Acta Scientiae Veterinariae, 2016. 44: 1383.

RESEARCH ARTICLE
Pub. 1383

ISSN 1679-9216

Aspectos patológicos do implante de pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído e pela glicerina em parede abdominal de camundongos*

Pathological Features of Bovine Pericardium Implanted Into Mice Abdominal Wall after Preservation with Glutaraldehyde or Glycerin

Cláudia Borges Costa[1], Marta Fernanda Albuquerque da Silva[2] & Gisele Braziliano de Andrade[3]

ABSTRACT

***Background*:** Lately, the use of biological materials has been widely indicated in surgical procedures to restore structure and function of injured tissues. Bioimplants require different conservation techniques; among these, glutaraldehyde preservation stands out owing to its higher antimicrobial efficiency as compared to glycerin. In view of the need to determine a concentration of glutaraldehyde that can act as a biocide but do not cause undesirable tissue reactions, this study aimed to identify and quantify gross and microscopic tissue alterations after implantation of bovine pericardium, which was preserved in various concentrations of glutaraldehyde, in the abdominal wall of mice.

***Materials, Methods & Results*:** Fresh pericardia from 18 bovines were fractioned into 1cm^2 samples and treated with a 98% glycerin solution for 30 days (control group), or 0.625%, 1%, and 1.5% glutaraldehyde solution for 18 days (experimental groups). An abdominal muscle fragment was excised from each mouse, and a 1-cm^2 fragment of preserved pericardium was implanted in the area. Sixty mice (n = 15 per treatment) divided into groups were observed for 7, 14, and 30 days, and five animals from each group were euthanized at each time point for gross and microscopic examination. Fragments of the implants and adjacent skin lesions were harvested, fixed in formalin, and processed for routine histology and microscopic analysis. Both the type of inflammatory infiltrate and the repair process of the tissue response were similar between the groups that received glycerin-preserved pericardium and those that were subjected to pericardium preserved with 0.625% glutaraldehyde. Animals that received 1% glutaraldehyde-preserved implants and were examined 30 days thereafter exhibited a chronic, intense reaction with fibrosis and necrosis of the abdominal wall muscles, as well as calcification and presence of giant cells, when compared to the animals examined at 7 and 14 days in the same treatment group. These changes were also present and more intense in animals that received 1.5% glutaraldehyde-preserved pericardium examined at 14 and 30 days later, with tissue destruction and impaired incorporation of the implant into the adjacent muscle tissue.

***Discussion*:** The continuous cell destruction observed in animals treated with implants preserved with 1% or 1.5% glutaraldehyde is a hallmark of chronic inflammation, since several inflammatory cell molecules contribute to this lesion. A cycle is created: continuous degradation sustains inflammation, and inflammatory molecules contribute to the process of cell destruction. Consequently, we conclude that the use of glutaraldehyde at concentrations of 1 or 1.5% is not feasible for preservation of biological materials. Tissue repair was chronologically more effective in the group treated with glycerin-preserved implants, since animals treated with glutaraldehyde-preserved implants needed a longer period to restore due to presence of a persistent inflammatory response, immunogenicity, calcification, and deficient remodeling. The ideal preservative for biological materials should not cause chronic and/or intense inflammatory reaction in order to preserve the implant's structure and allow its perfect incorporation into the tissue, even if the chosen preservative is flexible and exhibits disinfectant properties. Therefore, we conclude that glutaraldehyde at concentrations of 0.625% to 1% is suitable as a preservative for biomaterials because the tissue reaction it causes is tolerable; additionally, glutaraldehyde at concentrations close to 1% has been described to have sterilizing properties.

Keywords: bioimplant, inflammatory reaction, chemical preservation, histopathology.
Descritores: bioimplantes, reação inflamatória, preservação química, histopatologia.

Received: 28 November 2015 Accepted: 6 June 2016 Published: 30 June 2016

*Article based on a Thesis submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the Master's Degree at the Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuRJ), Seropédica, RJ, Brazil.

[1]Secretaria Municipal de Volta Redonda, Volta Redonda, RJ. [2]Departamento de Cirurgia e Medicina Veterinária, UFRuRJ, Seropédica. [3]Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário Dom Bosco, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande, MS, Brazil. CORRESPONDENCE: G.B. Andrade [gisele@ucdb.br - Tel.: +55 (67) 3312-3797]. Av. Tamandaré n. 6000. Bairro Jardim Seminário. CEP 79117-900 Campo Grande, MS, Brazil.

INTRODUÇÃO

As membranas biológicas vem sendo constantemente utilizadas na prática da cirurgia reconstrutora. Entretanto, devido à rápida degradação e a reação inflamatória tecidual local provocada pelos bioimplantes, os tecidos biológicos necessitam ser tratados previamente, de forma que a sua estrutura e integridade mecânica original prolonguem-se, bem como suas propriedades antigênicas sejam removidas ou neutralizadas [1].

A análise das possíveis interferências no processo reparacional e reação inflamatória local provocada pelos implantes teve início no século passado, com a glicerina [16]. Embora esta substância promova uma excelente incorporação do implante tratado, apresenta eficácia antimicrobiana reduzida [18]. Desde então, a preocupação com a solução ideal e sua respectiva concentração se tornaram assunto de muitas pesquisas [1,5,11,14,25].

Concentrações de glutaraldeído a 0,5% e 0,625%, são consideradas esterilizantes e não prejudiciais à incorporação do implante. No entanto, alguns esporos de bactérias e vírus de incubação lenta não foram afetados pelo tratamento com estas concentrações [10] sendo a concentração de 0,625% ineficiente à inativação do vírus rábico [23]. O aumento nas concentrações do glutaraldeído poderia eliminar os diferentes agentes infecciosos, entretanto, estas provocam reações inflamatórias adversas devido à formação de uma cápsula fibrosa ao redor do implante [7] inflamação crônica [21], e a calcificação [1,4,11].

Nesse sentido, objetivou-se, com este trabalho, avaliar, através da macroscopia e microscopia, as reações inflamatórias teciduais após a aplicação do pericárdio bovino conservado em diferentes concentrações de glutaraldeído.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Pericárdios bovinos (n = 18) obtidos de animais abatidos em frigoríficos com Fiscalização Estadual na cidade de Três Rios, RJ, foram limpos e fracionados em áreas equivalentes a 10x10 mm. Utilizou-se como conservantes, glicerina a 98% por 30 dias [8] e glutaraldeído nas concentrações de 0,625%, 1% e 1,5%, em PBS, pH 7,2 por 18 dias, de acordo com [23].

Foram utilizados 60 camundongos machos, jovens, albinos, suíços com peso entre 20-25g, separados em 12 grupos com cinco animais cada. Os animais, mantidos em condições adequadas foram eutanasiados aos 7, 14 e 30 dias, de acordo com licença da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ (COMEP protocolo 23083.003790/2009-54).

Os Grupos foram designados em G1, G2 e G3 (controle) continham animais com implantes conservados em glicerina a 98%; G4, G5 e G6 animais com implantes conservados em glutaraldeído 0,625%; G7, G8 e G9 animais com implantes conservados em glutaraldeído 1%; e G10, G11 e G12 animais com implantes conservados em glutaraldeído 1,5%.

Os camundongos, em jejum de 12 h, foram pré-anestesiados com diazepan [15] e anestesiados com xilazina e quetamina [17] para a analgesia transoperatória. Em seguida, foi realizada uma incisão de 1,5 cm, sentido dorso-ventral na pele da região abdominal esquerda. Retirou-se, de cada camundongo, um fragmento muscular que abrangia o músculo oblíquo externo, músculo oblíquo interno e o músculo transverso abdominal e no mesmo local foi implantado um fragmento de pericárdio tratado de 1 cm^2 [9].

Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica das lesões foi realizada nos períodos pós-operatórios, aos 7, 14 e 30 dias, objetivando-se observar a reação inflamatória aguda e a crônica. Por ocasião da necropsia, coletou-se de cada animal o fragmento implantado bem como parte do tecido natural adjacente. O material coletado foi conservado em formol 10%, e encaminhado à análise histopatológica. As 60 amostras teciduais foram submetidas ao processamento de rotina, cortadas em micrótomo e os cortes corados com Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Masson. As lâminas histológicas foram observadas à microscopia de luz e fotografadas pelo sistema de captura de imagens.

Análise microscópica

O padrão inflamatório foi classificado de acordo com a intensidade da reação inflamatória em: leve - até 5 células inflamatórias por campo, moderado - de 5 a 10, e intenso - mais de 10. Em relação ao tipo celular predominante em: mononuclear - predominantemente macrófagos e linfócitos; (2) misto - macrófagos, linfócitos, e polimorfonucleares. As alterações nas fibras musculares (degeneração, necrose, calcificação distrófica e regeneração) foram classificadas em relação à intensidade em: leve - até 5 fibras musculares alteradas por campo, (2) moderado - 5 a 10, e (3) intenso - mais de 10.

RESULTADOS

Avaliação macroscópica

As análises macroscópicas dos animais com implantes conservados em Glicerina 98% (G1, G2 e G3) revelaram a cicatrização completa da pele, perda do formato original do implante e neovascularização. Ainda, observou-se ao longo do tempo que houve sobreposição de tecido conjuntivo sobre os pontos e sobre o implante, enquanto que a hiperemia formada ao redor do implante e dos pontos foi reduzindo (Figura 1A). A avaliação dos animais dos grupos 4, 5 e 6 (glutaraldeído 0,65%), demonstrou resultados semelhantes aos dos grupos de animais que receberam implantes tratados com glicerina. Entretanto, a sobreposição de tecido conjuntivo só pode ser observada a partir do 14º dia. Ainda, a perda do formato original do implante foi visualizada, em sua maioria, no período de 30 dias (Figura 1B).

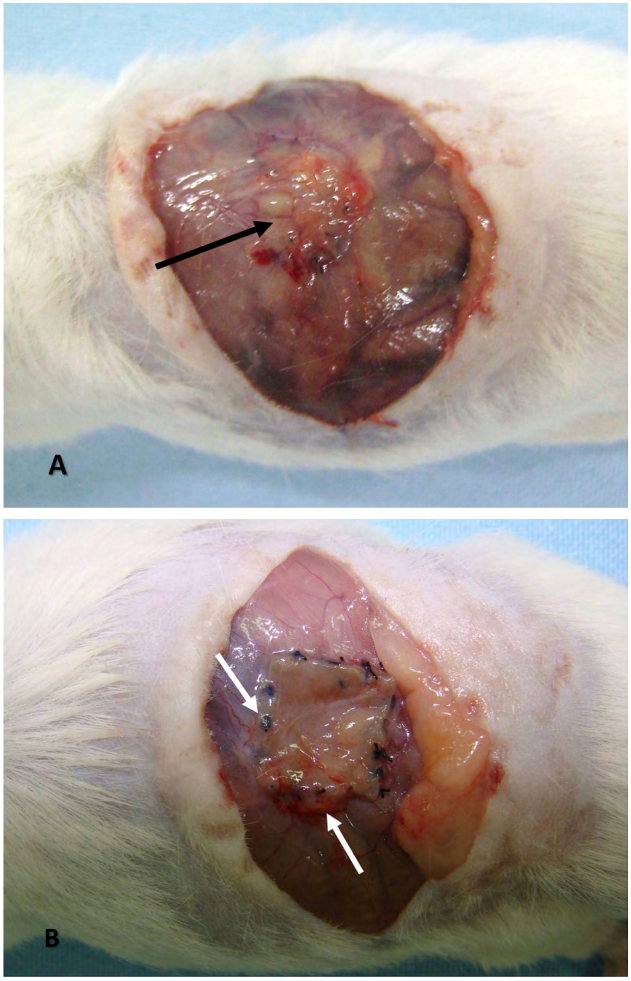

Figura 1. Região abdominal de camundongos suíços implantados com pericárdio bovino e avaliados aos 30 dias. A- Implante conservado com glicerina 98% (G3), notar pericárdio bovino com total perda do formato original e início de incorporação (seta). B- Implante conservado com Glutaraldeido 0,625 (G6), notar leve sobreposição de tecido conjuntivo nos pontos e em parte do implante (setas).

Os animais que receberam implantes conservados em Glutaraldeído 1% (G7, G8 e G9), apresentaram processo inflamatório crônico, com a neovascularização bem evidente quando comparado com os grupos que receberam pericárdios tratados com glicerina e glutaraldeído 0,625%. Aos 30 dias (G9) foi observou-se nos animais sobreposição de tecido conjuntivo sobre os pontos de sutura e implante (Figura 2A). A perda de formato original do implante não foi observada nos animais que receberam implantes conservados na concentração de glutaraldeído a 1,5% (G10, G11 e G12). A persistência de áreas hiperêmicas ao redor dos pontos esteve presente nos animais aos 30 dias (G12) e pode ser demonstrada pela neovascularização ao redor do implante e de seus pontos (Figura 2B).

Análise Microscópica

Os animais dos grupos controle, com implantes conservados em Glicerina 98%, apresentaram reação inflamatória mista, moderada a intensa, entre o implante e o músculo (7 dias); no implante e no músculo ao seu redor (14 dias); e no implante, no músculo adjacente e no processo de reparação no 30° dia. Angiogênese e fibroplasia moderadas, fibrose leve, além de necrose e regeneração muscular moderada foram observadas durante os três períodos. O encapsulamento do implante ocorreu nos animais com 14 e 30 dias, demonstrado na Figura 3A.

Nos animais dos grupos G4, G5 e G6, (Glutaraldeído 0,625%), observou-se reação inflamatória mista, moderada, localizada no músculo adjacente ao implante aos 7 dias, aos 14 e 30 dias também localizada sobre o implante. O processo reparacional se caracterizou por intensa angiogênese e fibrose moderada a intensa aos 14 dias, também observados aos 30 dias, associados à necrose leve a moderada, reparação da musculatura associada à proliferação de fibroblastos e sinais de regeneração (Figura 3B).

Os animais analisados do grupo G7 (Glutaraldeído 1,0%, 7 dias), apresentaram reação inflamatória mista, de moderada a intensa localizada entre as fibras musculares e ao redor do implante. O aspecto microscópico observados nos animais do G8 (14 dias) revelou na área entre o implante e tecido muscular, células inflamatórias, angiogênese e regeneração muscular moderada (presença de formação de miotubos delgados) e a presença de calcificação leve. Aos 30 dias (G9), (Figura 4A), permaneceram ainda as células inflamatórias e a destruição das fibras musculares o que dificultou a incorporação do implante ao tecido adjacente.

Animais implantados com pericárdio bovino tratado com glutaraldeído 1,5% (G10, G11 e G12) apresentaram reação inflamatória mista, de leve a moderada, localizada entre o implante e o músculo, no implante e entre as fibras musculares. Nos animais do G11 (14 dias), observou-se destruição muscular, angiogênese e fibroplasia intensas, leve fibrose e necrose, ao passo que aos 30 dias (G12), observou-se necrose moderada a intensa, fibras musculares com regeneração leve, calcificação com células gigantes ao redor promovendo uma escassa integração entre o implante e a pele (Figura 4B).

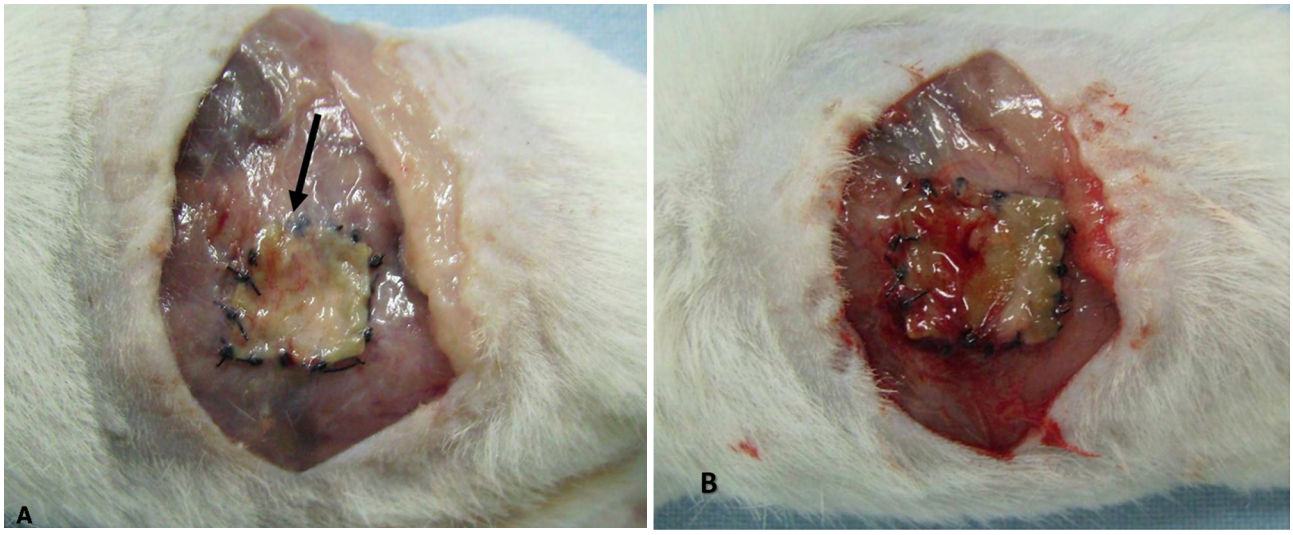

Figura 2. Região abdominal de camundongos suíços implantados com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído e analisados aos 30 dias. A- G9 (1,0%), notar leve sobreposição de tecido conjuntivo sobre alguns pontos de sutura e parte do implante (seta). B- G12 (1,5%), observar que o implante permaneceu com o formato original, ainda com áreas hiperêmicas ao redor dos pontos de sutura com parte de tecido natural.

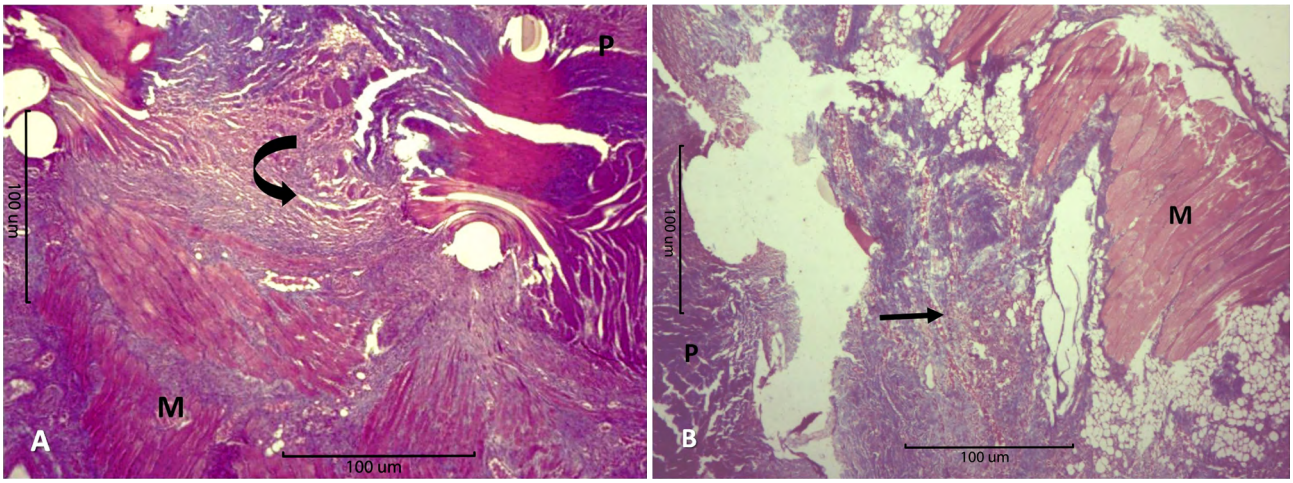

Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de parede abdominal de camundongos suíços implantados com pericárdio bovino e avaliados aos 30 dias. A- Conservado em glicerina 98% (G3), encapsulamento do implante, notar faixa de tecido conjuntivo, corado em azul, integrando o implante (P) à musculatura (M) e ao redor dos fios de sutura (seta curva) [Tricrômico de Masson, 40x]. B- Conservado com glutaraldeído 0,625% (G6), observar intensa angiogênese, fibroplasia e fibrose (seta) entre a musculatura (M) e a região de incorporação do implante (P) [Tricrômico de Masson, 40x].

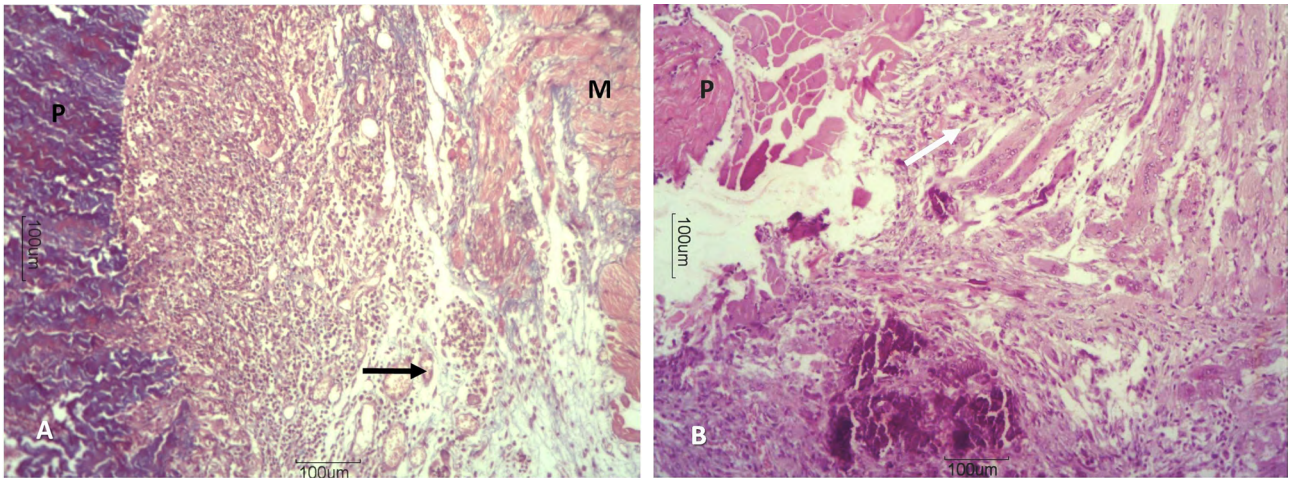

Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de parede abdominal de camundongos suíços implantados com pericárdio bovino e analisados aos 30 dias. A- Conservado com glutaraldeído 1% (G9) observa-se destruição muscular (seta), reação inflamatória moderada entre o implante e o tecido muscular (M) (seta), não havendo a integração entre estes. (TM, 40x). B- Conservado com glutaraldeído 1,5% (G12), nota-se necrose de fibras musculares com calcificação intensa (áreas arroxeadas), e presença de células gigantes (seta branca) [HE, 200x].

DISCUSSÃO

Os animais que receberam o pericárdio bovino tratado com glicerina, no presente trabalho, apresentaram perda do formato original do implante desde o primeiro período de análise, como constatado em estudos prévios [2,3,18]. Entretanto, nossos resultados mostraram que quanto maior a concentração de glutaraldeído utilizada no tratamento e conservação da membrana, maior a dificuldade do organismo para incorporá-la, uma vez que a reação inflamatória produzida e a resistência da membrana foram mais intensas.

Todos os animais que receberam implantes tratados com soluções de glutaraldeído apresentaram angiogênese em maior intensidade do que o observado nos grupos tratados com glicerina, demonstrando que a utilização do glutaraldeído induz à inflamação crônica e fibrose [7]. Este tipo de inflamação se caracteriza por uma infiltração de células mononucleares amplamente encontradas no presente estudo, que incluem macrófagos, células gigantes, linfócitos e plasmócitos.

Neste estudo, pode-se observar a ocorrência do encapsulamento dos implantes de pericárdio bovino por uma camada de fibroblastos e de colágeno, em todos os grupos tratados com glutaraldeído e glicerina. Na verdade, a fibroplasia, de moderada a intensa, esteve presente durante todo o período avaliado nos grupos que receberam implantes com soluções de glutaraldeído e glicerina. Essa etapa da reparação é considerada importante para a integração do biomaterial [6,19].

O acúmulo de neutrófilos e monócitos/macrófagos na superfície do implante, observado em todos os grupos de estudo, provavelmente com a colaboração de células fibroblásticas móveis, pode ser associado à resposta inflamatória e fibroplasia observadas ao redor do implante. No entanto, ressalta-se nos grupos tratados com glutaraldeído aos 30 dias, a presença tardia de células da fase aguda (neutrófilos) em grande quantidade juntamente com a ocorrência de necrose, diferentemente dos grupos tratados com glicerina aos 30 dias em que células mononucleares (linfócitos e plasmócitos) e fibrose predominavam. Esses resultados indicam que o processo de reparação foi mais eficiente cronologicamente no grupo dos animais tratados com glicerina, uma vez que os animais dos grupos tratados com glutaraldeído necessitaram de um período maior para atingir o mesmo padrão. Com efeito, glutaraldeído induz à uma resposta inflamatória persistente, imunogenicidade, calcificação e deficiente remodelação [24].

O efeito tóxico do pericárdio tratado com glutaraldeído tem levado à investigação de alternativas como a utilização de pericárdio decelularizado [12,13,22]. De fato, como observado no presente estudo, os animais dos grupos tratados com glutaraldeído em concentrações maiores que 1,0%, aos 30 dias apresentaram destruição muscular e insuficiente regeneração. A destruição celular continuada é uma marca da inflamação crônica, uma vez que vários produtos das células inflamatórias contribuem para essa lesão. Cria-se um ciclo onde

a degradação contínua incrementa a inflamação e os produtos desta contribuem para o processo de destruição celular.

Observamos variação no depósito mineral sobre as áreas de necrose nos grupos com pericárdio tratado com glutaraldeído, em maior grau nos grupos tratados com 1% e 1,5%. Essa calcificação distrófica foi também descrita previamente em membranas biológicas tratadas [1,5]. É proposto que o núcleo de calcificação aparece como resultado da adesão e da morte de células, as quais contêm fosfato de cálcio, fosfolipídeos, lipoproteínas e enzimas, originando a formação de grandes nódulos de cálcio, os quais dissecam os planos tissulares das biopróteses causando o seu endurecimento e a sua ruptura [20].

CONCLUSÕES

A maior concentração de glutaraldeído utilizada, 1,5%, apresentou uma citotoxicidade exacerbada levando à destruição das células musculares sem regeneração, o que indica a inviabilidade de sua utilização no tratamento de membranas biológicas.

Concentrações de glutaraldeído entre 0,625% - 1% podem ser utilizadas visto que a reação tecidual é tolerável e que concentrações de glutaraldeído próximas de 1% vem sendo descritas com características esterelizantes.

Ethical approval. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuRJ), de acordo com licença da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ (COMEP protocolo 23083.003790/2009-54).

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

1 **Baucia J.A., Leal Neto R.M., Rogero J.R. & Nascimento N. 2006.** Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído: comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 21(2): 180-187.

2 **Braga F.A. & Pippi N.L. 2009.** Uso de pericárdio heterólogo conservado em glicerina na reparação de hérnia abdominal traumática em cão. Redevet. Disponível em: < http://www.redevet.com.br/artigos/pericardio.htm# >. [Acessed October 2015].

3 **Brun M.V., Pippi N.L., Driemeier D., Contesini E.A., Beck C.A.C., Cunha O., Filho S.T.L.P., Roehsig C., Stedile R. & Silva T.F. 2004.** Solução Hipersaturada de sal ou de glicerina a 98% como conservantes de centro frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos wistar. *Ciencia Rural*. 34(1): 147-153.

4 **Christian A.J., Alferiev I.S., Connolly J.M., Ischiropoulos H. & Levy R.J. 2015.** The effects of the covalent attachment of 3-(4-hydroxy-3, 5-di-tert-butylphenyl) propyl amine to glutaraldehy depretreated bovine pericardium on structural degeneration, oxidative modification, and calcification of rat subdermal implants. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 103(7): 2441-2448.

5 **Costa J.N.L., Pomerantzeff P.M.A., Braile D.M., Ramirez V.A., Goissis G. & Stolf N.A.G. 2005.** Comparação entre pericárdio bovino decelularizado e pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 20(1): 14-22.

6 **Gamba P.G., Conconi M.T., Lo Piccolo R., Zara G., Spinazzi R. & Parnigotto P.P. 2002.** Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. *Pediatric Surgery International*. 18(5-6): 327-331.

7 **Greca F.H., Noronha L., Costa F.D.A., Souza Filho Z.A.S., Soccol A.T., Feres A.N., Duda J.R. & Adams E. 2005.** Estudo Comparativo da biocompatibilidade da mucosa intestinal porcina e pericárdio bovino usados como enxertos na veia cava de cães. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 20(4): 317-322.

8 **Goissis G., Braile D.M. & Giglioti A.F. 1999.** Desenvolvimento de processo automático para a reticulação progressiva de matrizes de colágeno com glutaraldeído. *Polímeros*. 9(4): 92-97.

9 **Haddad Filho D., Marques A., Kafejian-Haddad A.P. & Zveibel D.K. 2004.** Estudo Comparativo das reações teciduais ao implante de pericárdio bovino e a inclusão de politetrafluoroetileno expandido em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 19(2): 131-135.

10 **Hilbert S.L., Ferrans V.J. & Jones M. 1988-1989.** Tissue-derived biomaterials and their use in cardiovascular prosthetic devices. *Medical Progress Through Technology*. 14(3-4): 115-163.

11 **Jayakrishnan A. & Jameela S.R. 1996.** Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*. 17(5): 471-484.

12 **Lim H.G., Kim G.B., Jeong S. & Kim Y.J. 2014.** Valved conduit with glutaraldehyde-fixed bovine pericardium treated by anticalcification protocol. *The Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 47(4): 333-343.

13 **Lim H.G., Choi S.Y., Jeong S., Shin J.S., Park C.G. & Kim Y.J. 2015.** *In vivo* efficacy for novel combined anticalcification treatment of glutaraldehyde-fixed cardiac xenograft using humanized mice. *Journal of Biomaterials Application*. 29(7): 929-940.

14 **Maizato M.J., Pires M.D., Canzian M., Higa O.Z., Pitombo R.N. & Leirner A.A. 2008.** Histological evaluation of biocompatibility of lyophilized bovine pericardium implanted subcutaneously in rats. Artificial Organs. 32(4): 268-271.

15 **Paiva F.P., Maffili V.V. & Santos A.C.S. 2005.** *Curso de Manipulação de Animais de Laboratório*. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 28p.

16 **Pigossi N. 1964.** Implantação de dura-máter homógena conservada em glicerina: estudo experimental em cães. *Arquivos de Cirurgia e Clínica Experimental, São Paulo*. 27: 213-247.

17 **Plunkett S.J. 2006.** *Procedimentos de Emergência em Pequenos Animais*. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 521p.

18 **Quitzan J.G., Rahal S.C., Rocha N.S. & Crocci A.J. 2003.** Comparação entre pericárdio bovino preservado em glicerina e malha de poliéster no reparo de falhas da parede abdominal em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 18(4): 297-301.

19 **Santillán-Doherty P., Jasso-Victoria R., Sotres-Vega A., Olmos R., Arreola J.L., Garc-ia D., Vanda B. & Gaxiola M. 1995.** Repair of thoracoabdominal wall defects in dogs using a bovine pericardial bioprothesis. *Revista de Investigacion Clinica; organo del Hospital de Enfermidades de la Nutrición*. 47(6): 439-446.

20 **Schoen F.J., Tsao J.W. & Levy R.J. 1986.** Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization. *The American Journal of Pathology*. 123(1): 134-145.

21 **Tang L. & Eaton J.W. 1995.** Inflammatory Responses to Biomaterials. *American Journal of Clinical Pathology*. 103(4): 466-471.

22 **Thampi P., Nair D.R.L.N.V., Venugopal S. & Ramachandra U. 2013.** Pathological effects of processed bovine pericardial scaffolds--a comparative in vivo evaluation. *Artificial Organs*. 37(7): 600-605.

23 **Trani R.A.S. 2006.** Eficácia das soluções de Glicerina 98% e Glutaraldeído 0,625% na desinfecção de pericárdio de camundongos (*Mus musculus*) experimentalmente inoculados com vírus da Raiva. 68f. Seropédica, RJ. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal) - Program de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Patologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

24 **Umashankar P.R., Mohanan P.V. & Kumari T.V. 2012.** Glutaraldehyde treatment elicits toxic response compared to decellularization in bovine pericardium. *Toxicology Internatiol*. 19(1): 51-58.

25 **Vincentelli A., Latrémouille C., Zegdi R., Shen M., Lajos P.S., Chachques J.C. & Fabiani J.N. 1998.** Does glutaraldehyde induce calcification of bioprosthetic tissues? *The Annals of Thoracic Surgery*. 66(Suppl 6): S255-258.