

**Pericardio bovino para aplicaciones cardiovasculares.  
Efecto del surfactante, agentes de entrecruzamiento y modificadores  
superficiales en sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas**

Cauich Rodríguez, JV<sup>1</sup>, Mendoza Novelo B<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Materiales, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

<sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad de Guanajuato.

e-mail: [jvcr@cicy.mx](mailto:jvcr@cicy.mx)

## **1. Resumen**

Pericardio bovino (PB) fue decelularizado con surfactantes no iónicos, aniónicos o catiónicos, entrecruzado con hidrocloreuro de 1-(3-dimetil amino propil)-3-etil carbodiimida (EDAC) o glutaraldehído (GA) y postratado con cisteína o ácido nordihidroguaierético (ANDG). Se observó que el tratamiento con Triton X-100 o cetiltrimetil amonio (CTMA) no alteró las propiedades del PB nativo a diferencia del tratamiento con dodecil sulfato de sodio (DSS). Por otro lado, el tratamiento con GA condujo a un material con mayor índice de entrecruzamiento que el tratamiento con EDAC. Esto se comprobó mediante una mayor temperatura de desnaturalización obtenida por DSC y un menor número de grupos amino libres mediante ensayos con ninhidrina. En términos mecánicos, el tratamiento con GA condujo a un incremento en el porcentaje de deformación. El injerto de cisteína o el tratamiento con ANDG no modificó las propiedades fisicoquímicas o mecánicas de pericardio bovino entrecruzado.

## **2. Introducción**

Pericardio bovino es un tejido conectivo rico en colágeno ampliamente empleado como biomaterial en la construcción de injertos vasculares y válvulas cardíacas. Sin embargo, los biomateriales desarrollados a la fecha no cumplen sus objetivos satisfactoriamente, ya que presentan alteraciones en su función hemodinámica, durabilidad, formación de trombos y calcificación. Por lo tanto, la necesidad de biomateriales económicos y seguros motiva la modificación de biomateriales ricos en colágeno con el objetivo de mejorar sus propiedades biológicas, biomecánicas y fisicoquímicas. Estos biomateriales han sido estabilizados con diferentes agentes químicos [1], pretratados con alcoholes [2] y surfactantes [3] para inhibir la calcificación y postratados con heparina [4], ácido homocisteico [5] y lisina [6].

### 3. Condiciones Experimentales

PB nativo fue obtenido de un rastro local, lavado con agua destilada y transportado al laboratorio en solución salina (0.9% p/v NaCl) a 4°C en un plazo de 24 h. Una vez el laboratorio, PB fue tratado con 0.5% p/v DSS, 1.0% v/v Triton X-100 ó 2.0% v/v CTMA por 24 h. Entonces el PB fue exhaustivamente enjuagado con agua destilada y entrecruzado con GA o EDAC por 24 h a 25°C. Para la modificación con cisteína, BP tratado con Triton X-100 y GA o EDAC/GA fue transferido a una solución que contenía cisteína por 24 h at 25°C. Todas las modificaciones fueron realizadas usando solución salina tamponada (pH 7.4, 15mM HEPES). Para la modificación con ANDG, PB tratado con Triton X-100 y GA fue postrado con ANDG (0.3 mg/ml), de acuerdo al procedimiento de Koob et al [7] para fibras de colágeno.

La estabilidad térmica fue determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC, Pyrus1, Perkin-Elmer) con un barrido de 40 a 140°C a 10°C/min. El contenido de grupos aminos en PB fue determinado con el ensayo de ninhidrina. Para esto, muestras secas fueron colocadas en contacto con una solución acuosa citrato/ácido clorhídrico (pH 4.0) que contenía 2.0% p/v de ninhidrina y entonces calentadas a 100°C por 10 min. La absorbancia de las soluciones enfriadas a 25°C fue medida a 567 nm (Uv-Vis Beckman Coulter DU 650). La cantidad de grupos tioles sobre PB fue determinado usando el reactivo de Ellman (DNTB). Para esto, DNTB (0.001 M) fue disuelto en 1.0 M tampón de fosfato y 1 ml de esta solución diluida con 3 ml de 1.0M tampón de fosfato. Entonces, muestras de PB colocadas en contacto con esta solución y agitadas por 2 h a 25°C y la absorbancia leída a 412 nm. Las propiedades mecánicas de tensión fueron medidas con una maquina de ensayo universal Shimadzu equipada con una celda de 500 N usando una velocidad de 200 mm/min y muestras hidratadas de 60 mm (longitud) y 10 mm (ancho). El espesor de las muestras fue determinada con un medidor de espesores no rotativo (Mitutoyo). La variabilidad en la fuente fue restringida cortando muestras de una zona específica y con la misma orientación.

### 4. Resultados y discusión.

El tratamiento con Triton X-100 or CTMA, a diferencia de DSS, no cambia las dimensiones de PB (espesor). Sin embargo, después de entrecruzamiento con GA o EDAC la temperatura de encogimiento fue modificada (ver figura 1). El tratamiento con GA produjo una temperatura en

onset y pico 15°C más alta que EDAC. Además, el contenido de grupos  $[\text{NH}_2]$  libres confirma la diferencia en capacidad de estabilización del PB entre GA y EDAC (ver figura 2) y su efecto sobre la red formada. En conclusión, la reacción con GA puede llevar a un entrecruzamiento de mayor longitud mientras que EDAC lleva a un entrecruzamiento llamado de cero longitud.

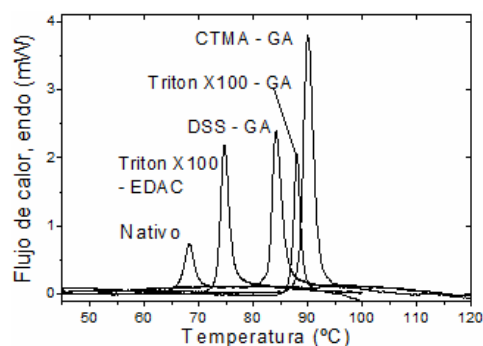


Figura 1. Curvas DSC para PB tratado con Triton X-100, DSS o CTMA, y GA o EDAC.

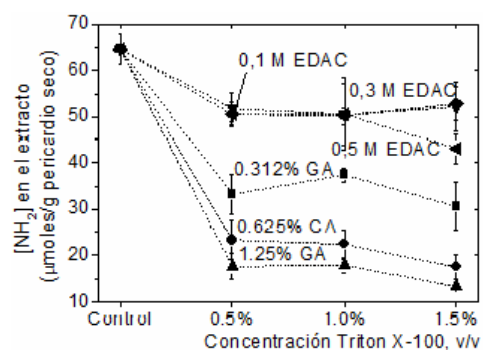


Figura 2. Contenido de grupos aminos en PB pretratado con Triton X-100 y entrecruzado con EDAC o GA .n=4.

La resistencia a la tensión disminuyó 16, 21 y 63% mientras la deformación en la ruptura incremento 65, 61 y 31% cuando PB nativo fue tratado con Triton X-100, CTMA o DSS seguido de GA. El módulo elástico fue reducido 36, 39 y 37%, respectivamente. Se ha propuesto que el PB sufre encogimiento durante el entrecruzamiento llevando así a una mayor extensibilidad [8]. Tomando esto en cuenta, en adelante, Triton X-100 fue usado en el pretatamiento de PB.

La figura 3 muestra que la cantidad injertada de cisteína depende de la concentración del aminoácido y del protocolo seguido. Una concentración máxima de  $9\mu\text{mol/g}$  de grupos tioles fueron detectados por el ensayo de Ellman.

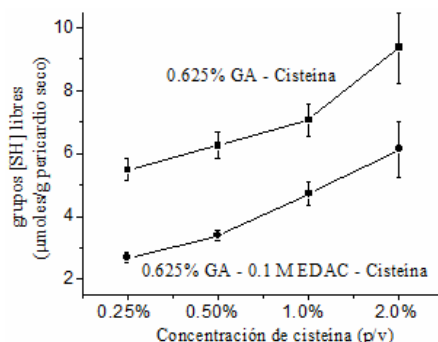


Figura 3. Contenido de grupos tioles sobre PB determinado por ensayo de Ellman,  $n=4$ .

El método de injerto de cisteína sobre PB propuesto aquí tiene dos ventajas. Por un lado, el bloqueo de GA residual comúnmente asociado con la mineralización de BP. Por otro lado, la producción de una superficie que pueda intercambiar óxido nítrico con donadores endógenos para reducir la adhesión de plaquetas. La polimerización de ANDG sobre PB puede modificar la hidrofiliidad del BP [7].

Las propiedades mecánicas y la estabilidad térmica de BP tratado con Triton X-100 y GA son mantenidos después del injerto de cisteína o del tratamiento con ANDG como se esperaba de su modificación superficial.

## 5. Conclusiones

Triton X-100 ó CTMA son preferidos sobre DSS ya que no afectan severamente las propiedades mecánicas del PB. Altas deformaciones en la ruptura ( $46.6 \pm 8.1$  %) y alta estabilidad térmica ( $87.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$ ) en PB pueden ser alcanzadas usando Triton X-100 y GA. El injerto de cisteína sobre PB fue alcanzado satisfactoriamente para PB tratado con Triton X-100 y GA o una combinación GA/EDAC. El uso de ANDG demanda futuras investigaciones.

## 6. Referencias.

- (1) Khor, E. Biomaterials 1997, 18, 95-105
- (2) Vyavahare, N; Hirsch, D; Lerner, E; Baskin, JZ; Schoen, FJ; Bianco, R; Kruth, HS; Zand, R; Levy, RJ. Circulation 1997, 95, 479-88
- (3) Schmidt, C.E.; Baier, J.M. Biomaterials 2000, 21, 2215-31
- (4) Lee, WK; Park, KD; Han, DK; Suh, H; Park, JC; Kim, YH. Biomaterials 2000, 21, 2323-30

- (5) Stacchino C; Bona, G; Bonetti, F; Rinaldi, S; Della Ciana, L; Grignani, AJ. Heart Valve Dis. 1998, 7, 190-4
- (6) Jorge-Herrero, E; Olmo, N; Turnay, J; Martín-Maestro, M; García-Páez, JM; Lizarbe, MA. Proceedings of 19th European Conference on Biomaterials, Sept 11-15, Sorrento, Italy, 2005, P4
- (7) Koob, TJ; Willis, TA; Hernandez, DJ. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 56, 31-9. Koob, TJ; Willis, TA; Qiu, YS; Hernandez, DJ. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 56, 40-8
- (8) Langdon, SE; Chernecky, R; Pereira, CA; Abdulla, D; Lee, JM. Biomaterials 1999,20, 137-53
- (9) Frost, MC; Reynolds, MM; Meyerhoff, ME. *Biomaterials* **2005**, 26, 1685-9