisito para obtenção do título de
Doutor

Orientador: Luiz César Guarita-Souza

Co-orientador: Francisco Diniz
Affonso da Costa

CURITIBA

2018



PUCPR

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Escola de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 23 dias do mês de outubro de 2018 às 12hs e 30min., realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese "ANÁLISE DA EFICÁCIA DA DESCELULARIZAÇÃO COMO METODOLOGIA ANTICALCIFICANTE EM BIOPROTÊSES DE PERICÁRDIO BOVINO" apresentado por **Claudinei Collatusso** para obtenção do título de Doutora; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza – Presidente – (PUCPR)	
Prof. Dr. Felipe Francisco B. Tuon – (PUCPR)	
Prof. Dr. Rodrigo Mussi Milani – (PUCPR)	
Prof. Dr. Roberto Gomes de Carvalho – (HNSG)	
Prof. Dr. Fernando Ribeiro de Moraes Neto - (UFPE)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza	Conceito <u>APROVADO</u>
Prof. Dr. Felipe Francisco B. Tuon	Conceito <u>Aprovado</u>
Prof. Dr. Rodrigo Mussi Milani	Conceito <u>Aprovado</u>
Prof. Dr. Roberto Gomes de Carvalho	Conceito <u>Aprovado</u>
Prof. Dr. Fernando Ribeiro de Moraes Neto	Conceito <u>Aprovado</u>
	Parecer Final: <u>APROVADO</u>

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza Presidente da Banca Examinadora	Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena Coordenadora do PPGCS-PUCPR

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que sempre me incentivaram a lutar e seguir em frente. Tenho imensa gratidão por minha esposa Daniele, pelo apoio incondicional e incentivo durante toda a empreitada.

Ao Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa, pela minha formação em cirurgia cardiovascular, pelo constante incentivo que jamais me deixou desistir. Foi meu orientador no mestrado e doutorado e acima de tudo um grande amigo.

Ao Prof. Dr. Luiz César Guarita-Souza por ter aceito a empreitada na Orientação deste trabalho.

Ao Dr João Gabriel Roderjan, bioquímico e colega, pelo empenho e auxílio na execução deste projeto.

À todos os veterinários do Hospital de pequenos animais da PUCPR e da Fazenda Galha Azul, Ana Cristina Rangel de Abreu, Carolina Zaghi Cavalcante, Maria Christine Rizzon Cintra, Luiz Guilherme Capriglione, Rita Maria Venancia Mangrich Rocha, Cristina Santos Sotomaior, Rudiger Daniel Olhof, Eliane Mendonça, que juntos conduziram os experimentos e cuidaram de todos os animais envolvidos no estudo.

À equipe da Cardioprótese, Angela Maria Peruzzo, Marlene Tomen e Julia Diniz Affonso da Costa pelo preparo e montagem das próteses.

À equipe de laboratório Cesar Augusto Oleinik, Marina Heuschkel e Marco Augusto Stimimaglio.

À Dr^a Paula Hansen Sus pelo auxílio no desenvolvimento do projeto.

À Dr^a Lucia de Noronha pelos préstimos na análise anatomopatológica dos meus experimentos.

Ao Dr. Eduardo Mendel pela realização das avaliações ecocardiográficas.

RESUMO

Fundamentos: A descelularização tem sido descrita como um método alternativo para o processamento de tecidos biológicos com diminuição antigênicidade e resistência à calcificação. O objetivo deste estudo foi caracterizar as propriedades histológicas e biomecânicas do pericárdio bovino descelularizado fixado com 0,1% de glutaraldeído e avaliar os resultados das biopróteses construídas com este tecido quando implantados na posição mitral de carneiros jovens.

Métodos: Biopróteses mitrais foram confeccionadas com pericárdio bovino fresco fixado em glutaraldeído a 0,5% (grupo controle) ou pericárdio bovino descelularizado fixado em glutaraldeído a 0,1% (grupo estudo). Antes do implante, as amostras foram submetidas à histologia (Hematoxilina-Eosina, Movat e 4'. 6-diamidino-2-fenilindol-DAPI), análise bioquímica (ácido desoxirribonucleico residual e epitopos α -gal) e caracterização biomecânica. Dezesesseis animais foram incluídos no estudo e randomizados para cirurgia (n = 8 em cada grupo). As biopróteses foram implantadas como substituição da valva mitral por até 180 dias em ovelhas jovens e os explantes foram avaliados histologicamente, por estudos radiológicos e quantificação do teor de cálcio.

Resultados: O pericárdio descelularizado não implantado exibiu matriz extracelular bem preservada com ausência de células, redução de 77% nos níveis de ácido desoxirribonucleico e ausência de epítomos de α -gal detectáveis. Quando comparados aos controles, apresentaram menor resistência à tração e maior % de alongamento na direção longitudinal. Após 180 dias em posição mitral, as válvulas descelularizadas apresentavam folhetos flexíveis, sem sinais macroscópicos de calcificação. Histologicamente, os folhetos descelularizados apresentaram fibras colágenas intactas, melhor remodelamento tecidual e significativa redução de 89% no conteúdo de cálcio comparado ao grupo controle.

Conclusões: O pericárdio bovino descelularizado manteve a estrutura histológica e as propriedades biomecânicas. Sugere-se que biopróteses construídas com pericárdio bovino descelularizado fixado em baixa concentração de glutaraldeído foram resistentes à calcificação podendo, assim, melhorar a durabilidade a longo prazo do tecido.

Palavras-chave: Bioprótese, Calcificação, Descelularização, Pericárdio bovino

ABSTRACT

Background: Decellularization has been described as an alternative method for processing biological tissues with decreased antigenicity and resistance to calcification. The aim of this study was to characterize the properties of decellularized bovine pericardium fixed with 0.1% glutaraldehyde and to evaluate outcomes of bioprosthetic valves constructed with this tissue when implanted in the mitral position of juvenile sheep.

Methods: Bioprosthetic mitral valves were constructed with fresh bovine pericardium fixed in 0.5% glutaraldehyde (control group) or decellularized bovine pericardium fixed in 0.1% glutaraldehyde (study group). Before implantation, samples were submitted to histological (Hematoxylin-Eosin, Movat and 4'. 6-diamidino-2-phenylindole), biochemical (residual deoxyribonucleic acid and α -gal epitopes) and biomechanical characterization. Valves were implanted (n= 8 in each group) in the mitral valve position for 180 days in sixteen juvenile sheep and explants were re-evaluated histologically and for calcification with radiological studies and calcium content determination.

Results: Unimplanted decellularized pericardium exhibited a well-preserved extracellular matrix with absence of cells, a 77% reduction in deoxyribonucleic acid levels and with no detectable α -gal epitopes. When compared to controls, they had lower ultimate tensile strength and greater % elongation in the longitudinal direction. After 180 days, decellularized valves showed pliable leaflets without macroscopic signs of calcification. Histologically, decellularized leaflets had intact collagen fibers, better tissue remodeling and a significant 89% reduction in calcium content compared to the control group.

Conclusions: This study demonstrates that bioprosthetic valves constructed with decellularized bovine pericardium fixed in low glutaraldehyde concentration were resistant to calcification and have potential to improve their long-term durability.

Keywords: Bioprosthesis, Calcification, Decellularization, Bovine pericardium

LISTA DE SIGAS E ABREVIATURAS

EACTS- Sociedade Européia de Cirurgia Cardiotorácica

GA – Glutaraldeido

SDS – Dodecil sulfato de sódio

STS -Sociedade Americana de Cirurgia Cardiotorácica

α - Gal, - galactose-alpha1–3-galactose

Abreviaturas em inglês

Bp-base pairs

DAPI - 4'. 6-diamidino-2-phenylindole

ECC- extracorporeal circulation

GA – Glutaraldehyde

GAGS - glycosaminoglycans

HE – Hematoxilin-eosin

Mpa- Mega Pascal

PBS – phosphate buffer solutions

RVOT- right ventricular outflow tract

SDS -sodium dodecyl sulphate

SVD – structural valve disfunction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figure 1 - (A) - Stented bovine pericardium bioprosthetic valve fixed in 0.5% glutaraldehyde with no anticalcification treatment from the control group – (B) Same bioprosthetic valve but constructed with decellularized pericardium and fixed in low concentration (0.1%) glutaraldehyde used in the study group. 44
- Figure 2 - Histological evaluation with hematoxylin-eosin (HE), Russel-Movat (RM) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining of control (A, C, E) and decellularized valves (B, D, F). In comparison to the control group, decellularized valves had complete absence of visible cells but still with a well-preserved extracellular matrix. With DAPI staining, no visible cell nuclei and remnants of nuclear material could be detected in the decellularized pericardium. 45
- Figure 3 – Immunolabeling of α -gal epitopes showing positive green staining with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated B4 isolectin (A) and positive red staining with anti α 1,3 Gal M86 antibodies (C) in control valves. Decellularized valves (dCell) (B, D) were negative for these antigens epitopes. 46
- Figure 4 – Uniaxial tensile testing for comparison of biomechanical characteristics in control versus decellularized (dCell) valves both in the longitudinal (L) and transverse (T) direction of the fibers. (A) Stress/Strain curves for control and dCell pericardium. (B,C,D) Compared to controls dCell pericardium exhibited significantly lower ultimate tensile strength (UTS) ($p=0.04$), lower elastic modulus (E) ($p=0.01$) and a tendency greater % elongation ($p=0.06$) in the longitudinal direction. In the transverse direction, biomechanical parameters were similar between groups, the only significant difference being observed in the greater % elongation in the control pericardium ($p=0.02$). 47
- Figure 5 – Macroscopic and radiological assessment of explanted valves. Macroscopically, control valves (A, B) exhibited limited leaflet mobility and diffuse cusp calcifications. Exuberant pannus formation is clearly seen on the atrial surface (arrowhead). By contrast, decellularized (dCell) valves were mobile with no macroscopic signs of dystrophic calcification, pannus is limited to the sewing ring (D, E). Radiologically, all control valves demonstrated diffuse leaflet calcifications (solid arrow) (C). By contrast, decellularized valves (dCell) were mostly free of calcium, with only occasional small spotty calcium spikes at the top of the commissures (dotted arrow) (F). 48
- Figure 6 – Histological analysis of explanted valves. A) Hematoxylin-eosin (HE) staining 100X from a control valve demonstrating degenerated and calcified matrix. There is a dense neointimal formation in both sides. In the 400X augmentation a giant multinucleated cell indicating chronic rejection can be seen (arrow). B) HE staining 100X of a dCell valve showing a well-preserved matrix and much thinner neointimal formation. In the greater magnification 400X, endothelial-like cells are covering the leaflets. C) Russel – Movat (PRM) staining of the same specimen shown in A. D) Russel – Movat (PRM) of the same specimen in B. E) Polarized Picro-Sirius Red (PSR P) of a control valve showing fragmented and degenerated collagen fibers. Collagen type I is predominant. F) Polarized Picro-Sirius Red (PSR P) of a dCell valve showing well-preserved collagen fibers constituted by collagen types I and III. G) Alizarin Red (Alz) pH 4.2 (100X and 400X) of a control valve showing intense calcification due to calcium phosphate deposition. H) Alizarin Red (Alz) pH 4.2 (100X and 400X) of a dCell valve with absence of calcification. I) Alizarin Red (Alz) pH 7.0 (100X and 400X) of a control valve showing intense calcification due to calcium oxalate deposition. J) Alizarin Red (Alz) pH 7.0 (100X and 400X) showing of a dCell valve showing absence of calcium. 49
- Figure 7 – Calcium content as determined by atomic absorption spectrophotometry. There was an 89% reduction in calcium levels in decellularized (dCell) valves ($2.6 \pm 0.8 \mu\text{g}/\text{mg}$) when compared to controls ($21.7 \pm 5.7 \mu\text{g}/\text{mg}$) after 180 days in the mitral position of juvenile sheep ($p= 0.03$). 50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVO	12
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	12
4. DESENVOLVIMENTO	13
4.1 REVISÃO DE LITERATURA	13
4.2 ARTIGO	28
ABSTRACT	29
Introduction	30
Materials and Methods	31
Results	37
Discussion	40
Conclusions	42
References	51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

A doença valvar cardíaca, de diversas etiologias, tem alta prevalência na população mundial (AGUIARI et al.,2017). Quando a doença valvar é significativa, os pacientes evoluem com insuficiência cardíaca progressiva e necessitam de intervenção estrutural para restabelecer a função valvar e melhorar o prognóstico de vida. A proporção de cirurgias valvares tem aumentado nas últimas décadas, e estima-se que em torno de 300.000 operações valvares são realizadas anualmente em todo o mundo (ISAACS et al.,2015; PIBAROT et al.,2015).

Apesar do tratamento cirúrgico com operações conservadoras de plastia valvar ser preferível, frequentemente as alterações anatômicas são tão pronunciadas que necessitam substituição por próteses valvares cardíacas. Dentre as opções disponíveis, existem as próteses mecânicas e as biológicas, além de homo e auto-enxertos valvares. As próteses mecânicas são duráveis, porém apresentam maior risco de tromboembolismo e necessitam de terapia anticoagulante permanente e consequentemente associadas a maior incidência de complicações hemorrágicas. Já as próteses biológicas apresentam como maior desvantagem a sua durabilidade limitada, especialmente em crianças, adolescentes e adultos jovens (PIBAROT et al., 2015)

Dados das Sociedades Americana (STS) e Europeia (EACTS) demonstram que, na última década, houve aumento progressivo na utilização de próteses biológicas em detrimento do uso de próteses mecânicas. Apesar disso, ser decorrente do número crescente de pacientes idosos que estão sendo operados, os substitutos biológicos vêm sendo mais frequentemente empregados em pacientes abaixo de 65 anos para evitar as complicações tardias relacionadas com a anticoagulação. Essa tendência pode ser explicada pela expectativa de maior durabilidade decorrentes dos avanços tecnológicos no *“design* e novos tratamentos anticalcificantes das biopróteses atuais. Adicionalmente, a possibilidade de tratar próteses disfuncionantes por técnicas percutâneas, também tem sido argumento para justificar essa nova conduta (BOURGUIGNON et al., 2015; UNE et al., 2014).

A causa de disfunção de biopróteses é multifatorial. Inclui rotura mecânica pelo stress hemodinâmico, a reação imune de corpo estranho e o principal, a calcificação distrófica. Dentre as diversas estratégias mais comumente utilizadas com o intuito de

retardar a calcificação tecidual, incluem-se a neutralização de aldeídos residuais, modificações na metodologia de fixação tecidual, processos de detoxificação, remoção de fosfolípidos das membranas celulares e a descelularização dos tecidos. Tais metodologias têm sido empregadas, de forma isolada ou combinadas de forma sinérgica, na busca de maior efetividade (HERRERO et al., 2005; SCHOEN e LEVY., 2005)

Nosso grupo de pesquisa tem ampla experiência com o emprego de descelularização como método alternativo de processamento tecidual de enxertos cardiovasculares. Numa primeira fase demonstramos, experimentalmente, que a descelularização de homoenxertos valvares reduziu de forma significativa a sua antigenicidade e possibilitou seu repovoamento “*in vitro*” após o implante (Da Costa et al., 2004). Subsequentemente, iniciamos nossa experiência clínica com homoenxertos descelularizados a partir de 2005, e os resultados têm sido publicados de forma sequencial em periódicos nacionais e internacionais. O acompanhamento seriado dos pacientes, com até 12 anos de evolução, tem demonstrado resultados bastante satisfatórios, sendo que a ausência de calcificação, mesmo em crianças e adultos jovens, tem sido um achado expressivo e consistente de nossa casuística. (DA COSTA et al., 2010, 2014, 2017, 2018)

Como decorrência natural, nos pareceu apropriado testar a eficácia desta tecnologia como método anticalcificante em enxertos cardiovasculares construídos a partir de tecidos heterólogos. Remendos de pericárdio bovino, descelularizados e fixados em glutaraldeído (GA), foram implantados no subcutâneo de ratos e ficaram livres de calcificação com até 90 dias de observação. A mesma efetividade foi demonstrada com o implante de tubos valvados de pericárdio bovino e com próteses pulmonares porcinas, quando implantadas na via de saída do ventrículo direito de carneiros jovens. (COLLATUSSO et al., 2012, 2011).

Como parte de um protocolo pré-clínico, este estudo tem por intenção testar a eficiência da descelularização num modelo ainda mais robusto e desafiador, fazendo o implante de próteses valvares de pericárdio bovino em posição mitral de ovinos jovens por até 180 dias de evolução.

2. JUSTIFICATIVA

Esse projeto tem como justificativa, colaborar com o desenvolvimento de uma metodologia de preservação tecidual que permita a construção de biopróteses valvares cardíacas biológicas mais duráveis e resistentes a degeneração calcifica distrófica.

Para tanto, duas modificações essenciais foram introduzidas no preparo das membranas de pericárdio: a) antes da fixação tecidual, os pericárdios foram descelularizados com solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0.1% e b) a fixação tecidual foi feita com baixas concentrações de GA.

Apesar de já termos demonstrado a eficiência desta metodologia no modelo subcutâneo de ratos e em tubos valvados implantados na via de saída do ventrículo direito, escolhemos o uso de próteses montadas em anel de suporte e implantadas em posição mitral de ovinos jovens, porque nesta situação o tecido biológico fica sujeito a maiores estresses hemodinâmicos e se calcificam de forma mais intensa e acelerada.

3. OBJETIVO

Avaliar a eficácia da descelularização com solução de SDS 0.1% e fixação em baixa concentração de GA como metodologia anticalcificante em próteses de pericárdio bovino montadas em anel de suporte e implantadas em posição mitral de carneiros jovens por até 180 dias de evolução.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

3.1.1. Caracterização morfológica, histoquímica e biomecânica de pericárdios bovinos descelularizados com SDS 0.1% e fixados em GA 0.1%.

3.1.2 Avaliação do comportamento biológico e da calcificação de biopróteses de pericárdio bovino descelularizados e fixados em baixa concentração de GA quando comparados com próteses convencionais de pericárdio bovino fixadas em GA 0.5%, implantadas em posição mitral de ovinos jovens por até 180 dias.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 REVISÃO DE LITERATURA

A cirurgia para substituição valvar, introduzida no início da década de 60, propiciou grande avanço no tratamento das valvopatias. O substituto valvar ideal deveria mimetizar as características da valva nativa normal, ou seja, apresentar bom desempenho hemodinâmico, durável, e não ser trombogênica. (PIBAROT et al., 2009).

Em 1965 Carpentier realizou o primeiro implante de prótese aórtica de origem porcina em humanos. Os resultados iniciais demonstraram elevada taxa de falência em decorrência de reação imunológica, e apenas 45% dos pacientes ficaram livres de disfunção em apenas um ano de evolução. Com o intuito de reduzir a resposta imune desfavorável, foi introduzida a fixação de tecidos heterólogos com GA, o que aumentou a taxa de sucesso para 82% após um ano de seguimento. Subsequentemente estas próteses passaram a ser produzidas comercialmente e empregadas em maior escala a nível mundial. (CARPENTIER, A. et al., 1969).

As biopróteses de pericárdio bovino, introduzidas por Ionescu em 1972, apresentavam as mesmas características favoráveis das próteses porcinas, porém com a vantagem de um desempenho hemodinâmico mais adequado (IONESCU et al., 1972). Após um período de entusiasmo, essas próteses foram abandonadas por apresentarem elevada disfunção estrutural tardia por rotura tecidual junto a região comissural em decorrência de fadiga mecânica (WALLEY et al., 1992). Entretanto, modificações no “*design*” da construção de próteses de pericárdio bovino eliminaram essa complicação, e seu uso foi retomado com sucesso a partir da década de 80. (COSGROVE et al., 1995).

Os resultados tardios com as próteses biológicas de terceira geração demonstram que sua durabilidade é satisfatória em pacientes com idade superior a 65 anos, entretanto, a incidência de calcificação e disfunção estrutural primária nos mais jovens ainda é problemática. Bourguignon et al (2015) demonstraram que a incidência de disfunção estrutural primária de próteses aórticas Perimount Magna® (Edwards Lifesciences) foi de 91% aos 20 anos de evolução em pacientes com idade superior a 70 anos. Entretanto, para pacientes entre 60 e 70 anos de idade apenas 53% dos

pacientes ficaram livre de disfunção e naqueles abaixo de 60 anos apenas 37% estavam livres desta complicação. A análise mais aprofundada desta casuística sugere que estes dados possam estar subestimados, visto que nas curvas atuarias livres de evento todos os óbitos foram censurados e apenas 3% da população original estava disponível para análise aos 20 anos. Adicionalmente, nos pacientes abaixo de 60 anos, considerando os riscos competitivos de morte e reoperações por disfunção estrutural, aproximadamente 40% destes pacientes morreram ou foram reoperados em decorrência de disfunção estrutural com apenas 10 anos de evolução.

Une et al (2014) estudaram a evolução de biopróteses porcinas tipo Hancock II® (Medtronic) em pacientes com idade inferior a 60 anos. Seus resultados confirmaram que a idade dos pacientes tem correlação direta com a durabilidade. As análises atuarias demonstraram que aos 20 anos de evolução, 41% dos pacientes com idade superior a 50 anos estiveram livres de disfunção estrutural primária, enquanto esses índices foram de apenas 21% e 14% nos pacientes entre 40-49 anos e abaixo de 40 anos, respectivamente.

Por sua vez, Saleeb et al (2015) analisaram os resultados em 27 pacientes com idade inferior a 30 anos e que foram submetidos ao implante de próteses aórticas Mitroflow LXA® e Edwards Magna Ease™ e observaram que aos 5 anos de evolução, apenas 18% dos pacientes apresentavam próteses normofuncionantes.

A degeneração tecidual acompanhada de calcificação distrófica das próteses biológicas é multifatorial e inclui a presença de aldeídos tóxicos residuais, fragmentação do colágeno em decorrência dos estresses mecânicos e reação imunológica contra antígenos presentes nas membranas celulares e na matriz extracelular. As características histológicas do tecido empregado, incluindo a quantidade e distribuição das fibras colágenas e elásticas, a composição dos glicosaminoglicanos e quantidade de fosfolípidos também estão diretamente relacionados com a durabilidade tecidual. Além disso, fatores relacionados ao hospedeiro, tais como a idade do receptor, localização do implante, contato com a corrente sanguínea e condições pressóricas também exercem influência significativa na velocidade do processo degenerativo. (SCHOEN E LEVY., 2005).

Flameng et al (2006) sugeriram que a avaliação pré-clínica de novos métodos anticalcificantes deva ser feita em quatro passos sequenciais: estudos morfológicos de válvulas tratadas e não implantadas, implante heterotópico em tecido celular subcutâneo de ratos, os quais são mais rápidos e baratos, seguidos de estudos

biomecânicos, hemodinâmica e durabilidade e finalmente o implante em modelos circulatórios em grandes animais. Dentre estes últimos, o implante ortotópico em posição pulmonar, aórtica e/ou mitral de ovinos jovens é o mais recomendado.

Em decorrência da multiplicidade de fatores envolvidos na calcificação distrófica progressiva, diversas estratégias, isoladas ou em combinação, têm sido testadas com graus variados de sucesso na tentativa de reduzir ou retardar o seu aparecimento. Mais comumente, os processos visam a detoxificação de resíduos de GA, otimização nas concentrações e tempos de exposição ao GA, métodos alternativos de fixação, remoção de fosfolípidios, o uso de metais trivalentes e mais recentemente a descelularização. (HERRERO et al., 2005).

Desde os trabalhos originais de Carpentier até hoje, o GA continua sendo o método de fixação tecidual mais utilizado na fabricação de próteses valvares. A exposição de tecidos biológicos ao GA leva a ligações químicas irreversíveis com as fibras colágenas, aumentando a sua resistência mecânica e reduzindo a sua antigenicidade pelo mascaramento de antígenos teciduais presentes nas células e na matriz extracelular. Por outro lado, é bem determinado que o GA, mesmo em baixas concentrações é citotóxico, o que favorece uma reação inflamatória do tipo de corpo estranho. Além disso, a liberação de grupos aldeídos residuais que podem se ligar ao cálcio circulante estão implicados diretamente no processo de calcificação. (SINHA et al., 2012).

Em consequência, diversos autores estudaram formas otimizadas de fixação pelo GA e outros propuseram metodologias que, neutralizando os aldeídos residuais, pudessem ser efetivas na prevenção da calcificação.

Lee et al (2017) procuraram determinar a melhor forma de fixação de pericárdios bovinos, submetendo os mesmos a diferentes concentrações que variaram de 0.3% a 0.6% e com tempos de exposição entre 10 a 20 min. Os testes biomecânicos não demonstraram diferenças significativas entre os diversos grupos. Apesar da resposta inflamatória ter sido da mesma intensidade em todos os grupos, a calcificação de fragmentos implantados no subcutâneo de ratos por até 2 meses foi consistentemente menor nos pericárdios tratados com GA 0.6%, independente dos tempos de exposição.

Por outro lado, Sinhá et al (2012) estudaram os efeitos de diferentes concentrações e tempo de exposição na calcificação de pericárdios bovinos e porcinos implantados no subcutâneo de ratos por até 45 dias. As concentrações

variaram de 0.3% até 1.2%, e os tempos de exposição foram de 5 a 30 minutos. Neste estudo, concentrações de GA acima de 0.625% estiveram associadas com graus mais pronunciados de calcificação.

Carpentier, S.M. et al (1998) demonstraram que a fixação de pericárdios com GA em temperaturas elevadas de 50°C foi eficiente em reduzir a calcificação tanto de próteses de pericárdio bovino como de próteses porcinas implantadas em posição mitral de carneiros. Esses efeitos são decorrentes da diminuição dos aldeídos residuais livres e da maior extração de fosfolípidos que ocorrem quando da fixação em GA aquecido. Essa metodologia foi posteriormente denominada de processo “*Thermafis*” e incorporada na preparação das próteses Edwards Magna®.

Weber et al (2006) propuseram bloquear os aldeídos residuais com o emprego do ácido alfa amino-oleico. Os autores compararam, em modelo circulatório mitral de ovinos por até 20 semanas, próteses tratadas com ácido alfa amino-oleico (modelo Mosaic) em relação a próteses não tratadas (modelo Hancock). Apesar da formação da pannus ter sido idêntica em ambos os grupos, as próteses do tipo Mosaic apresentaram redução significativa no seu grau de calcificação.

Stacchino et al (1998) propuseram a neutralização de aldeídos livres com o emprego de ácido homocisteico. Pericárdios bovinos detoxificados com o uso de ácido homocisteico e implantados em subcutâneo de ratos apresentaram moderada redução da quantidade de cálcio presente no tecido.

Ferreira et al (2009), em nossa instituição, avaliaram a eficácia do ácido glutâmico em diferentes pH e concentrações como forma de neutralizar os aldeídos residuais e retardar a calcificação em remendos de pericárdio bovino implantados no subcutâneo de ratos por até 60 dias. Concluíram que os melhores resultados foram obtidos quando o ácido glutâmico foi empregado com pH 3,5 na concentração de 0.8%.

Lee et al (2011) submeteram pericárdios bovinos à fixação em altas concentrações de GA e tratados com solventes orgânicos etanol mais octanol além de pós tratamento com glicina para neutralizar os aldeídos residuais. O grupo controle foi constituído por pericárdios fixados em GA 0.5%. Os testes biomecânicos não demonstraram diferenças significativas na resistência tecidual. Quando implantados no tecido celular subcutâneo de ratos por 8 semanas, observaram redução significativa da calcificação.

Shang et al (2017) utilizaram metodologia combinada de bloqueio dos aldeídos residuais com grupos amina seguidos de glicerolização do tecido para estocagem a seco. Como grupo controle, utilizaram pericárdios porcinos tratados com ácido alfa

amino-oleico e pericárdios bovinos tratados com etanol. Implantes realizados no modelo intramuscular de coelhos por até 60 dias, demonstraram que as matrizes extracelulares dos tecidos glicerolizados estavam melhor preservadas, com menor infiltrado inflamatório e com redução acentuada de 95% na quantidade de cálcio nos tecidos explantados quando comparado aos demais grupos.

Alguns trabalhos procuraram avaliar formas alternativas de fixação de tecidos biológicos, eliminando por completo o uso de GA, entretanto, nenhum deles chegou a ser empregado clinicamente até o momento.

Assim, Connolly et al (2011) avaliaram a fixação de valvas aórticas porcinas com o emprego de Triglicidilamina associado a álcool. Observaram significativa redução da calcificação, tanto no subcutâneo de ratos como no modelo circulatório de carneiros, quando comparado com próteses fixadas de forma convencional pelo GA. Entretanto, este método resultou em tecidos biomecanicamente menos resistentes, conforme demonstrado pelas suas menores temperaturas de encolhimento, o que pode propiciar falência tecidual primária por fadiga mais precocemente.

Sung et al (2001) estudaram a genipina como método alternativo de fixação tecidual. Os autores demonstraram que essa substância é capaz de promover ligações nas fibras colágenas que resultaram em tecidos com características biomecânicas muito semelhantes aos tecidos fixados em GA. Estudos "in vitro" demonstraram que pericárdios porcinos tratados com genipina foram biocompatíveis, não citotóxicos e capazes de serem repovoados "in vitro" em culturas celulares. Após o implante em subcutâneo de ratos, apresentaram reação inflamatória mais atenuada quando comparados com pericárdios fixados em GA ou compostos epóxi.

Já foi bem demonstrado que a presença de fosfolípidos, presentes tanto nas membranas celulares como na matriz extracelular, são pontos de ligação para a formação de cristais de cálcio. Assim sendo, a remoção deles pode ser um adjunto importante na prevenção da calcificação. Vyavahare et al (1998) demonstraram que o etanol reduziu de forma significativa a quantidade de colesterol e fosfolípidos de cúspides valvares porcinas, além de produzir alterações permanentes e irreversíveis nas ligações do GA com as fibras colágenas. Estudos subsequentes com essa metodologia demonstraram redução significativa da calcificação de cúspides valvares porcinas tanto no subcutâneo de ratos como em posição mitral de ovinos jovens por 150 dias. (VYAVAHARE et al., 2000).

Nosso grupo de pesquisa pode reproduzir estes resultados, demonstrando significativa redução da calcificação de próteses porcinas fixadas em GA e implantadas na via de saída do ventrículo direito de ovinos jovens por até 210 dias de evolução. (SONCINI DA ROSA et al., 2006).

Da mesma forma, Petenazzo et al (2008) utilizaram octanodiol para a remoção de fosfolípidos em membranas de pericárdio bovino. Quando implantados em tecido celular subcutâneo de ratos por até 75 dias, observaram importante redução da reação inflamatória, no conteúdo de fósforo e na calcificação tecidual, quando comparados com pericárdios bovinos fixados de forma convencional em GA.

Flameng et al (2008) testaram pericárdios bovinos tratados com detergente Triton X 100 para remoção fosfolipídica. Foram confeccionadas próteses em um modelo de anel trilobar móvel produzido para reduzir o stress mecânico durante a abertura e fechamento dos folhetos. Estas próteses foram implantadas em posição mitral de ovelhas e comparadas com próteses Perimount Magna[®]. Além de observarem melhor hemodinâmica das próteses em estudo por ecocardiografia, também houve significativa redução da calcificação após 5 meses de evolução.

Meuris et al (2018) utilizaram a associação de etanol-octanodiol, para extração fosfolipídica, seguida de neutralização dos aldeídos residuais com aminoácido taurino. As próteses foram estocadas em solução livre de aldeídos tamponada com parabenos. Tecidos assim tratados apresentaram redução de 96% no conteúdo de fosfolípidos, sem alteração de suas propriedades biomecânicas. Quando implantados no tecido subcutâneo de ratos, os níveis de calcificação foram semelhantes aos de pericárdios usados para a confecção comercial de biopróteses tipo Trifecta[®] e Perimount Magna[®]. Três próteses foram confeccionadas com esse tecido e implantadas em modelo circulatório mitral de ovinos. As próteses permaneceram normofuncionantes após um período de 5 meses e o cálcio médio dos folhetos foi de 4.5 µg/mg de tecido.

Flameng et al (2015) avaliaram uma nova tecnologia para conservação de biopróteses. Próteses mitrais Perimount Magna[®] (tratadas com surfactante tween 80 e fixadas em GA) foram submetidas a tratamento adicional para neutralizar os aldeídos residuais (capeamento) e submetidas a glicerolização (glicerol mais etanol) e esterilizadas com oxido de etileno. Após o processo as válvulas foram estocadas a seco, sem nenhum líquido de preservação. Foram implantadas em posição mitral de

ovelhas por 8 meses e comparadas com as próteses Perimount® convencionais. Durante o explante, pode-se observar a formação de pannus principalmente na face atrial, em ambos os grupos. Houve presença de calcificação extrínseca em ambos os grupos, porém a calcificação intrínseca foi observada somente no grupo controle. No grupo testado, houve redução significativa da calcificação com ausência de reação de corpo estranho.

Mais recentemente, ênfase tem sido colocada no papel da reação imunológica como determinante da degeneração calcifica em próteses biológicas. Apesar de no passado acreditar-se que tecidos heterólogos fixados pelo GA fossem inertes ou despertassem mínima reação imunológica, dados mais recentes sugerem que esse conceito deva ser revisto. Naso et al (2017) demonstraram que aproximadamente 50% dos epítomos antigênicos não são mascarados pela fixação com GA, sendo capazes de despertar reação imune e inflamação prolongada.

Tecidos heterólogos apresentam antígenos de membrana e quando implantados em seres humanos despertam reação imune com resposta humoral e celular. O principal antígeno é o oligossacarídeo galactose- α 1-3-galactose (α -Gal), presente em todos os mamíferos exceto no homem e primatas, devido a uma alteração genética na α 1,3-galactosil-transferase. Este antígeno é encontrado na superfície das células e no endotélio vascular e pode estar associado a glicoproteínas e glicolipídios. O contato deste antígeno presente nas bactérias da flora intestinal leva a formação de anticorpos IgG anti-Gal, representando cerca de 1% de todos os anticorpos presentes nos seres humanos. Outro componente importante que pode gerar reação inflamatória são os remanescentes de DNA ou debris aderidos ao tecido após a rotura de células desvitalizadas. Todas as matrizes utilizadas na prática clínica apresentam remanescentes de DNA, os quais normalmente são menores que 300 pares de bases. Após o contato de uma matriz extracelular processada com o receptor ocorre resposta aguda caracterizada por infiltrado mononuclear. A resposta de remodelamento a longo prazo varia de inflamação crônica, fibrose, cicatrização ou encapsulamento. (BADILACKI et al., 2008).

Konacki et al (2005) demonstraram que cerca de 10 dias após o implante de uma bioprótese, o nível de anticorpos IgM anti-Gal se eleva chegando ao pico máximo em 90 dias. O fato de o sistema imune ser mais ativo em crianças e jovens, propicia uma reação mais intensa e pode explicar a falência mais precoce das biopróteses nesta faixa etária.

Park et al (2010) avaliaram a reação imunológica em soro de 19 crianças que receberam próteses porcinas como substituto da válvula pulmonar. O soro foi coletado imediatamente antes da cirurgia e sequencialmente durante o período pós-operatório. Observaram um aumento nos níveis de anticorpos IgM e IgG anti-Gal na primeira semana de pós operatório. Após três semanas os níveis de IgM começam a diminuir, porém os níveis de IgG permanecem altos até 60 dias após o implante.

Manji et al (2006) realizaram implantes de tecido singênico (ratos) versus xenogênico (Porquinho-da-índia) em ratos com o objetivo de demonstrar a ativação e influência do sistema imune na disfunção dos enxertos. Observaram que no grupo discordante houve reação inflamatória muito mais acentuada, com presença de células T e macrófagos além do aumento dos níveis de IgG. A utilização de corticoesteroides reduziu o processo inflamatório e os níveis de anticorpos. As células T liberam a citocina osteopontina, associada a calcificação, e isto reforça a associação da inflamação com a maior calcificação observada no grupo discordante. Esses achados possivelmente mimetizam o que ocorre em seres humanos após implante de xenoenxertos.

A descelularização tem sido proposta como um método alternativo de processamento tecidual de tecidos homólogos e heterólogos. Esta nova tecnologia visa reduzir a antigenicidade tecidual pela remoção das células e material nuclear, além dos antígenos teciduais, sem alterar os componentes da matriz extracelular. Adicionalmente, já é bem determinado que células desvitalizadas e debris celulares atuam como focos iniciais de calcificação. Os fosfolípides presentes na membrana celular atraem cálcio do meio extracelular formando cristais de fosfato de cálcio, e a agregação destes cristais leva a formação de blocos de cálcio. A eliminação das células, portanto, pode ser fundamental na prevenção da calcificação distrófica. (SCHOEN E LEVY 2005).

Os métodos mais comuns de descelularização envolvem a combinação de métodos químicos, físicos e enzimáticos. Os métodos físicos incluem congelamento, pressurização, sonificação e agitação. Eles rompem as células, liberando o conteúdo e facilitam a sua remoção por outros agentes. Os métodos químicos incluem bases e ácidos, detergentes iônicos como o dodecil sulfato de sódio e o deoxicolato de sódio e detergentes não iônicos como o Triton X-100. Os detergentes não iônicos rompem interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, mas não rompem proteína-proteína. Os detergentes iônicos solubilizam o citoplasma e membrana celular e tendem a

desnaturar as ligações proteína-proteína. Os métodos enzimáticos mais comuns incluem a tripsina e as nucleases. As enzimas removem ou separam o material celular da matriz extracelular. (GILBERT et al.,2006).

Crapo et al (2011) fizeram uma revisão dos métodos e das consequências dos diversos processos de descélularização. A efetividade do método depende de fatores como origem, tipo do tecido, sua densidade e propriedades biológicas. Apesar da intenção da preservação de uma matriz extracelular íntegra, sabe-se que todos os métodos empregados causam algum grau de alteração na integridade da matriz ou a perda de componentes da mesma. O SDS é um dos detergentes mais efetivos em remover células e remanescentes nucleares comparado a outros detergentes, porém remove glicosaminoglicanos e pode lesar as fibras colágenas. Por penetrar profundamente em tecidos densos, pode causar citotoxicidade mesmo em baixas concentrações, por isso necessita de múltiplas lavagens após o processamento. A presença de resíduos de material nuclear dentro da matriz extracelular pode contribuir para problemas de citocompatibilidade “*in vitro*” e respostas adversas do receptor “*in vivo*”. A descélularização não é definida por métodos quantitativos, porém espera-se os seguintes critérios mínimos: menos de 50,0 ng de DNA por mg de matriz, fragmentos de DNA menores que 200 pares de bases e ausência de material nuclear nas colorações HE e DAPI.

A quantidade de material nuclear retido em produtos comercialmente disponíveis é bastante variável, porém as implicações disso não eram bem compreendidas. Isso estimulou Keane et al (2012) a avaliarem as consequências de uma descélularização incompleta tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. A descélularização foi aplicada em membrana submucosa porcina e os remanescentes celulares e o tamanho dos fragmentos de DNA foram quantificados. Os resultados do estudo demonstraram que a remoção incompleta de remanescentes celulares e o aumento no tamanho dos fragmentos de DNA estiveram associados com predomínio de macrófagos do tipo M1, pro-inflamatórios “*in vitro*”, sendo a melhor remoção celular com maior fragmentação do DNA estimularam a presença de macrófagos M2. “*In vivo*” aos 14 dias, houve predomínio dos macrófagos M1 invadindo a matriz enquanto os M2 eram periféricos. Aos 28 dias houve importante diminuição no número de células inflamatórias nos grupos, porém com predomínio dos macrófagos M2 na matriz melhor descélularizada evoluindo com remodelamento mais apropriado do tecido. Nos grupos

incompletamente descelularizados predominaram os macrófagos M1 mesmo após remissão do processo inflamatório.

Estudo semelhante foi realizado por Umashankar et al (2013), onde pericárdios bovinos descelularizados e fixados com baixa concentração de GA a 0,2% foram comparados com pericárdios bovinos descelularizados e sem fixação adicional em modelo de regeneração de parede abdominal de ratos por 21 e 90 dias. Observaram que nos pericárdios bovinos não fixados houve predomínio de macrófagos M1 aos 21 dias e persistência dos mesmos aos 90 dias, indicando resposta inflamatória crônica. Este grupo também apresentou aumento de linfócitos plasmáticos e dos níveis de anticorpos circulantes. Já os pericárdios bovinos fixados apresentaram as mesmas características aos 21 dias, porém com reversão do processo aos 90 dias com diminuição dos linfócitos e anticorpos. A regeneração da parede abdominal foi observada apenas com o uso de tecidos fixados, com formação de músculo esquelético e vasos no interior do tecido.

Paniagua et al (2014) observaram que em heteroenxertos descelularizados implantados em modelo circulatório pulmonar de ovinos e sistêmico de porcos, a presença de DNA residual foi associada com infiltrado inflamatório com presença de células T e macrófagos além de calcificação.

A descelularização tecidual foi inicialmente empregada em técnicas de engenharia de tecidos, cuja finalidade é a de produção de matrizes extracelulares capazes de serem repovoadas "*in vitro*" em biorreatores ou "*in vivo*" após o seu implante, adquirindo capacidade regenerativa e de crescimento após o seu remodelamento. A observação dos resultados com implantes experimentais e/ou clínicos demonstraram que, apesar destes objetivos serem apenas parcialmente atingidos, enxertos descelularizados se demonstraram menos imunogênicos e com melhor biocompatibilidade quando comparados com enxertos preparados com outras técnicas convencionais. Um achado marcante e consistente nestes experimentos foi a ausência ou redução significativa da calcificação tecidual. (DOHMEN et al., 2001). Isso serviu de estímulo para que alguns autores passassem a investigar o potencial da descelularização como método anticalcificante em enxertos cardiovasculares de origem heteróloga.

Lopes et al (2009) compararam heteroenxertos porcinos descelularizados com deoxicolato de sódio 1% com homoenxertos criopreservados utilizados na reconstrução da via de saída do ventrículo direito de ovinos por 280 dias. Observaram

que os heteroenxertos apresentaram melhor preservação da matriz extracelular, com repovoamento “*in vivo*” após o implante e ausência de calcificação. Em contrapartida, os homoenxertos criopreservados sofreram degeneração tecidual progressiva com calcificação. Subsequentemente, Navarro et al (2010), usando metodologia semelhante, observaram o comportamento de homoenxertos pulmonares descelularizados com SDS 0,1% em ovelhas por 180 dias. Os enxertos apresentaram matriz extracelular bem preservada com amplo repovoamento “*in vivo*” incluindo a infiltração por miofibroblastos, reendotelização completa e ausência de calcificação.

Os resultados clínicos com tal tecnologia vêm sendo reportados de forma seriada na literatura por Costa et al (2010;2014;2017;2018). Por meio de estudos pareados, usando escores de propensão, os autores demonstraram que homoenxertos descelularizados empregados na via de saída do ventrículo direito estiveram associados a menores gradientes tardios quando comparados com homoenxertos criopreservados. A ausência de calcificação dos enxertos foi amplamente documentada com exames ecocardiográficos e avaliação por tomografia computadorizada de tórax com até 10 anos de evolução. Em outra publicação, Costa et al (2017) demonstraram resultados bastante promissores do uso de homoenxertos descelularizados em crianças com idade abaixo de 12 anos. Após dez anos de evolução, 91% dos pacientes encontravam-se livres de reintervenção e 65% dos enxertos estavam normofuncionantes neste mesmo período. Mesmo neste subgrupo de pacientes pediátricos, onde a degeneração tecidual é mais precoce e pronunciada, não foi detectada calcificação no período de observação.

A mesma tecnologia tem sido aplicada clinicamente em homoenxertos utilizados na circulação sistêmica. Costa et al (2010) puderam demonstrar em 41 pacientes, que homoenxertos aórticos descelularizados implantados com a técnica de substituição total da raiz aórtica apresentaram bom desempenho hemodinâmico e ausência de calcificação das cúspides valvares. Os autores também demonstraram, com auxílio de estudos de ressonância magnética, que os enxertos não apresentaram dilatação da sua parede arterial com até 5 anos de evolução, confirmando que a matriz descelularizada tem resistência mecânica adequada, mesmo quando submetidas a pressões sistêmicas.

Pesquisadores passaram a estudar os efeitos da descelularização em pericárdios bovinos fixados em GA, antevendo a possibilidade de aplicar essa

tecnologia em remendos de pericárdio e em próteses valvares montadas em anel de suporte.

Gonçalves et al (2005) avaliaram a eficiência da descélularização em remover proteínas da matriz que funcionam como antígenos. Dos vários métodos testados, o SDS 0,1% foi o único capaz de remover por completo as células e os principais antígenos em pericárdio bovino.

Costa et al (2005) compararam o pericárdio bovino comercial com pericárdio previamente descélularizado e subsequentemente fixado em glutaraldeído quanto às suas propriedades físicas e capacidade de induzir atividade inflamatória em subcutâneo de ratos. Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas das propriedades biomecânicas entre os grupos, e pode-se observar menor reação inflamatória no grupo descélularizado.

Oswal et al (2007) analisaram as propriedades biomecânicas e citotóxicas do pericárdio bovino, descélularizado com SDS 0,1% e fixado em GA nas concentrações 0,5 e 0,05%. O pericárdio bovino descélularizado estava completamente livre de células pela análise histológica e manteve suas propriedades biomecânicas e a arquitetura da matriz intacta após o processo, porém apresentou citotoxicidade mesmo quando se utilizaram concentrações menores de GA.

Estes experimentos foram re-confirmados por Collatusso et al (2012), que compararam, em modelo subcutâneo de ratos por até 90 dias, o grau de calcificação em pericárdios fixados em GA sem nenhum tratamento anticalcificante, pericárdios fixados em GA e tratados com ácido glutâmico e em pericárdios descélularizados e posteriormente fixados em GA. Apesar do ácido glutâmico ter apresentado alguma efetividade até 45 dias de evolução, somente o grupo descélularizado ficou isento de calcificação durante todo o período de observação.

Nesta mesma linha de pesquisa, Collatusso et al (2011) demonstraram redução significativa da calcificação em tubos valvados construídos com pericárdio bovino descélularizado e implantados na via de saída do ventrículo direito por até 180 dias, quando comparados com tubos feitos com pericárdio bovino sem tratamento anticalcificante. Apesar da redução na quantidade de cálcio ter sido observada tanto nas cúspides como na parede dos condutos, elas foram mais significativas nas cúspides valvares.

Os efeitos da descélularização em pericárdios bovinos fixados em GA também vem sendo investigada por outros autores.

Aguiari et al (2017) fizeram comparação “*in vitro*” de pericárdios bovinos descelularizados com a associação de Triton, ácido taurodeoxicólico e benzonase com pericárdios empregados na construção das próteses Trifecta® e Magna Perimount®. O tratamento foi eficaz na remoção das células, na preservação da estrutura da matriz extracelular, havendo redução de 99 % no DNA residual e ausência de α - Gal no tecido. Esse tratamento não causou alterações nas propriedades biomecânicas. A resposta imune “*in vitro*” foi comparável ao tecido das biopróteses comerciais.

Min et al (2012) avaliaram as alterações na matriz extracelular do pericárdio bovino decorrentes da descelularização utilizando SDS associado com α - galactosidase. Como resultado houve completa remoção do epítipo α -Gal, porém observaram alterações nas propriedades biomecânicas da matriz com diminuição da força tensil e aumento da elasticidade.

Lim et al (2012) estudaram pericárdios bovinos descelularizados e que foram posteriormente fixados em GA ou em genipina. Apesar dos testes biomecânicos terem sido semelhantes, pericárdios fixados com genipina apresentaram menor resistência à degradação pela pronase. Quando implantados em modelo intramuscular de coelhos, os pericárdios fixados em genipina tiveram menor calcificação e menor reação imunológica conforme medido pela presença de anticorpos IgG anti-Gal.

Park et al (2017) testaram tubos construídos com conduto de pericárdio bovino e folhetos de pericárdio porcino. O tratamento anticalcificante utilizado foi a combinação de descelularização com SDS 0.1%, fixado em GA 0.5% em solvente orgânico e detoxificado com glicina. Tubos construídos com pericárdio fixado em GA 0.5% foram usados como controle. Foram realizados implantes em posição pulmonar de cabras por 1 ano. Houve redução significativa da calcificação dos folhetos do grupo tratado comparado ao grupo controle. No pericárdio bovino das paredes não foram observadas diferenças na calcificação entre os grupos.

Brizard et al (2014) conduziram teste de não inferioridade de um novo remendo de pericárdio bovino (Cardiocell® - descelularizado e fixado em baixa concentração de GA 0.05 %) em modelo animal de ovelhas. Realizaram substituição do folheto anterior da válvula mitral e de um folheto da válvula pulmonar. Como controle foram utilizados pericárdios autólogos fixados em glutaraldeído no momento da cirurgia. Os animais foram acompanhados por 7 meses. A análise histológica dos remendos após o explante demonstrou incorporação da matriz ao tecido do animal com formação de

neo-colágeno, presença de células musculares lisas e recoberto por endotélio em ambos os lados do remendo. A espessura da formação neo-intimal foi menor nos enxertos tratados quando comparados ao grupo controle. A calcificação observada foi baixa e comparável ao tecido autólogo do animal.

Neethling et al (2018) compararam pericárdios bovinos do tipo Cardiocell® com outras quatro matrizes de pericárdio bovino ou porcino comercialmente disponíveis. Além da comparação das propriedades biomecânicas e da estabilidade térmica, a biocompatibilidade e a calcificação foram avaliadas em subcutâneo de ratos. As características biomecânicas deste novo remendo foram comparáveis com as demais matrizes. “In vivo” foi observado leve reação inflamatória, com posterior infiltração de fibroblastos e remodelamento tecidual. Não foi observada reação típica de corpo estranho.

Meuris et al (2016) reconstruíram válvulas aórticas em 6 carneiros substituindo as cúspides com remendos Cardiocell® utilizando a técnica de Ozaki e realizaram acompanhamento por 6 meses. Por ocasião do explante observaram que os folhetos de pericárdio bovino estavam funcionais, sem sinais grosseiros de calcificação. Histologicamente os folhetos estavam com a matriz preservada, recoberto por pannus principalmente na face aórtica e com discretos focos de calcificação nas regiões comissurais e próximos as linhas de sutura. Entretanto, Salameh et al (2017) avaliaram o mesmo remendo Cardiocell® implantados na parede da artéria pulmonar e aorta ascendente de porcos por 12 meses e observaram graus variados de calcificação e formação de cartilagem no tecido.

Pavy et al (2018) apresentaram os resultados de dois anos de evolução do remendo Cardiocell® implantado em 101 crianças para a correção de anomalias congênitas. Houve cinco reoperações por falência do enxerto, todos implantados para ampliação do arco aórtico em pacientes com hipoplasia do ventrículo esquerdo. A causa da falência foi reação intimal exacerbada que ocasionava obstrução significativa ao fluxo sanguíneo. A análise histológica dos remendos mostrou matriz preservada sem calcificação e reação intimal exagerada com infiltrado de linfócitos e histiócitos. Os autores sugerem que o remendo não deva ser usado em áreas com alta pressão.

Umashankar et al (2016) estudaram pericárdios bovinos descelularizados e fixados em baixa concentração de GA (0.2%) quanto as propriedades biomecânicas,

além do remodelamento e calcificação após o implante em aorta de porcos. Os pericárdios bovinos tratados foram mais finos e menos elásticos, porém com propriedades biomecânicas equivalentes. “*In vivo*” foi observado remodelamento com formação de neointima menos acentuada, incorporação da matriz por células do hospedeiro e com presença de neo-colágeno e células musculares lisas, além de ausência de calcificação. Já o grupo controle apresentou inflamação persistente e calcificação.

Apesar de tecidos descelularizados terem menor antigenicidade pela ausência de células, sabe-se que proteínas da matriz extracelular heteróloga ainda são capazes de causar reações imunológicas indesejáveis em humanos (Griffiths et al., 2008). Por este motivo, mesmo que descelularizados, enxertos heterólogos devem ter algum tipo de fixação tecidual. Esta recomendação pode ser bem exemplificada pela experiência de Simon et al (2003) que reportaram quatro casos de valvas porcinas produzidas pelo método Synergrafttm (Cryolife Inc., USA), implantadas em posição pulmonar de crianças com idade de 2,5 a 11 anos. Estas próteses são descelularizadas e criopreservadas, porém sem nenhuma fixação adicional. Houve falência precoce dos enxertos, com três óbitos, todos devido a degeneração e calcificação do enxerto incluindo um caso de rotura da parede. Ao exame histológico havia intensa fibrose ocasionando disfunção das cúspides. Os autores concluem que a falência foi decorrente de resposta imune exagerada com degeneração acelerada.

Experiência semelhante foi reportada por Perri et al (2012) com próteses porcinas descelularizadas e sem fixação adicional do tipo Matrix P e Matrix P Plus. Os autores relataram incidência de 40% de disfunção estrutural primária com apenas dois anos de evolução em crianças com cardiopatia congênita que tiveram reconstrução da via de saída com estes enxertos. Em decorrência de reação inflamatória acentuada, as disfunções foram de estenose, pseudo-aneurismas e dilatações aneurismáticas dos condutos.

4.2 ARTIGO

Title: Decellularization as a method to reduce calcification in bovine pericardium bioprosthetic valves

Authors: Claudinei Collatusso^a, João Gabriel Roderjan^b, Lucia de Noronha^c, Allyson Klosowski^d, Paula Hansen Suss^e, Luiz César Guarita-Souza^f, Francisco Diniz Affonso da Costa^g.

Author Information:

^a Cardiac Surgeon- Department of Cardiac Surgery- Santa Casa de Curitiba- Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Curitiba, Paraná, Brazil.

^b Department of Biochemistry -Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

^c Department of Pathology – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

^d Cardiac Surgery Residente - Santa Casa de Curitiba, Curitiba, Paraná, Brazil.

^e Department of Biochemistry -Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

^f Professor of Surgery - Pontifícia universidade Católica do Paraná, . Curitiba, Paraná, Brazil.

^g Professor of Surgery- Head Department of Cardiac Surgery, Santa Casa de Curitiba, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil;

Corresponding author and requests for reprints: Claudinei Collatusso, Cardiac Surgery Department. Rua Major França Gomes, 1170 Santa Quitéria, Curitiba, Paraná, Brazil. CEP 80310-000. Tel +55 41 991639413. Email: claudineicl@yahoo.com.br.

Key words: bioprosthesis, calcification, decellularization, bovine pericardium

ABSTRACT

Background: Decellularization has been described as an alternative method for processing biological tissues with decreased antigenicity and resistance to calcification. The aim of this study was to characterize the properties of decellularized bovine pericardium fixed with 0.1% glutaraldehyde and to evaluate outcomes of bioprosthetic valves constructed with this tissue when implanted in the mitral position of juvenile sheep.

Methods: Bioprosthetic mitral valves were constructed with fresh bovine pericardium fixed in 0.5% glutaraldehyde (control group) or decellularized bovine pericardium fixed in 0.1% glutaraldehyde (study group). Before implantation, samples were submitted to histological (Hematoxylin-Eosin, Movat and 4', 6-diamidino-2-phenylindole), biochemical (residual deoxyribonucleic acid and α -gal epitopes) and biomechanical characterization. Valves were implanted (n= 8 in each group) in the mitral valve position for 180 days in juvenile sheep and explants were re-evaluated histologically and for calcification with radiological studies and calcium content determination.

Results: Unimplanted decellularized pericardium exhibited a well-preserved extracellular matrix with absence of cells, a 77% reduction in deoxyribonucleic acid levels and with no detectable α -gal epitopes. When compared to controls, they had lower ultimate tensile strength and greater % elongation in the longitudinal direction. After 180 days, decellularized valves showed pliable leaflets without macroscopic signs of calcification. Histologically, decellularized leaflets had intact collagen fibers, better tissue remodeling and a significant 89% reduction in calcium content.

Conclusions: This study demonstrates that bioprosthetic valves constructed with decellularized bovine pericardium fixed in low glutaraldehyde concentration were resistant to calcification and have potential to improve their long-term durability.

Keywords: bioprosthesis, calcification, decellularization, bovine pericardium

Introduction

Contemporary practices in cardiac valve replacement surgery demonstrate a proportional increase in the use of tissue over mechanical valves. Although this is partially explained by the growing number of elderly people undergoing surgery, there is also a trend favoring the implantation of biological substitutes in patients younger than 65 years of age to avoid the long-term anticoagulant complications associated with mechanical valves (1).

Long-term durability with third generation bioprosthetic valves have shown a low incidence of structural valve degeneration (SVD) up to 20 years in older patients, however, in patients under 60 years of age the risk of SVD and reoperation due to calcification is still higher, emphasizing the need for more durable valves in younger patients (2-4).

Calcific dystrophic degeneration of glutaraldehyde (GA) fixed bioprosthesis is multifactorial and not completely understood (5). Several factors are implicated, including the mechanical cyclic loading and unloading stresses during opening and closing of the leaflets, the persistence of unbound residual aldehyde groups, the presence of non-viable cells and a high phospholipid content within the leaflet tissue (5, 6). Furthermore, the presence of α -gal epitopes in bovine and porcine tissues elicits an immunological response in humans that may trigger and potentiate the degenerative process (7-9).

Among newer antimineralization strategies (6, 10), decellularization has been proposed as a method to diminish tissue antigenicity leading to better tissue compatibility, remodeling and long-term durability (11). Our group has published several experimental studies with sodium dodecyl sulphate (SDS) decellularized allografts (12-14). Subsequent clinical experience with decellularized pulmonary and aortic valve allograft implantation, mostly in children and younger patients, has demonstrated that the most striking feature of this technology is the absence of calcification up to 12 years of follow-up (15-17).

Subsequently our group was able to demonstrate, in the experimental setting, that decellularization was also effective in preventing calcification of GA fixed bovine pericardium when implanted in the subcutaneous rat model and as a valved conduit for right ventricular outflow tract (RVOT) reconstruction in sheep (18, 19). In order gain further insights on the merits of this technology, the aim of this study was to investigate

the efficacy of SDS decellularization as an anticalcification strategy in a more robust and challenging model of mitral valve replacement in juvenile sheep.

Materials and Methods

Bioprosthetic Valves

Bioprosthetic valves were constructed by Cardioprotese Ltd, which is a Brazilian company that produces commercially available pericardial valves that incorporates glutamic acid as an anticalcification treatment. For this study, bioprosthetic valves were produced according to our specifications to meet our intended study protocol. As such, the control group consisted of a trileaflet valve mounted inside a flexible Delrin® stent and manufactured with a single sheet of bovine pericardium of uniform thickness and elasticity, which was conventionally fixed in GA 0.5% without any further anticalcification treatment (Figure 1A).

The study group (dCell valves) consisted of valves constructed with the same technique but the pericardium was treated with a novel decellularization technology. In brief, decellularization was accomplished with a proprietary SDS 0.1% detergent solution (Brazilian PI 0800603-2) for 24 hours at room temperature, followed by a bath in ethanol 70% for 24 hours and sequential washings in phosphate buffer solutions (PBS) for 10 days to ensure complete removal of any detergent residuum from the tissue. This was followed by fixation in low concentration GA 0.1% for at least seven days before final valve manufacturing. The bioprosthesis is then stored in a paraben solution, which is free from GA and does not necessitate any rinsing before use during the operation (Figure 1B).

Before conducting animal experiments, pericardial samples from both groups were submitted for histological, biochemical and biomechanical assays to determine baseline morphologic and functional differences induced by this new processing technique that might explain eventual distinct biological response and outcomes after “in vivo” implantation.

Histological, Immunohistochemical Analysis and DNA quantification of unimplanted valves

Pericardial samples (n=10) from each group were microscopically assessed to detect baseline microstructural differences between them. Samples were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and longitudinal sections of 4µm thickness were cut for histological analysis with hematoxylin-eosin (HE) and Russel-Movat pentachromic staining using an optical microscope BX51 (Olympus™, Tokyo, Japan). Special attention was given to the distribution and arrangement of the collagen and elastic fibers, glycosaminoglycans (GAGS) content and the overall appearance of the extracellular matrix.

The distribution of cell nuclei and remnants of nuclear material was further investigated by staining with 1 µg/µl of 4'. 6-diamidino-2-phenylindole - Sigma-Aldrich (DAPI).

The presence of α-gal epitopes were determined by incubating the slides with M86 monoclonal antibodies (LifeSpan Bioscience, catalog LS-C63415, dilution 1:5) conjugated with the secondary anti-human antibody IgM-PE (Moss, catalog- GTIM-001, 1:250) during 60 min. In addition, α-gal epitopes were also detected by using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated B4 isolectin (BSI-B4; Griffonia (*Bandeiraea simplicifolia*, Sigma) (max. absorption = 490 nm; max. emission = 520 nm).

For DNA quantification, 25 mg of freeze dried tissue was solubilized in 500 µl digestion buffer (10% SDS, 1M TrisHCl, 5M NaCl, EDTA 0,5M), in the presence of proteinase K (Thermo Fischer Scientific) 8000 ng of calf thymus DNA spike, overnight at 60°C. This was followed by an incubation with 167 µl of potassium acetate solution (60% potassium acetate 5M, 11.5% glacial acetic acid) at -20 °C for 10 min. The samples were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min and 500 µl of the supernatant was used to precipitate the DNA with 400 µl of isopropanol. After a new centrifugation, the resultant pellet was solubilized in 70 µl of RNase-free water. Extracted DNA was quantified using Nano Drop spectrophotometer at 260 nm. The amount of DNA was averaged from a set of three independent runs, from 10 different animals and expressed as ng/mg of dry weight. The percentage of DNA recovery was calculated

based on the formula [% recovery = (sample with spike - sample without spike x 100)/8000]. For further evaluation, demonstration of extractable DNA was electrophoresed on 1% agarose gel.

Biomechanical Testing of Unimplanted Valves

Uniaxial Tensile Testing

Pericardial samples (n=10) were submitted to uniaxial tensile testing in both the longitudinal and transverse directions of the fibers to determine their biomechanical properties. Test samples were cut in a dumbbell shape conformed to a type 2 tensile test specimen as outlined in BS ISO 37 and tested in a universal testing machine EMIC DL 500. Tests were conducted by applying an initial load of 0.01 N and a strain rate of 5mm/min. This allowed the construction of the stress/strain curves and calculation of the ultimate tensile strength (MPa), modulus of elasticity (E) and % elongation at maximum stress (ϵ).

Shrinkage Temperature

Pericardial samples (n=10) measuring 30X10 mm were tested for their shrinkage temperature. Samples were immersed in water in a specifically designed container and secured in both extremities to mobile stems. Water was heated at a rate of 3 – 4°C/min and the temperature at which there was a sudden shortening of about 1/4 of the sample original length was recorded as the shrinkage temperature denoting collagen denaturation.

Animals

Sixteen Texel juvenile sheep with age 5-6 months and weighting 30-40 kg were obtained from a certified sheep producer and transferred to our University farm facility where they received the pre- and post-operative care. They were cared

according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press (US); 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54045>). The Pontificia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) Animal Research Ethics Committee under the protocol 0949 in 11/12/2014 approved the study. After veterinary release, the animals were randomized to each study group.

Operations

Animals were premedicated with diazepam 0.5mg/Kg body weight and butorfanol tartarate 0.4mg/Kg body weight intramuscularly. During anesthesia cardiovascular parameters were monitored by way of continuous electrocardiogram, arterial pressure waveform, peripheral oxygen saturation and carbon dioxide saturation. General anesthesia was induced and maintained with propofol 0.6 µg/Kg/min and sevoflurane. Antibiotic prophylaxis was commenced with enrofloxacin 10mg/Kg body weight and maintained for 48 hours.

The operations were performed through a left thoracotomy in the fourth intercostal space and opening the pericardium superior and parallel to the phrenic nerve. After systemic heparinization (250IU/Kg body weight), full flow (2.5l/min/m²) normothermic extracorporeal circulation (ECC) was initiated with an arterial cannula inserted in the descending thoracic aorta and venous drainage with a single cannula in the right atrium. The aorta was cross-clamped and myocardial protection was performed with cold (4°C) antegrade blood cardioplegia. The left atrium was opened through an incision in the left atrial appendage, the mitral valve exposed, and the anterior leaflet excised while maintaining the posterior leaflet with its attachment to the papillary muscles in order to avoid atrio-ventricular disruption. A 23 mm mitral bioprosthesis was then implanted with standard interrupted of 2-0 multifilament braided polyester mattress sutures without pledgets. The left atrial incision was closed with a running 5-0 polypropylene suture and the aorta unclamped. After obtaining stable cardiovascular hemodynamics, ECC was terminated. After careful hemostasis, a chest tube was inserted in the pleural cavity and the incision closed.

As soon as adequate spontaneous ventilation was regained, the animals were weaned from the ventilator, extubation was performed and the chest tube was

removed. Analgesia was obtained with flunixin meglumine 1.5mg/Kg body weight for 48 – 72 hs. The animals were kept under close observation for the first 3-5 days and sent back to the farm for long-term observation and follow-up.

Echocardiography

Transthoracic echocardiographic evaluation was performed two weeks after the operation in all surviving animals. It was performed by a blinded echocardiographer. Besides measurements in mean and peak gradients and valvular regurgitation, special attention was given to evaluate leaflet thickness and mobility. Because of technical limitations, it was not possible to obtain adequate later echo studies before explantation.

Follow-up and Explant Procedures

All animals dying before the planned explantation at 180 days were autopsied and an attempt was made to determine the cause of death. At the same time, valves were analyzed for any signs of infection, SVD and non-structural valve dysfunction. The surviving animals were electively sacrificed at 180 days using the same anesthetic techniques described for the implantation procedure and the bioprosthetic valves were analyzed as described below.

Valve Explant Analysis

Gross Examination

Valves were photographed with a Cannon 7D camera and carefully inspected for cusp mobility, presence and distribution of calcification, tears or perforations, cuspal hematoma, thrombosis, tissue overgrowth, cusp retraction or prolapse.

Radiographic Examination

Radiographic assessment, to detect and localize calcifications, was performed with mammographic techniques using a Siemens C3 Mammomat unit, and classified as absent, mild, moderate or severe.

Microscopic Analysis

After cutting the cusps away from the sewing ring, a 2-3 mm strip taken from the central portion of each leaflet from base to the free margin was prepared for histological examination using the same techniques as described for the unimplanted valves. The integrity of the extracellular matrix, the inflammatory response and the extent of the fibrous sheeting were studied with HE and Russel-Movat Pentachrome (RMP) stain. Collagen fibers were further analyzed with the aid of polarizing microscopy after staining with Picro Sirius red. Alizarin red staining pH= 4.2 and 7.0 were utilized for visualization of calcium deposits.

Calcium Quantification

For the determination of calcium content, all the remaining lateral parts of the leaflets were dehydrated at 60⁰ C for 24 hr, cut into small pieces and immersed in hydrochloric acid 6N for 72 hours at 60⁰ C. The calcium content of the hydrolyzed samples was determined by atomic absorption spectrophotometry using a Perkin Elmer 4100 unit. The results were expressed as µg Ca/mg of dry tissue.

Statistical Analysis

All values are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7.00 for Mac (GraphPad Software, La Jolla – California - USA, www.graphpad.com). Between-group comparisons were made using Mann-Whitney U tests.

Results

Histological, Immunohistochemical Analysis and DNA quantification of unimplanted valves

The histological appearance of control and decellularized bioprosthesis is illustrated in Figure 2(A-F). The effectiveness of the decellularization protocol was confirmed by the absence of visible nuclei or nuclear material in both the HE and DAPI staining. Decellularized valves presented an overall well-preserved extracellular matrix with wavy collagen bundles and interspersed short elastic fibers. Compared to controls, decellularized matrices appeared less compact with increased spacing between the collagen bundles and an apparent mild loss of GAGS as evidenced by the weaker green signal of the ground substance in the RMP staining.

Decellularization also promoted a significant reduction in the DNA content (Control = 846 ± 181 ng/mg tissue vs dCell = $198,7 \pm 94,33$ ng/mg tissue, 77% reduction, $p < 0.001$). However, few fragmented DNA bands greater than 200 base pairs (bp) could still be observed in the agarose gel electrophoresis.

As demonstrated by the M86 antibody immunolabeling and the B4 isolectin immunofluorescence, decellularized pericardium valves appeared completely free from any α -gal epitopes (Figure 3).

Biomechanical Testing of Unimplanted Valves

Biomechanical Testing

Adequate GA fixation was achieved in both groups as evidenced by their shrinkage temperatures (Control = $83.7^{\circ}\text{C} \pm 1.1$ versus dCell = $82.9^{\circ}\text{C} \pm 1.2$, $p=0.14$).

Uniaxial testing revealed that bovine pericardium has anisotropic characteristics. When tested in the longitudinal direction, decellularized pericardium fixed in 0.1% GA concentration exhibited significantly lower mean ultimate tensile strength ($p=0.04$), lower elastic modulus ($p=0.01$) and a tendency towards greater % elongation at maximum stress ($p=0.06$) in the longitudinal direction when compared to controls. In the transverse direction, biomechanical parameters were similar between groups, the only significant difference being observed in the greater % elongation ($p=0.02$) in the dCell pericardium (Figure 4 A-D).

Animal Studies

Sixteen animals were randomly selected to receive either control valves ($n = 8$) or dCell valves ($n=8$). All implanted bioprosthesis were size 23 mm. At the time of surgery the mean weight of the animals was 35 ± 3 Kg (min = 31Kg, max = 40Kg) with no difference between groups. Mean cross-clamp and extracorporeal circulation times were also similar, being 31 ± 4 min and 45 ± 14 min respectively.

There were four early deaths (Control Group = 1 and dCell Group = 3). Causes of early mortality included inability to wean from cardiopulmonary bypass ($n= 2$), uncontrollable hemorrhage ($n= 1$) and another animal that never recovered consciousness ($n= 1$). During follow-up, 4 animals (Control Group = 3, dCell Group = 1) died suddenly or from severe congestive heart failure without signs of endocarditis. At necropsy, there was already moderate macroscopic calcification in control bioprothetic valves, but none in the dCell valve. These animals were excluded from further analysis. Overall, four animals in each group survived to 180 days of follow-up thus completing the established protocol. At the time of sacrifice, these animals weighed 65 ± 7 Kg.

Echocardiographic Results

At 15 days, all valves in both groups had normal mobility of the cusps, with good coaptation and were competent. Mean gradients were lower in dCell valves (10 ± 2 mmHg) when compared to controls (14 ± 4 mmHg) but did not reach statistical significance ($p=0.08$).

Macroscopic Explant Analysis

At explantation, there were no signs of tears, perforations, vegetations, thrombosis or cuspal hematomas in any valve of both groups. Similarly, we could not detect leaflet retraction or prolapse.

All valves from the Control Group had visible macroscopic calcifications of varying degrees with restricted mobility. On the other hand, all dCell valves presented with mobile leaflets, without calcifications, except for two valves that had small spotty spicules of extrinsic calcifications at the top of the valve posts overlying the pannus tissue ingrowth (Figure 5 A-B).

Radiological assessment

The findings of the macroscopic visualization were confirmed by the mammographic studies showing diffuse calcification of the leaflets of the control group and minimal or absent calcium in dCell valves (Figure 5 C-D).

Microscopy

In the HE and Movat staining, the leaflets from the Control Group had clear signs of degeneration with fragmented collagen fibers, zones of calcification and areas of osteoblastic metaplasia with the presence of osteoblasts. The leaflets were covered by a neointimal layer that was most pronounced in the atrial side and in the base of the leaflets. This layer was composed of connective tissue containing myofibroblasts

and also some histiocytes and few giant cells and was covered by endothelial like cells. Picro Sirius staining revealed that this fibrous tissue was mainly composed of mature collagen type I. Calcification was evident in alizarin stainings, being more pronounced at $\text{pH} = 4.2$, indicating the predominance of calcium phosphate accumulation rather than calcium oxalate (Figure 6).

By contrast, dCell valves had well preserved collagen fibers and only occasional spotty areas of calcification, usually close to the commissures. The neointimal layer was much less pronounced and the inflammatory response was virtually absent. With Picro Sirius staining the neointimal layer was composed of equal amounts of collagen type I and III, suggesting a better remodeling response when compared to control valves (Figure 6).

Calcium quantification

There was an 89% reduction in the calcium content levels in the dCell valves ($2.6 \pm 0.8 \mu\text{g}/\text{mg}$) when compared to controls ($21.7 \pm 5.7 \mu\text{g}/\text{mg}$) ($p=0.03$) (Figure 7).

Discussion

This study is intended to investigate whether bovine pericardium treated by a novel decellularization technique and fixed in low GA concentration has appropriate characteristics to produce bioprosthetic valves with a favorable hemodynamic profile, resistant to calcific degeneration and with the potential for improved durability(18, 19).

In theory, the ideal decellularization methodology would be capable of removing all cellular components while preserving the morphology and the normal biochemical and biomechanical properties of the extracellular matrix (20). In practice, however, some degree of extracellular derangement invariably occurs, independent of the processing technique (21). Our histological findings demonstrated effective decellularization with only minor damage to the overall extracellular matrix arrangement and composition.

We observed a significant 77% reduction in DNA level, with most of the remaining DNA being fragmented and less than 200 bp in length. Although it is controversial whether there is a threshold level of DNA remnants that may elicit an unfavorable macrophage inflammatory reaction, it has been suggested that the presence of small DNA fragments smaller than 300 bp is unlikely to play any substantive role in an adverse tissue remodeling response (22).

Although GA fixation of xenogeneic material is able to reduce tissue antigenicity, recent emphasis has been placed in the immunological role of α -gal epitopes and its association with dystrophic calcification (7, 8). The α -Gal epitope is expressed on a variety of bovine and porcine tissues, including the cardiac valve and vascular endothelium. Approximately 1% of the circulating antibodies are designated to the α -Gal epitope in humans due to exposure to the gut flora. In xenotransplantation, anti α -Gal antibodies mediate the hyperacute rejection with complement activation, and delayed or chronic rejection with an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism. Even in glutaraldehyde fixed tissues, it has been shown that immunoglobulins penetrate valve-matrix that is followed by subsequent deposition of macrophages onto the valve surface; the process is then completed with collagen breakdown and calcification (7, 8). The absence of these antigens is an important finding of our decellularization protocol and may play an important role to mitigate calcification (9, 23).

Although most of the current bioprostheses are still fixed in GA concentrations varying from 0.5% to 0.625% (6), it is known that GA by itself not only promotes calcification but also is cytotoxic (10). In order to counteract these deleterious effects, some protocols involve neutralizing the free aldehyde binding sites with homocysteic or glutamic acid (24) or by functional group capping (6). Our strategy involves fixation in low GA concentration and a subsequent final storage in an aldehyde-free paraben solution. It has been previously demonstrated by others that this form of fixation results in better tissue biocompatibility, a diminished inflammatory and immune response and better tissue remodeling (25).

Although adequate tissue fixation can be achieved with low GA concentrations as suggested by the shrinkage temperatures, decellularized pericardium presented greater extensibility, lower elastic modulus and a lower ultimate tensile strength in the longitudinal direction when compared to controls, a finding that has been previously

described by others (26). However, at explantation, this greater elasticity did not translate into any sign of failure such as sagging or leaflet prolapse. In addition, although the ultimate tensile strength of decellularized pericardium is far higher than the stresses actually experienced by a bioprosthetic valve after implantation (27), further evaluation in a pulse duplicator and fatigue testing systems are currently being investigated.

Taken together, the explant findings in low GA fixed dCell valves showing intact collagen fibers, attenuated inflammatory response with less pronounced pannus formation and diminished calcium content is very encouraging. The macroscopic and radiological findings were unequivocal in demonstrating the efficacy of this processing technique to mitigate calcification with an 89% reduction when compared to controls. A direct comparison between different anticalcification strategies is difficult due to different animal models, duration of follow-up and implantation site. Inasmuch, our results compare favorably with those reported by Flameng et al who demonstrated a calcium content of 6.8 and 1.9 $\mu\text{g Ca/ mg}$ dry tissue in Perimount and Resilia valves after 8 months in the mitral position of juvenile sheep (10). Stentless aortic valves made out of Cardiocell patches exhibited 1.62 $\mu\text{g Ca/ mg}$ dry tissue at six months in the juvenile sheep, as reported by Meuris et al (28). The same group tested a new anticalcification treatment denominated FREE and found only 0.05 $\mu\text{g Ca/ mg}$ dry tissue compared to 5.9 $\mu\text{g Ca/ mg}$ dry tissue in Trifecta valves. However, the observation period in this latter study was only 20 weeks (6).

Even though mitral valve replacement in juvenile sheep is considered the most robust model for anticalcification evaluation, we are aware from past experience that several antimineralization strategies that were successful in the experimental setting did not translate in better outcomes when clinically applied to younger patients. On the other hand, the promising long-term results in children and young adults with allografts decellularized with similar techniques are encouraging that this technology may be successfully employed in commercially available valves in the future.

Conclusions

Decellularized pericardium fixed in low GA concentration presented adequate histological and biomechanical characteristics suitable for the construction of bioprosthetic valves. The combination of low GA concentration treatment and the

absence of cells and α -gal epitopes may be important factors to promote better tissue remodeling, resistance to calcific dystrophic degeneration and ultimately increased durability. Further studies, including complete hemodynamic evaluation in pulse duplicators and fatigue testing to determine “in vitro” durability is underway to determine if this technology can be applied to produce commercially available valves.

Limitations

In this study some limitations were observed: the number of animals could have been higher, but the cost of the experiments is very high. During the follow-up the animals presented a great weight gain and developed heart failure. Mismatch may have been the cause, explaining late mortality. Late echocardiography was not possible due to incompatibility of the available equipment, compromising the functional evaluation of the implants.

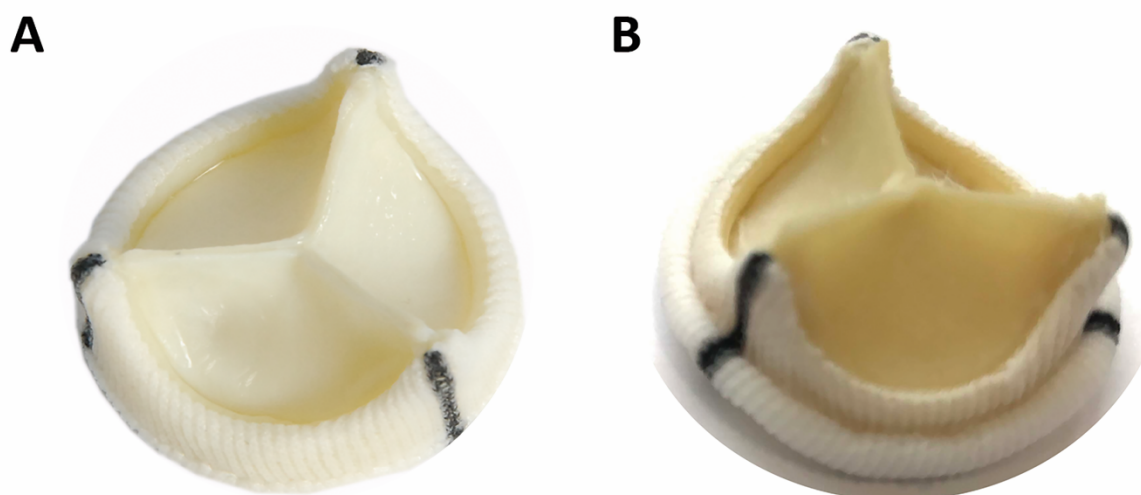


Figure 1 - (A) - Stented bovine pericardium bioprosthetic valve fixed in 0.5% glutaraldehyde with no anticalcification treatment from the control group – (B) Same bioprosthetic valve but constructed with decellularized pericardium and fixed in low concentration (0.1%) glutaraldehyde used in the study group.

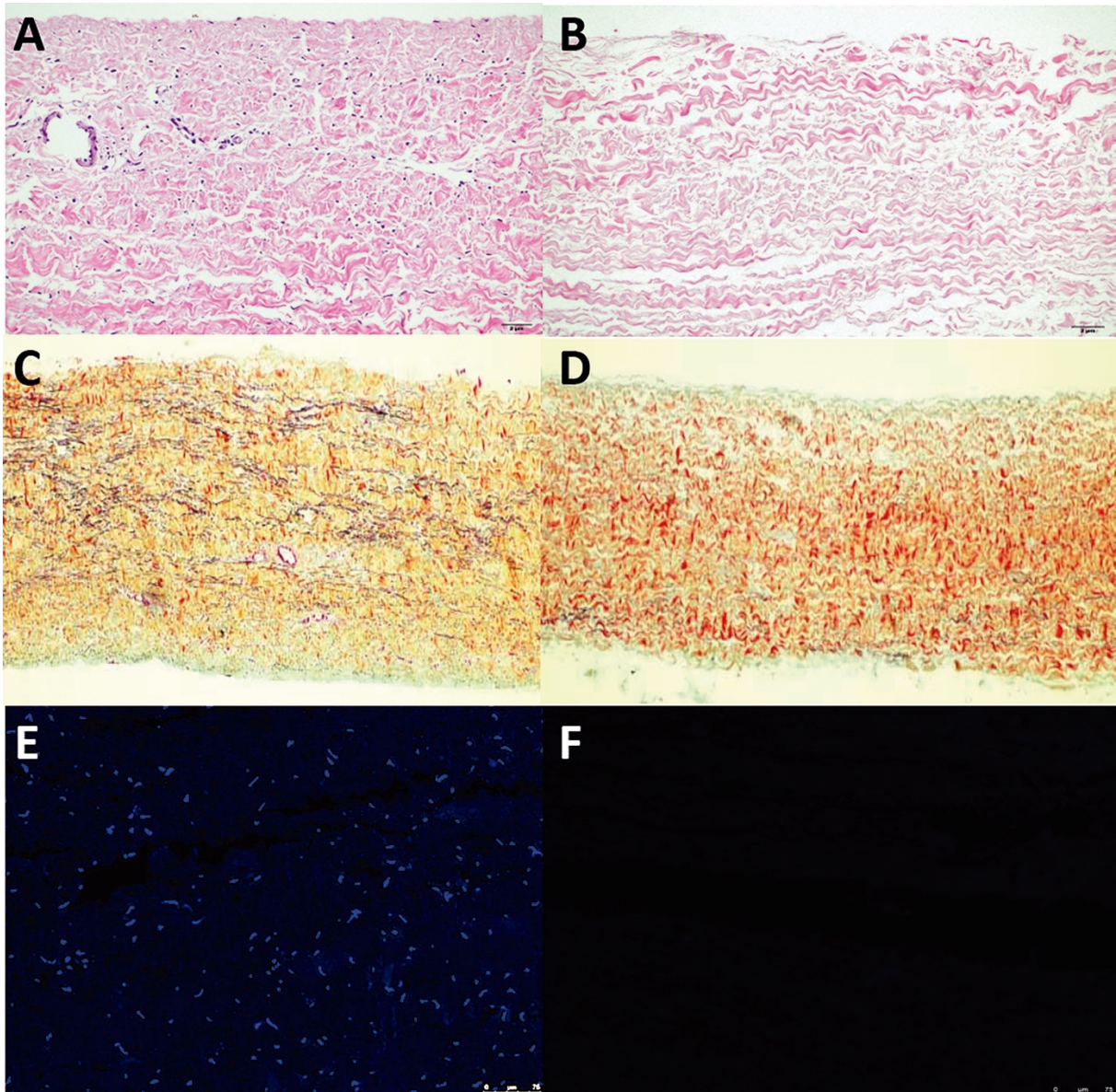


Figure 2 - Histological evaluation with hematoxylin-eosin (HE), Russel-Movat (RM) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining of control (A, C, E) and decellularized valves (B, D, F). In comparison to the control group, decellularized valves had complete absence of visible cells but still with a well-preserved extracellular matrix. With DAPI staining, no visible cell nuclei and remnants of nuclear material could be detected in the decellularized pericardium.

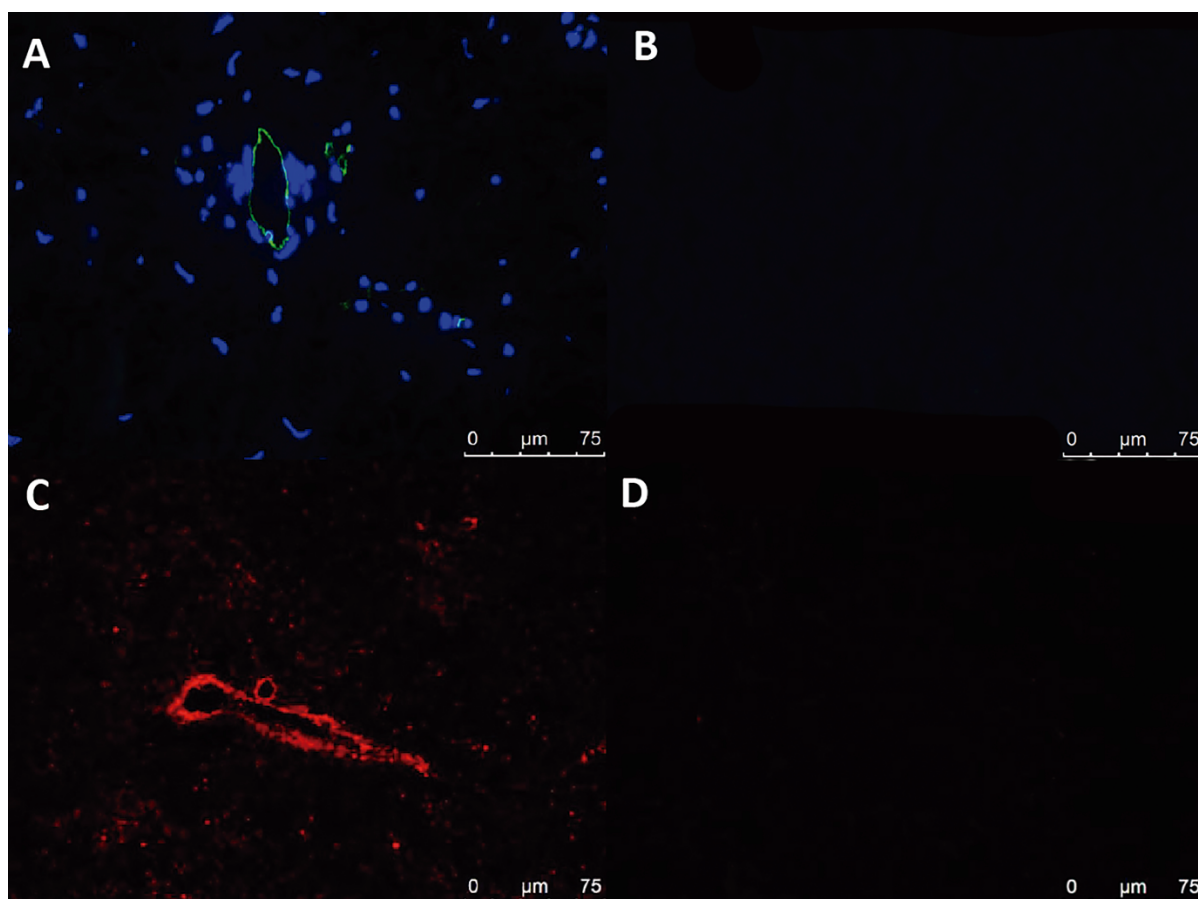


Figure 3 – Immunolabeling of α -gal epitopes showing positive green staining with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated B4 isolectin (A) and positive red staining with anti alpha 1,3 Gal M86 antibodies (C) in control valves. Decellularized valves (dCell) (B, D) were negative for these antigens epitopes.

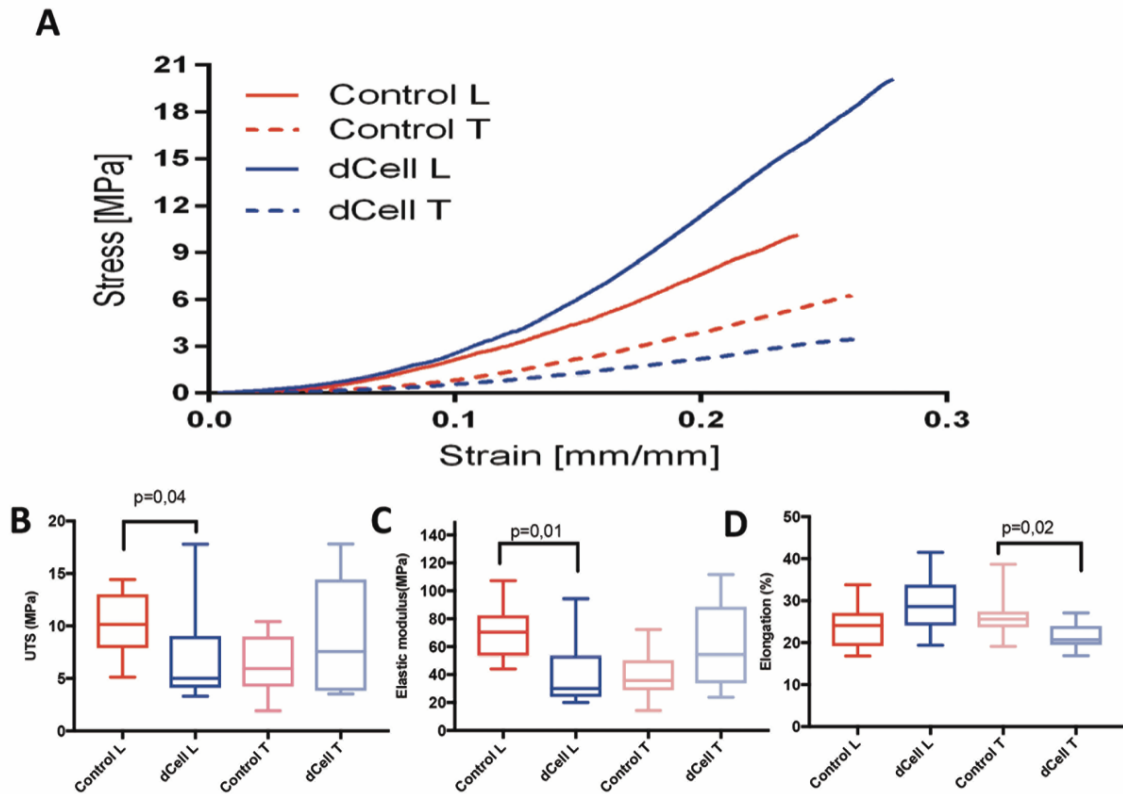


Figure 4 – Uniaxial tensile testing for comparison of biomechanical characteristics in control versus decellularized (dCell) valves both in the longitudinal (L) and transverse (T) direction of the fibers. (A) Stress/Strain curves for control and dCell pericardium. (B,C,D) Compared to controls dCell pericardium exhibited significantly lower ultimate tensile strength (UTS) ($p=0.04$), lower elastic modulus (E) ($p=0.01$) and a tendency greater % elongation ($p=0.06$) in the longitudinal direction. In the transverse direction, biomechanical parameters were similar between groups, the only significant difference being observed in the greater % elongation in the control pericardium ($p=0.02$).

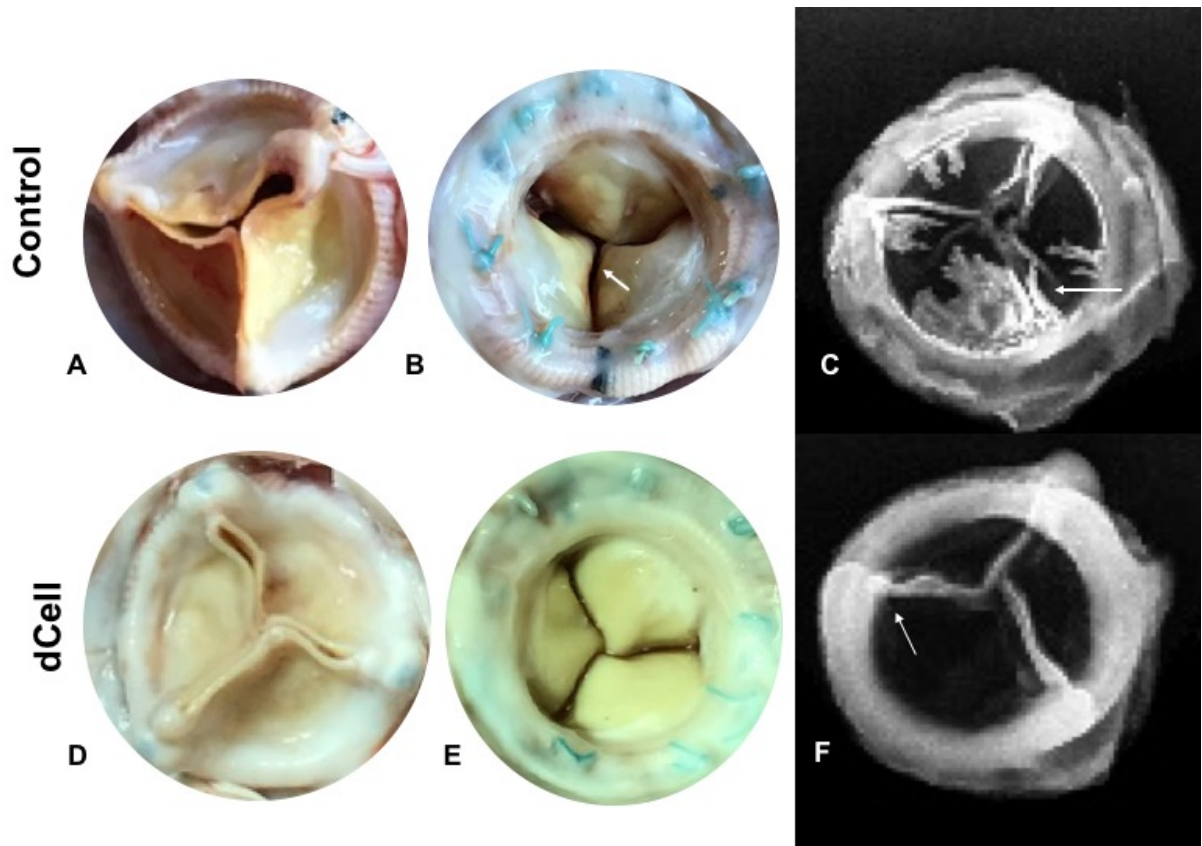


Figure 5 – Macroscopic and radiological assessment of explanted valves. Macroscopically, control valves (A, B) exhibited limited leaflet mobility and diffuse cusp calcifications. Exuberant pannus formation is clearly seen on the atrial surface (arrowhead). By contrast, decellularized (dCell) valves were mobile with no macroscopic signs of dystrophic calcification, pannus is limited to the sewing ring (D, E). Radiologically, all control valves demonstrated diffuse leaflet calcifications (solid arrow) (C). By contrast, decellularized valves (dCell) were mostly free of calcium, with only occasional small spotty calcium spikes at the top of the commissures (dotted arrow) (F).

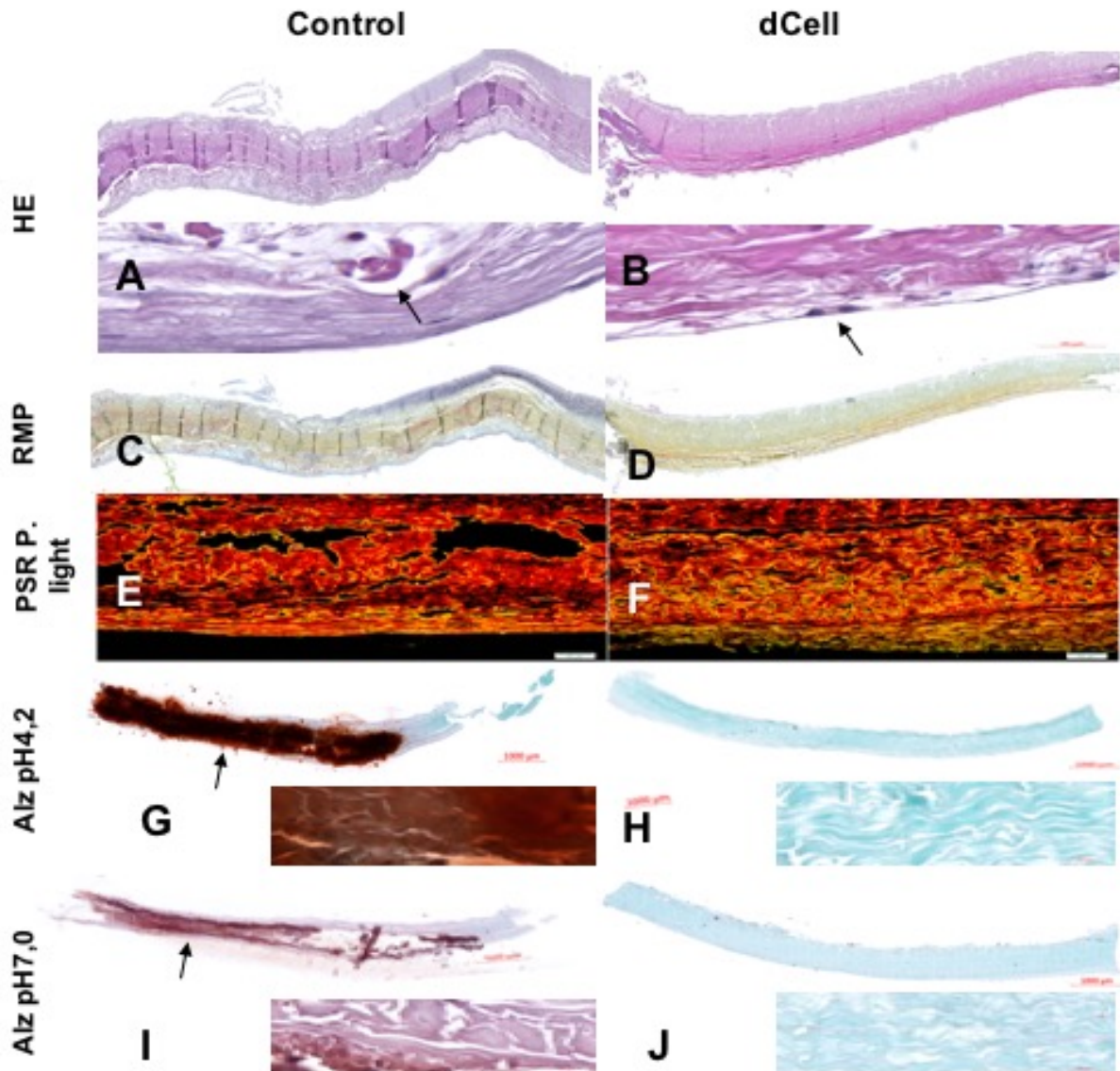


Figure 6 – Histological analysis of explanted valves. A) Hematoxylin-eosin (HE) staining 100X from a control valve demonstrating degenerated and calcified matrix. There is a dense neointimal formation in both sides. In the 400X augmentation a giant multinucleated cell indicating chronic rejection can be seen (arrow). B) HE staining 100X of a dCell valve showing a well-preserved matrix and much thinner neointimal formation. In the greater magnification 400X, endothelial-like cells are covering the leaflets. C) Russel – Movat (PRM) staining of the same specimen shown in A. D) Russel – Movat (PRM) of the same specimen in B. E) Polarized Picro-Sirius Red (PSR P) of a control valve showing fragmented and degenerated collagen fibers. Collagen type I is predominant. F) Polarized Picro-Sirius Red (PSR P) of a dCell valve showing well-preserved collagen fibers constituted by collagen types I and III. G) Alizarin Red (Alz) pH 4.2 (100X and 400X) of a control valve showing intense calcification due to calcium phosphate deposition. H) Alizarin Red (Alz) pH 4.2 (100X and 400X) of a dCell valve with absence of calcification. I) Alizarin Red (Alz) pH 7.0 (100X and 400X) of a control valve showing intense calcification due to calcium oxalate deposition. J) Alizarin Red (Alz) pH 7.0 (100X and 400X) showing of a dCell valve showing absence of calcium.

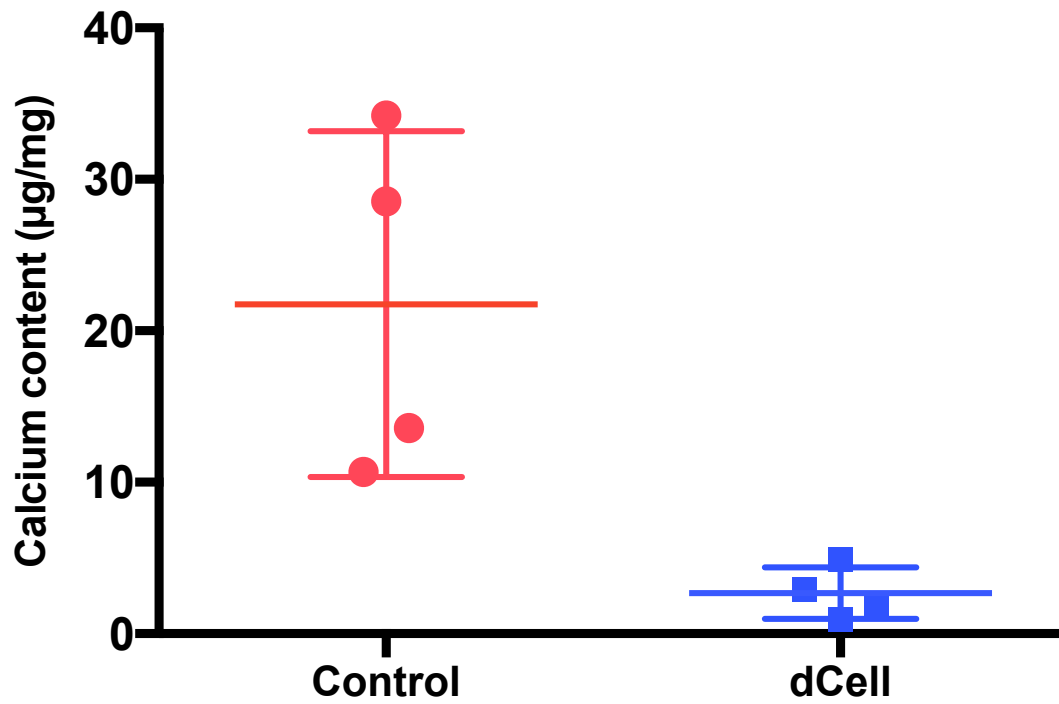


Figure 7 – Calcium content as determined by atomic absorption spectrophotometry. There was an 89% reduction in calcium levels in decellularized (dCell) valves ($2.6 \pm 0.8 \mu\text{g/mg}$) when compared to controls ($21.7 \pm 5.7 \mu\text{g/mg}$) after 180 days in the mitral position of juvenile sheep ($p= 0.03$).

References

1. Isaacs AJ, Shuhaiber J, Salemi A, Isom OW, Sedrakyan A. National trends in utilization and in-hospital outcomes of mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacements. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;149(5):1262-9 e3.
2. Bourguignon T, Bouquiaux-Stablo AL, Candolfi P, Mirza A, Loardi C, May MA, et al. Very long-term outcomes of the Carpentier-Edwards Perimount valve in aortic position. *Ann Thorac Surg.* 2015;99(3):831-7.
3. Bourguignon T, Lhommet P, El Khoury R, Candolfi P, Loardi C, Mirza A, et al. Very long-term outcomes of the Carpentier-Edwards Perimount aortic valve in patients aged 50-65 years. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2016;49(5):1462-8.
4. Une D, Ruel M, David TE. Twenty-year durability of the aortic Hancock II bioprosthesis in young patients: is it durable enough? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014;46(5):825-30.
5. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(3):1072-80.
6. Meuris B, De Praetere H, Strasly M, Trabucco P, Lai JC, Verbrugge P, et al. A novel tissue treatment to reduce mineralization of bovine pericardial heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018.
7. Konakci KZ, Bohle B, Blumer R, Hoetzenecker W, Roth G, Moser B, et al. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur J Clin Invest.* 2005;35(1):17-23.
8. Park CS, Park SS, Choi SY, Yoon SH, Kim WH, Kim YJ. Anti alpha-gal immune response following porcine bioprosthesis implantation in children. *J Heart Valve Dis.* 2010;19(1):124-30.
9. Ankersmit HJ, Copic D, Simader E. When meat allergy meets cardiac surgery: A driver for humanized bioprosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2017;154(4):1326-7.
10. Flameng W, Hermans H, Verbeken E, Meuris B. A randomized assessment of an advanced tissue preservation technology in the juvenile sheep model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;149(1):340-5.
11. Brizard CP, Brink J, Horton SB, Edwards GA, Galati JC, Neethling WM. New engineering treatment of bovine pericardium confers outstanding resistance to

- calcification in mitral and pulmonary implantations in a juvenile sheep model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;148(6):3194-201.
12. Navarro F, Costa F, Mulinari L, Pimentel G, Roderjan J, Vieira E, et al. Evaluation of the biological behavior of decellularized pulmonary homografts: an experimental sheep model. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery.* 2010;25(3).
 13. Lopes SA, Costa FD, Paula JB, Dhomen P, Phol F, Vilani R, et al. Decellularized heterografts versus cryopreserved homografts: experimental study in sheep model. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2009;24(1):15-22.
 14. Paniagua Gutierrez JR, Berry H, Korossis S, Mirsadraee S, Lopes SV, da Costa F, et al. Regenerative potential of low-concentration SDS-decellularized porcine aortic valved conduits in vivo. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(1-2):332-42.
 15. da Costa FDA, Etnel JRG, Torres R, Balbi Filho EM, Torres R, Calixto A, et al. Decellularized Allografts for Right Ventricular Outflow Tract Reconstruction in Children. *World J Pediatr Congenit Heart Surg.* 2017;8(5):605-12.
 16. Etnel JRG, Suss PH, Schnorr GM, Veloso M, Colatusso DF, Balbi Filho EM, et al. Fresh decellularized versus standard cryopreserved pulmonary allografts for right ventricular outflow tract reconstruction during the Ross procedure: a propensity-matched study. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2018.
 17. da Costa FDA, Etnel JRG, Charitos EI, Sievers HH, Stierle U, Fornazari D, et al. Decellularized Versus Standard Pulmonary Allografts in the Ross Procedure: Propensity-Matched Analysis. *Ann Thorac Surg.* 2018;105(4):1205-13.
 18. Colatusso C, Roderjan J, Vieira E, Costa F, L N, D F. Effect of SDS-based decellularization in the prevention of calcification in glutaraldehyde-preserved bovine pericardium. Study in rats. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery.* 2012;27(1):88-96.
 19. Colatusso C, Roderjan JG, Vieira ED, Myague NI, Noronha L, Costa FDAd. Decellularization as an anticalcification method in stentless bovine pericardium valve prosthesis: a study in sheep. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery.* 2011;26(3):419-26.
 20. Oswal D, Korossis S, Mirsadraee S, Wilcox H, Watterson K, Fisher J, et al. Biomechanical characterization of decellularized and cross-linked bovine pericardium. *J Heart Valve Dis.* 2007;16(2):165-74.
 21. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;32(12):3233-43.

22. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*. 2012;33(6):1771-81.
23. Naso F, Stefanelli U, Buratto E, Lazzari G, Perota A, Galli C, et al. Alpha-Gal Inactivated Heart Valve Bioprotheses Exhibit an Anti-Calcification Propensity Similar to Knockout Tissues(). *Tissue Eng Part A*. 2017;23(19-20):1181-95.
24. Ferreira A, Costa F, Santos E, Sardeto E, Gomes C, Colatusso C. Glutamic Acid in the prevention of calcification of glutaraldehyde fixed bovine pericardium: a study in rats. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 2007;22(3):303-9.
25. Umashankar PR, Arun T, Kumary TV. Effect of chronic inflammation and immune response on regeneration induced by decellularized bovine pericardium. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(8):2202-9.
26. Mirsadraee S, Wilcox HE, Korossis SA, Kearney JN, Watterson KG, Fisher J, et al. Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering. *Tissue Eng*. 2006;12(4):763-73.
27. Sacks MS, Yoganathan AP. Heart valve function: a biomechanical perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007;362(1484):1369-91.
28. Meuris B, Ozaki S, Neethling W, De Vleeschauwer S, Verbeken E, Rhodes D, et al. Trileaflet aortic valve reconstruction with a decellularized pericardial patch in a sheep model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;152(4):1167-74.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este ensaio pré-clínico, onde utilizamos um tratamento anticalcificante combinado, de descelularização do pericárdio bovino com a solução desenvolvida em nossa instituição associada a fixação em baixa concentração de glutaraldeído, mostrou resultado promissor no que diz respeito à preservação da matriz extracelular e capacidade de retardar a calcificação em modelo circulatório sistêmico de ovinos. Os valores de cálcio aqui encontrados foram semelhantes aos descritos em ensaios com tecidos das biopróteses de última geração.

Experimentos anteriormente realizados com pericárdio bovino fixados com este tratamento recebeu certificação dos órgãos de fiscalização federal e já está em uso clínico como remendo cardiovascular.

Como próximo passo em nossa investigação serão realizados testes hidrodinâmicos e de durabilidade em próteses confeccionadas com pericárdio bovino tratado com esta tecnologia, e uma vez que se mostrem satisfatórios, aplicaremos junto as agências reguladoras para iniciar os primeiros ensaios clínicos em humanos.

REFERÊNCIAS

AGUIARI, P. et al. "In vitro comparative assessment of decellularized bovine pericardial patches and commercial bioprosthetic heart valves." **Biomedical materials**, v.12, n. 1, p. 15-21, Feb 2017.

ANKERSMIT, H.J.; COPIC, D.; SIMADER, E. When meat allergy meets cardiac surgery: A driver for humanized bioprosthesis. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v.154, n. 4, p. 1326-7, Oct 2017.

BADYLAK, S. F.; GILBERT, T.W. "Immune response to biologic scaffold materials." **Seminars in immunology**, v. 20, n. 2, p. Apr109-16, 2008.

BOURGUIGNON, T. et al. Very long-term outcomes of the Carpentier-Edwards Perimount valve in aortic position. **Ann Thorac Surg**, v. 99, n. 3, p. 831-7, Nov 2015.

_____ et al. Very long-term outcomes of the Carpentier-Edwards Perimount aortic valve in patients aged 50-65 years. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 49, n. 5, p.1462-8, 2016.

BRIZARD, C.P. et al. New engineering treatment of bovine pericardial confers outstanding resistance to calcification in mitral and pulmonary implantations in a juvenile sheep model. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 148, p. 3194-201, 2014.

CARPENTIER, A. et al. Biological factors affecting long term results of valvular heterografts. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 58, n. 4, p. 467-83, 1969.

CARPENTIER, S.M. et al. Heat treatment mitigates calcification of valvular bioprostheses. **Ann Thorac Surg**, n.66, v 6, p. S264-6, Dec 1998.

COLLATUSSO, C. et al. Efeito da descelularização com SDS na prevenção da calcificação em pericárdio bovino fixado em glutaraldeído: estudo em ratos. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 27, n. 1, 2012.

_____ et al. Descelularização como método anticalcificante em proteses valvares de pericárdio bovino sem suporte: estudo em ovinos. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 26, n. 3, p. 419-26, 2011.

CONNOLLY, J. M. et al. "Triglycidyl amine crosslinking combined with ethanol inhibits bioprosthetic heart valve calcification." **The Annals of thoracic surgery**, v. 92, n. 3, p. 858-65, 2011.

COSGROVE, D.M. et al. The Carpentier-Edwards pericardial aortic valve. Ten year results. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 110, n.3, p. 651-62, Sep 1995.

COSTA, J.N.L. Comparação entre o pericardio bovino descelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de bioproteses valvares cardíacas. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, n. 20, v. 1 p. 14-22, 2005.

CRAPO, P.M.; GILBET, T.W.; BADYLAK, S.F. An overview of tissue and organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, p. 3233-3243, 2011.

DA COSTA, F.D.A. et al. Immunological and echocardiographic evaluation of decellularized versus cryopreserved allografts during the Ross operation, **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 27, n. 4, p. 572-578, Apr 2005.

_____ et al. The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts. **Ann thorac surg**, n.90, v. 6, p. 1854-60, 2010.

_____ et al. Long-term results of the Ross operation: an 18-year single institutional experience. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 46, n. 3, p. 415-22, Sep 2014.

_____ et al. Decellularized Allografts for Right Ventricular Outflow Tract Reconstruction in Children. **World J Pediatr Congenit Heart Surg**, n. 8, v. 5, p. 605-12, 2017.

_____ et al. Decellularized Versus Standard Pulmonary Allografts in the Ross Procedure: Propensity-Matched Analysis. **Ann Thorac Surg**. v. 105, n. 4, p. 1205-13, 2018.

DOHMEN, P.M. et al. Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep. **Semin Thorac and Cardiovasc Surg**, n.13, v.4 S1, p. 93-8, 2001.

ETNEL, J.R.G. et al. Fresh decellularized versus standard cryopreserved pulmonary allografts for right ventricular outflow tract reconstruction during the Ross procedure: a propensity-matched study. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 0, p. 1-7, Feb 2018.

FERREIRA, A. et al. Glutamic Acid in the prevention of calcification of glutaraldehyde fixed bovine pericardium: a study in rats. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v 22, n. 3, p. 303-9, 2007.

FLAMENG, W. et al Factors influencing calcification of cardiac bioprostheses in adolescent sheep. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 132, n. 1, p. 89-98, 2006.

_____ et al. Trilogly pericardial valve: hemodynamic performance and calcification in adolescent sheep. **Ann Thorac Surg**, v. 85, n. 2, p. 587-92, 2008;

_____; HERMANS, H.; VERBEKEN, E.; MEURIS, B. A randomized assessment of an advanced tissue preservation technology in the juvenile sheep model. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v.149, n. 1, p. 340-5, 2015.

GILBERT, T.W.; SELLARO, T.L.; BADYLAK, S.F. Decellularization of tissue and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675-83, 2006.

GONÇALVES, A.C.; GRIFFITHS, L.G.; ANTHONY, R.V.; ORTON, E.C. Decellularization of bovine pericardium for tissue engineering by target removal of xenoantigens. **J Heart Valve Dis**, n.14, v. 2, p. 212-7, 2005.

GRIFFITHS, L.G. et al. Immunoproteomic identification of bovine pericardium xenoantigens. **Biomaterials**, n.29, v. 26, p. 3514-20, 2008.

HERRERO, E. J.; GARCIA PAES, J.M.; DEL CASTILLO-OLIVEIRA RAMOS, J.L. Tissue heart valve mineralization: Review of calcification mechanisms and strategies for prevention. **Journal of Applied Biomaterials e Biomechanics**, v.3, p. 67-82, 2005.

IONESCU, M.I. et al. Results of aortic valve replacement with frame-supported fascia lata and pericardial grafts. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 64, n. 3, p. 340-53, 1972.

ISAACS, A.J. et al. National trends in utilization and in-hospital outcomes of mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacements. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 149, n. 5, p. 1262-9, 2015.

ISO 37:2011 - Rubber, vulcanized or thermoplastic Determination of tensile stress-strain properties.

KEANE, T.J.; LONDONO, R.; TURNER, N.J.; BADYLAK, S.F. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**, v.33, n. 6, p. 1771-81, 2012.

Kim, M.S.; Lim, H.G.; Kim, Y.J. Calcification of decellularized and alpha-galactosidase-treated bovine pericardial tissue in an alpha-Gal knock-out mouse implantation model: comparison with primate pericardial tissue. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 49, n. 3, p. 1-7, May 2015.

KONAKCI, K.Z. et al. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. **Eur J Clin Invest**, v.35, n. 1, p. 17-23, 2005.

LEE, C. et al. High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment: in vitro material assessment and in vivo anticalcification effect. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v.39, p. 381-387, 2011.

_____ et al. Effects of glutaraldehyde concentration and fixation time on material characteristics and calcification of bovine pericardium: implications for the optimal method of fixation of autologous pericardium used for cardiovascular surgery. **Interact CardioVasc Thorac Surg**, v. 24, p. 402-6, 2017.

LIAO, J.; JOYCE, E.M.; SACKS, M.S. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. **Biomaterials**, v.29, n. 8, p. 1065-74, 2008.

LIM, H-G. et al. "Anticalcification effects of decellularization, solvent, and detoxification treatment for genipin and glutaraldehyde fixation of bovine pericardium." **European journal of cardio-thoracic surgery**, v. 41, n. 2, p. 383-90, Feb 2012.

LOPES, S.A.V. et al. Decellularized heterografts versus cryopreserved homografts: experimental study in sheep model. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2009.

MANJI, R.A. et al. Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection. **Circulation**, v. 114, n. 4, Op. 318-27, 2006.

MATHAPATI, S. et al. Inflammatory responses of tissue-engineered xenografts in a clinical scenario. **Interact CardioVasc Thorac Surg**, n. 12, p. 360-65, 2011.

MEURIS, B. et al. "Trileaflet aortic valve reconstruction with a decellularized pericardial patch in a sheep model." **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 152, n. 4, p. 1167-74, Oct 2016.

_____ et al. A novel tissue treatment to reduce mineralization of bovine pericardial heart valves. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 156, n. 1, p. 197-206, Jul 2018.

MIN, B.J. et al. Histologic Characteristics and Mechanical Properties of Bovine Pericardium Treated with Decellularization and α -Galactosidase: A Comparative Study. **The Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, n. 45, v. 6, p. 368-79, Dec 2012.

MIRSADRAEE, S. et al. Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering. **Tissue Eng**, v. 12, n. 4, p. 763-73, 2006.

NASO, F. et al. Alpha-Gal Inactivated Heart Valve Bioprostheses Exhibit an Anti-Calcification Propensity Similar to Knockout Tissues(). **Tissue Eng Part A**, v. 23, n. 19-20, p. 1181-95, 2017.

NAVARRO, F. et al. Evaluation of the biological behavior of decellularized pulmonary homografts: an experimental sheep model. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 25, n. 3, 2010.

NEETHLING, W.M.L.; PULS, K.; REA, A. Comparison of physical and biological properties of CardioCelVR with commonly used bioscaffolds. **Interact CardioVasc Thorac Surg**, v. 26, n. 6, p. 985-92, Jun 2018.

OSWAL, D. *et al.* Biomechanical characterization of decellularized and cross-linked bovine pericardium. **J Heart Valve Dis**, v. 16 n. 2 p. 165-74, 2007.

PANIAGUA GUTIERREZ, J.R. et al. Regenerative potential of low-concentration SDS-decellularized porcine aortic valved conduits in vivo. **Tissue Eng Part A**, v.21, n. 1-2, p. 332-42, 2015.

PARK, C.S. et al. Anti alpha-gal immune response following porcine bioprosthesis implantation in children. **J Heart Valve Dis**, v.19, n. 1, p. 124-30, 2010.

_____ et al. Anticalcification effect of a combination of decellularization, organic solvents and amino acid detoxification on glutaraldehyde-fixed xenopericardial heart valves in a large-animal long-term circulatory model. **Interact CardioVasc Thorac Surg**, v. 25, p. 391–9, May 2017.

PAVY C. et al. Initial 2-year results of CardioCelVR patch implantation in children. **Interact CardioVascThorac Surg**, v. 26, p. 448–53, 2018.

PERRI, G. et al. Early and late failure of tissue-engineered pulmonary valve conduits used for right ventricular outflow tract reconstruction in patients with congenital heart disease. **Eur J Cardiothorac Surg**, n. 41, v. 6, p. 1320-5, Jun 2012.

PETTENZAZZO, E.; VALENTE, M.; THIENE, G. Octanediol treatment of glutaraldehyde fixed bovine pericardium: evidence of anticalcification efficacy in the subcutaneous rat model. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 34, n. 2, p. 418-22, Jun 2008.

PIBAROT, P.; DUMESNIL, J.G.. “Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management.” **Circulation**, v. 119, n. 7, p. 1034-48, Feb 2009.

SACKS, M.S.; YOGANATHAN, A.P. Heart valve function: a biomechanical perspective. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.362, n. 1484, p. 1369-91, 2007.

SALAMEH, A. et al. “Calcification or Not. This Is the Question. A 1-Year Study of Bovine Pericardial Vascular Patches (CardioCel) in Minipigs.” **Seminars in thoracic and cardiovascular surgery**, v. 30, n. 1, p. 54-59, 2018 .

SALLEB, S.F. et al. Accelerated degeneration of a bovine pericardial bioprosthetic aortic valve in children and young adults. **Circulation**, v. 130, p. 51-60, 2014.

SHANG, H. et al. Aldehyde reduction in a novel pericardial tissue reduces calcification using rabbit intramuscular model. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 28, n. 1, p. 16-23, Jan 2017.

SCHOEN, F.J.; LEVY, R.J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. **Ann Thorac Surg**, v. 79, n. 3, p. 1072-80, 2005.

SIMON, P. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFTe in pediatric patients. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 23, p. 1002-6, 2003.

SINHA, P. et al. "Effects of glutaraldehyde concentration, pretreatment time, and type of tissue (porcine versus bovine) on postimplantation calcification." **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 143, n. 1, p. 224-7, Jan 2012.

SONCINI DA ROSA, et al. Use of ethanol in preventing calcification of porcine pulmonary heterograft: experimental study in sheep. **Braz J Cardiovasc Surg**, n. 21, v. 3, p. 304-13, 2006.

STACCHINO, C. et al. Detoxification process for glutaraldehyde-treated bovine pericardium: biological, chemical and mechanical characterization. **J Heart Valve Dis**, v. 7, n. 2, p. 190-4, Mar 1998.

SUNG, H. et al. (2001). Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). **Journal of biomedical materials research**, v. 55, n. 4, p. 538-46, 2001.

UMASHANKAR, P.R.; ARUN, T.; KUMARY, T.V. Effect of chronic inflammation and immune response on regeneration induced by decellularized bovine pericardium. **J Biomed Mater Res A**, v. 101, n. 8, p. 2202-9, 2013.

_____.; SABAREESWARAN, A.; SHENOY, S.J. Long-term healing of mildly cross-linked decellularized bovine pericardial aortic patch. **J Biomed Mater Res Part B**, v.105, n. 7, p. 2145-52, Oct 2016.

UNE, D.; RUEL, M.; DAVID, T.E. Twenty-year durability of the aortic Hancock II bioprosthesis in young patients: is it durable enough? **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 46, n. 5, p. 825-30, 2014.

VYAVAHARE, N.R. et al. Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships. **J Biomed Mater Res**, n. 40, v. 4, p. 577-85, Jun 1998.

_____ et al. Prevention of glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve calcification by alcohol pretreatment: further mechanistic studies. **J Heart Valve Dis**, n. 9, v. 4, p. 561-6, Jul 2000.

WEBER, P.A. et al. Evidence of mitigate calcification of the mosaic versus hancock standard valve xenograft in the mitral position of young sheep. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 132, n. 5, p. 1137-43, 2006.

WALLEY, V. M. et al. "Ionescu-Shiley valve failure. I: Experience with 125 standard-profile explants." **The Annals of thoracic surgery**, n.54, v.1, p. 111-6, 1992.