

Entrecruzamiento en medio acuoso del biomaterial pericárdico bovino con un prepolímero de poliuretano

Birzabith Mendoza-Novelo*, José Luis Mata-Mata**

RESUMEN

Los tejidos animales destinados a la fabricación de dispositivos médicos requieren de tratamientos químicos para mejorar su durabilidad. Varias técnicas se han propuesto para preservar tales tejidos biológicos ricos en colágeno. En este estudio se reporta una nueva estrategia para entrecruzar pericardio bovino (PB) con un prepolímero de poliuretano (PUP) soluble en agua con grupos isocianato protegidos. La disminución del contenido de grupos amino libres (70 %) y el correspondiente incremento de la temperatura de encogimiento (13 °C) para PB tratado con PUP, indican la participación de los grupos amino del tejido en el proceso de estabilización. La resistencia a la digestión con colagenasa de PB tratado con PUP indican una estabilidad *in vitro* similar al tejido entrecruzado con glutaraldehído. Se puede concluir que el PUP bloqueado es un agente efectivo para la fijación en medio acuoso de tejidos biológicos de interés biomédico.

ABSTRACT

Animal tissues used in the manufacture of medical devices require chemical treatments to improve durability. A number of techniques have been proposed to preserve such collagenous biological tissues. This study reports a new strategy for the crosslinking of bovine pericardium with a blocked polyurethane prepolymer (PUP) in aqueous medium. The decrease in amino group content (70 %) and corresponding increase in shrinkage temperature (13 °C) when native tissue was treated with PUP, indicate the participation of tissue-amines in the stabilization process. The resistance toward degradation by collagenase in PUP-treated tissue indicate a *in vitro* stability similar to the glutaraldehyde-crosslinked tissue. It can conclude that the isocyanate-blocked PUP is effective agent for the aqueous fixation of biological tissues of biomedical interest.

Recibido: 26 de mayo de 2011
Aceptado: 26 de julio de 2011

INTRODUCCIÓN

El pericardio bovino (PB) es uno de los tejidos animales más usados en la reparación o sustitución de una parte del cuerpo humano, como las válvulas cardiacas (Flanagan and Pandit, 2003; Schoen and Levy, 1999; Vesely, 2005), la arteria carótida (Matsagas *et al.*, 2006), la pared abdominal (Limpert *et al.*, 2009) o vaginal (Lazarou *et al.*, 2005). Este tejido bio-protético promueve la interacción celular, exhibe capacidad de unión iónica y macromolecular y tiene buenas propiedades electrostáticas y hemostáticas (Li, 2007). Además, el PB es un tejido rico en colágeno, versátil, económico y fácil de obtener después del sacrificio industrial de animales.

La introducción de biomateriales biológicos ha estado ligada a la fijación o entrecruzamiento del tejido con glutaraldehído para incrementar su durabilidad (Carpentier *et al.*, 1969). La estabilización o preservación del tejido generalmente es alcanzada mediante la reacción química entre los grupos funcionales de los aminoácidos residuales del colágeno y el agente de entrecruzamiento. Sin embargo, el uso de glutaraldehído ha sido asociado a complicaciones en bioprótesis experimentales y clínicas (Jorge-Herrero *et al.*, 2005), por lo que se han probado otros agentes de entrecruzamiento, tales como carbodiimida (Everaerts *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1996; Mendoza-Novelo & Cauich-Rodríguez, 2009), compuestos epoxi (Sung *et al.*, 1996; Zeeman *et al.*, 2000; Connolly *et al.*, 2005), hidrogel de poli(acrilamida) (Oosthuysen *et al.*, 2006) y genipina (Sung *et al.* 1999; Sung *et al.*, 2000).

Palabras clave:

Pericardio bovino; entrecruzamiento; prepolímero de poliuretano; propiedades a la tensión.

Keywords:

Bovine pericardium; crosslinking; polyurethane prepolymer; tensile properties.

*Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica, División de Ciencias e Ingeniería, Universidad de Guanajuato. Loma del Bosque No.103, C. P. 37150, León, Gto., México, Correo electrónico: bmnovelo@fisica.ugto.mx Teléfono +52-477-7885100 ext. 8464

**Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. Noria alta s/n, C. P. 36050, Guanajuato, Gto., México, Correo electrónico: matamm@ugto.mx Teléfono: +52-473-7322034 ext. 8135

El entrecruzamiento produce un material menos antigénico y susceptible a degradación, pero produce ciertos problemas en los biomateriales derivados de tejidos. Entre estos problemas están la calcificación, la presencia de actividad enzimática residual, de material extracelular no colagénico, de material celular muerto o de concentración de esfuerzos mecánicos (Zilla *et al.*, 2008). En adición, aspectos socioeconómicos limitan el acceso a dispositivos médicos a pacientes que los necesitan. Por lo tanto, la necesidad de biomateriales seguros y económicos ha motivado el desarrollo de alternativas sintéticas con el objetivo de mejorar sus propiedades fisicoquímicas, biomecánicas y biológicas.

Los poliuretanos son polímeros con enlaces -NH-CO-O a lo largo de las cadenas macromoleculares y con un amplio uso en aplicaciones biomédicas. La alta reactividad de los grupos isocianato es la base de la síntesis de poliuretanos. Si el reactivo nucleofílico contiene grupos hidroxilo en su estructura se formarán grupos uretano, si contiene grupos amina se formarán grupos urea. Las proteínas de matriz extracelular elastina, fibronectina y colágeno se han entrecruzado con diisocianatos (Nowatzki and Tirrell, 2004; Naimark, *et al.*, 1995; Olde Damink *et al.*, 1995) y oligómeros de poliuretano (Loke *et al.*, 1996). Dicho entrecruzamiento tiene las desventajas del uso de mezclas de solventes orgánicos o detergentes y del riesgo en el manejo de diisocianatos, junto con problemas de difusión y reacción secundaria de hidrólisis durante el tratamiento acuoso (Olde Damink *et al.*, 1995; Loke *et al.*, 1996).

Con esto en mente, en este estudio se describen la modificación química de PB con un agente de entrecruzamiento di-funcional basado en un prepolímero de poliuretano soluble en agua con grupos isocianato protegidos y su efecto sobre las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del biomaterial natural estabilizado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El agente de entrecruzamiento basado en prepolímero de poliuretano (PUP) terminado en grupos carbamoilo sulfonato de sodio fue sintetizado de acuerdo al método descrito con anterioridad (Mata-Mata *et al.*, 2008). El PUP empleado en este estudio está basado en un macrodiol de poli (óxido de etileno) de 1 000 Da (Sigma) y hexametilén diisocianato (HDI Luxanate Aliphatic Isocyanate HM, Lyondell). La sal disódica

de piperanina-1,4-bis (2-ácido etanosulfónico) (PIPES), la sal disódica de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) y la Colagenasa tipo I fueron obtenidos de Sigma. La ninhidrina (2,2-dihidroxi-1,3-indandiona) fue obtenida de Merck. Del mismo modo, los otros productos químicos fueron obtenidos de fuentes de comerciales.

Preparación y fijación química del tejido

El pericardio bovino (PB) fue obtenido del rastro municipal de ciudad de Guanajuato, lavado con agua para eliminar sangre y fluido corporal y seccionado para eliminar grasa externa. El tejido pericárdico fue transportado en solución salina tamponada con un pH 7.4 (0.9 % NaCl y 0.03 M PIPES) a 4 °C y tratado en un plazo no mayor de 24 h en el laboratorio. Las muestras hidratadas de PB fueron pesadas y sumergidas en SST en una relación 1/1 masa en g/volumen en ml. Entonces, la primera etapa de fijación fue iniciada por la adición de 10 % v/v de PUP a la SST que contiene el tejido y agitación orbital durante 3 h a 24 °C. En la segunda etapa de fijación, 0.5 % p/p de óxido de magnesio fue agregado a la mezcla de reacción con el propósito de incrementar el pH del medio de reacción a 9.0. La reacción fue continuada durante 10 h adicionales. Finalmente, las muestras de tejido fueron retiradas del medio de reacción y lavadas exhaustivamente con agua desionizada y SST que contenía 0.03 M EDTA. Muestras de PB fueron entrecruzadas con glutaraldehído al 0.625 % v/p durante 24 h a temperatura ambiente, como está descrito en reportes previos (Jorge Herrero *et al.*, 2005; Mendoza-Novelo and Cauch-Rodríguez, 2009). Este tejido fue usado como material control.

Evaluación de las propiedades del tejido fijado

Determinación de la temperatura de encogimiento (T_e)

La T_e de las muestras de tejido fue determinada mediante el método estándar ASTM D-6076-97 (Standard). Tiras de tejido (5 mm × 30 mm, $n=4$) fueron colocadas entre dos pinzas (una estática y una móvil) del equipo Otto Spechs y calentadas en un baño de agua de 40 °C a 90 °C a 3 °C/min. La detección de desplazamiento de la pinza móvil fue usada para registrar la T_e .

Análisis de contenido de grupos amino residuales (CAR)

El CAR fue determinado mediante análisis espectroscópico descrito previamente (Drochioiu *et al.*, 2001; Mendoza-Novelo and Cauch Rodríguez, 2009). Bloques de tejido (10 mm × 10 mm, $n=4$) de masa

conocida fueron agregados a solución de ninhidrina (3 mL, 1.0 % p/v en solución tamponada de citrato pH 5.0) y calentados durante 20 min en un baño de agua a ~95 °C. Finalmente, la solución fue enfriada a 25 °C y las absorbancias fueron determinadas en un espectrofotómetro Uv-Vis Beckman Coulter DU 650 (567 nm). La concentración de grupos aminos en la solución fue calculada usando un coeficiente de absorción molar de 1640 nL/nmol cm y expresado como mmol por mg de tejido seco.

Resistencia a la digestión con colagenasa (RDC)

Bloques de tejido (10 mm × 10 mm, $n=4$) de masa conocida fueron incubados en una solución de colagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum* (1 mL, 288 U/mg, 0.25 mg/ml en 0.05M Tris•HCl, 0.03 % azida de sodio y 0.005M CaCl₂•2H₂O, pH 7.4) a 37 °C durante 20 h. Entonces, las muestras remanentes fueron retiradas de la solución enzimática, enjugadas en solución 0.05 M Tris•HCl pH 7.4 que contenía 0.03 % azida de sodio y 0.005 M EDTA, liofilizadas y pesadas. La RDC fue calculada como la masa de tejido post-digestión y expresada como el porcentaje de la masa de tejido pre-digestión. Con el sobrenadante se llevó a cabo la determinación grupos amino liberados del tejido mediante el ensayo de ninhidrina, usando 100 µL de la solución de colagenasa después de la digestión del tejido.

Hinchamiento y contenido de agua

Los espesores de muestras (10 mm × 10 mm, $n=4$) de tejido antes (nativo) y después del entrecruzamiento fueron medidos con micrómetro digital no rotativo Mitutoyo. El hinchamiento fue expresado como el porcentaje del cambio en el espesor del tejido. En otra serie de experimentos, bloques de tejido (10 mm × 10 mm, $n=4$) fueron secados entre dos papeles filtro, pesados, secados (80 °C, 20 h) y pesados otra vez. El contenido agua fue expresado como el porcentaje de masa perdida durante el secado.

Ensayo mecánico de tensión uniaxial

Los ensayos de tensión a 37 °C fueron realizados para caracterizar el comportamiento mecánico de las muestras de tejido nativo y entrecruzado. Tiras de 30 mm (longitud) × 5 mm (ancho) fueron obtenidas de muestras de tejido pericárdico en dirección perpendicular a la dirección raíz-ápice. El espesor medio de cada muestra fue determinado por una serie de mediciones en cuatro puntos diferentes usando un micrómetro digital Mitutoyo. Las muestras fueron colocadas entre

dos mordazas con espacio efectivo de 20 mm entre ellas y colocadas en una máquina de tensión electromecánica (Instron 4411) adaptada con una cámara transparente y sumergidas en un solución salina calentada a 37 °C mediante un baño externo (Guinea *et al.*, 2008). Entonces, los ensayos de relajación de esfuerzos fueron realizados por el estiramiento de las tiras de tejido a un esfuerzo dado de 100 kPa usando una velocidad de 50 mm/min; el aparato fue detenido y la carga del tejido registrada durante 100 s. El nivel de esfuerzo de 100 kPa fue elegido para estudiar el comportamiento viscoelástico del tejido a bajos niveles de esfuerzo y deformación, cercanos a los valores fisiológicos. Después del ensayo de relajación, las tiras de tejido fueron descargadas y entonces estiradas de nuevo hasta la rotura a una velocidad de extensión de 1.8 mm/min.

Análisis de los datos mecánicos

La razón de relajación de esfuerzo a 100 s fue calculada como la razón del esfuerzo inicial al esfuerzo final después de los 100 s de relajación. Las curvas esfuerzo-deformación fueron graficadas para cada muestra. La deformación y el esfuerzo máximo fueron calculados usando la longitud efectiva entre mordazas, el ancho y el espesor de cada tira. El módulo elástico fue obtenido como la pendiente de la segunda región lineal (esfuerzo y deformación altos).

Microscopía electrónica de barrido

La morfología del tejido pericárdico nativo y fijado fue investigada con un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío (SEM, JEOL, JSM 6360LV). Las muestras de tejido pericárdico hidratado fueron congeladas con nitrógeno y entonces observadas en el SEM con un voltaje de 15 keV.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de datos se realizó usando análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Los resultados fueron considerados significantes en valores $p < 0.05$ y presentados como la media ± desviación estándar de la media.

RESULTADOS

Temperatura de encogimiento (T_c)

El tratamiento del tejido pericárdico con el prepolímero de poliuretano resultó en un incremento significativo

de la temperatura de encogimiento comparado a tejido nativo (figura 1a). El entrecruzamiento de tejido con glutaraldehído produjo un aumento de 17 °C en la T_c del tejido nativo, mientras que la fijación con el prepolímero resultó en un aumento máximo de 13 °C.

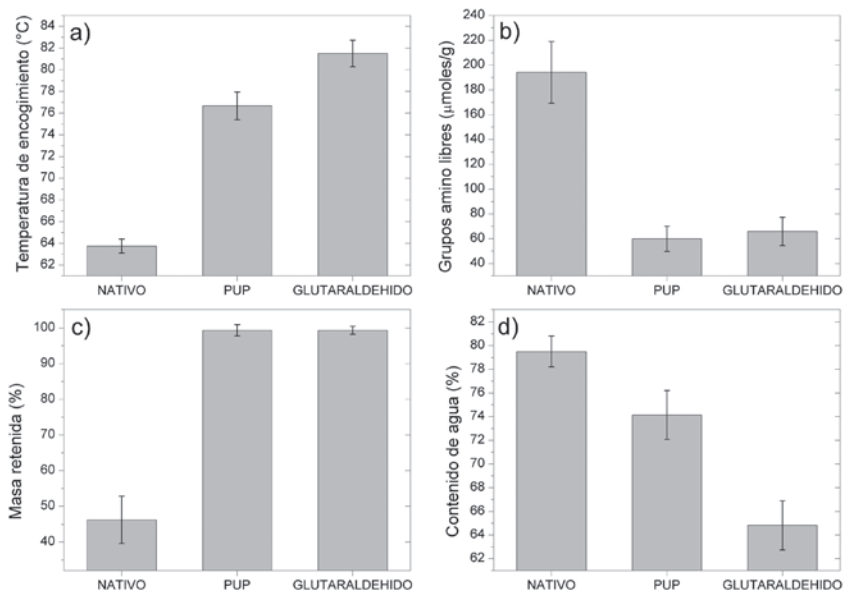


Figura 1: Propiedades fisicoquímicas del tejido pericárdico nativo y entrecruzado con prepolímero de poliuretano (PUP) o glutaraldehído.

Contenido de aminos residuales (CAR)

El entrecruzamiento del tejido pericárdico con el prepolímero de poliuretano o con el glutaraldehído resultó en una disminución significativa de alrededor del 70 % del CAR respecto al tejido nativo (figura 1b). La disminución en el CAR es resultado de la reacción entre los grupos amino del tejido y grupos isocianato del prepolímero de poliuretano (figura 2).

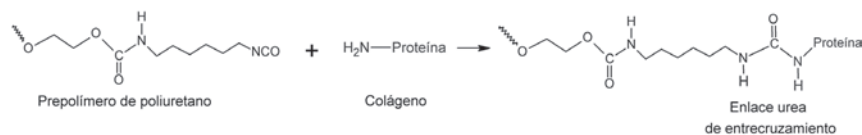


Figura 2: Esquema de reacción entre grupos isocianato (NCO) del prepolímero de poliuretano y grupos amino (NH_2) de una proteína que resulta en un enlace urea.

Resistencia a la digestión con collagenasa (RDC)

Un incremento en la RDC se observó en el tejido fijado con prepolímero de poliuretano o con glutaraldehído. El tejido nativo liberó un exceso de 609 micromoles de grupos amino por gramo de tejido seco, demostrando que no tiene resistencia a la collagenasa. Las muestras de tejido entrecruzado tanto con glutaraldehído como con prepolímeros conservaron por

arriba del 90 % de su masa después de la digestión, mientras que el tejido nativo sólo retuvo el 40 % de su masa original (figura 1c).

Hinchamiento y contenido de agua

El entrecruzamiento del tejido pericárdico nativo con el prepolímero de poliuretano incrementó el hinchamiento en 36.2 ± 16.8 %. El contenido de agua del tejido pericárdico nativo disminuyó después de los procesos de fijación (figura 1d). Sin embargo, se observó una deshidratación más severa en tejido entrecruzado con glutaraldehído que en tejido entrecruzado con prepolímero.

Propiedades mecánicas de tensión

Las curvas esfuerzo-deformación de tejido pericárdico fijado, exhiben el comportamiento no lineal comúnmente observado en tejido ricos en colágeno (figura 3a). El punto de transición entre la porción de menor rigidez y la porción de mayor rigidez ocurrió a deformaciones diferentes en tejido fijado con prepolímero de poliuretano y glutaraldehído (figura 3b). Los procesos de entrecruzamiento con glutaraldehído o prepolímero de poliuretano alteraron las propiedades en la rotura del tejido pericárdico nativo (tabla 1). La resistencia a la tensión del tejido pericárdico nativo disminuyó alrededor de 50 % después de los procesos de fijación. Asimismo, el módulo elástico del tejido nativo cayó 51 % y 60 % en tejido fijado con prepolímero y glutaraldehído, respectivamente. La relajación de esfuerzo fue usada para comparar las propiedades viscoelásticas del tejido pericárdico nativo y entrecruzado. La relajación de esfuerzo de tensión para PB nativo sufrió alteración en ambos procesos de entrecruzamiento (tabla 1).

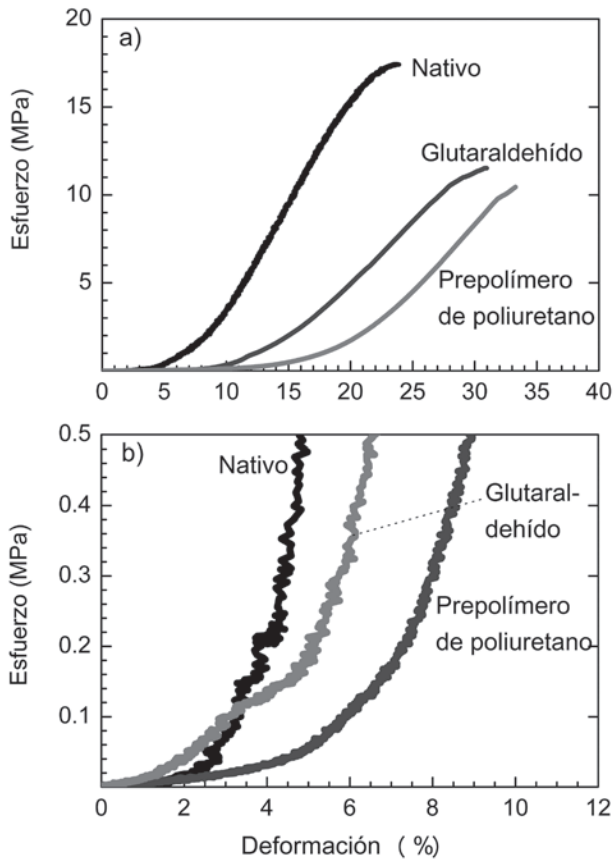


Figura 3: Curvas representativas esfuerzo-deformación para tejido pericárdico bovino nativo y entrecruzado con prepolímeros de poliuretano o glutaraldehído, mostrando las curvas completas (a) y una ampliación de la zona inicial (b).

Tabla 1.

Propiedades mecánicas de tensión para tejido pericárdico bovino nativo y entrecruzado con prepolímero de poliuretano (PUP) o glutaraldehído

	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación máxima (%)	Módulo elástico (MPa)	Razón de relajación de esfuerzos (%)
Nativo	23.3±7.7	28.1±3.8	169.1±48.2	1.40±0.22
PUP	10.2±2.3	38.6±6.4	82.3±27.7	1.11±0.02
Glutaraldehído	12.9±4.5	35.6±4.2	66.4±16.3	1.15±0.06

Microestructura del tejido entrecruzado

El análisis por SEM de pericardio bovino entrecruzado con prepolímero de poliuretano reveló la conservación de la estructura fibrosa del tejido pericárdico (figura 4). Las fibras de colágeno están ensambladas en capas de múltiples orientaciones. El tejido fijado con prepolímero mostró una pérdida de la estructura laminar y una estructura porosa, mientras que el PB entrecruzado con glutaraldehído no mostró estructura porosa.

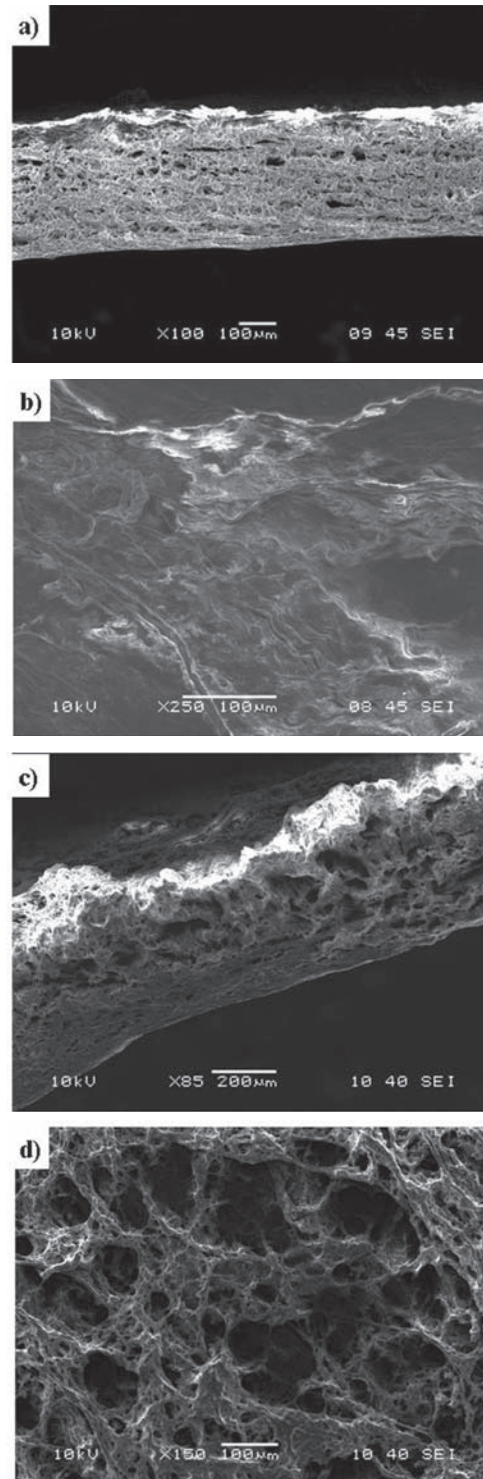


Figura 4: Análisis microestructural por SEM del tejido pericárdico entrecruzado con glutaraldehído (a,b) o prepolímero de poliuretano (c,d), mostrando la sección transversal (a,c) y superficie rugosa (b,d).

DISCUSIÓN

En general, la preservación de tejidos naturales para obtener biomateriales con aplicaciones biomédicas se logra a través de reacciones de entrecruzamiento químico. Varios protocolos de fijación o entrecruzamiento se han reportado en la literatura a fin de encontrar el procedimiento ideal para la estabilización estructural del colágeno. En este estudio, se propone un nuevo método para la estabilización de tejidos mediante su tratamiento con un prepolímero de poliuretano (PUP) soluble en agua que contiene grupos isocianato protegidos. Las principales ventajas que presenta el PUP con grupos isocianato modificados son solubilidad en agua, reducida toxicidad comparada con el diisocianato de origen, resistencia a la hidrólisis en solución ácida o neutra y reactividad con grupos amino para formar ureas. De tal manera que al reducirse el riesgo en su utilización y mejorar sus propiedades de estabilidad, los prepolímeros pueden ser utilizados como agentes de entrecruzamiento.

La estabilidad *in vitro* del pericardio bovino (PB) entrecruzado con PUP o con glutaraldehído se evaluó mediante la temperatura de encogimiento hidrotérmico, la resistencia a la degradación y el contenido de grupos amino residuales.

Un incremento en el entrecruzamiento conduce a un incremento en la temperatura de encogimiento debido a la estabilización de la triple hélice y a la reducida absorción de agua (Oosthuysen *et al.*, 2006). La modificación del tejido con PUP resultó en un incremento significativo de la temperatura de encogimiento (figura 1a), sin embargo, no alcanzó los niveles observados con glutaraldehído. Esto puede asociarse a la diferencia en la hidrofiliidad o el peso molecular entre ambos agentes de entrecruzamiento o a la naturaleza polimérica del PUP.

El contenido de grupos amino libres disminuyó después del tratamiento de PB con glutaraldehído y PUP (Fig. 1b). El glutaraldehído reacciona con el tejido formando enlaces imino, mientras que el PUP reacciona con el tejido formando enlaces urea (figura 2). La alta reactividad del grupo isocianato es la clave para la química de la reacción de entrecruzamiento con el PUP. El entrecruzamiento entre el colágeno y el PUP es resultado de un ataque nucleofílico al carbono del carbonilo ligeramente electropositivo del grupo isocianato por grupos ricos en electrones amino del colágeno. La reacción de los grupos isocianato con los grupos amino primarios ($-NH_2$) ocurre a una velocidad mayor que con grupos hidroxilo, carboxílico o amida (Tu *et al.*, 1993).

La resistencia a la digestión hacia colagenasa del tejido entrecruzado con PUP es semejante a la mostrada por el PB entrecruzado con glutaraldehído (figura 1c). Los espacios intersticiales vacíos en el tejido podrían ser ocupados por el PUP. La naturaleza polimérica del agente de entrecruzamiento puede favorecer una protección del tejido a la digestión por la exclusión espacial de las enzimas proteolíticas (Oosthuysen *et al.*, 2006).

La diferencia en la capacidad de retener agua por unidad de masa entre el tejido fijado con PUP y fijado con glutaraldehído da un indicio de diferencias en el carácter hidrofílico del tejido estabilizado (figura 1d). Uno de los componentes del PUP es el poli (etilén glicol) (PEG), el cual es un polímero hidrofílico que mejora la hemocompatibilidad de biomateriales y reduce la inmunogenicidad de proteínas conservando sus propiedades biológicas (Vasudev and Chandy, 1999).

Aunque en la mayoría de los materiales poliméricos, el entrecruzamiento disminuye la deformación máxima, el entrecruzamiento de PB induce un incremento en la deformación máxima asociado al encogimiento del tejido (tabla 1). La respuesta esfuerzo-deformación presenta una región inicial de bajo esfuerzo con gran deformación y entonces, una transición (región en forma de 'talón de pie') a una región donde el esfuerzo incrementa rápidamente con la deformación (figura 3a). En la región lineal antes de la rotura, las fibras se alinean en la dirección de la carga, dicha alineación puede depender del entrecruzamiento inter-fibrilar y la orientación original preferencial de las fibras de colágeno. En un tejido nativo no entrecruzado, estas fibras pueden tener más libertad para alinearse a la dirección de la carga que en tejido entrecruzado. Lo cual podría asociarse con la reducción del módulo elástico cuando el tejido nativo fue entrecruzado (tabla 1). La flexibilidad molecular del PUP parece conferir un comportamiento más elástico (mayor deformación, menos rigidez) en la parte inicial de la curva esfuerzo-deformación comparado a glutaraldehído (figura 3b). Sin embargo, las propiedades viscoelásticas dependientes del tiempo para tejido pericárdico entrecruzado con PUP o con glutaraldehído no fueron diferentes (tabla 1).

La apertura fibrillar observada en tejido entrecruzado con PUP, tanto en la sección transversal (figura 4a y 4c) como en la superficie rugosa (figura 4b y 4d), puede asociarse con el hinchamiento del PB durante la fijación. Estos cambios morfológicos observados en PB entrecruzado podrían favorecer la difusión de células, factores de crecimiento, iones, etc.

Como un comentario final, la exitosa preservación del pericardio bovino con PUP, permite prever que la química de prepolímeros con grupos isocianato protegidos puede ser explorada y explotada para la modificación de otros tejidos y proteínas en un medio completamente acuoso. No obstante, la efectividad del PUP como agente de entrecruzamiento y su efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de otros tejidos deben ser estudiados en particular debido a la variabilidad en la fuente, composición y densidad, entre otros factores.

CONCLUSIONES

El tejido bio-protético pericardio bovino entrecruzado en medio acuoso con prepolímero de poliuretano que contiene grupos isocianato protegidos mostró estabilidad *in vitro*, capacidad de relajación de esfuerzos, resistencia a la tensión y módulo elástico a altos niveles de deformación similar al tejido entrecruzado con glutaraldehído. La deshidratación y la rigidez a bajos niveles de deformación fue menor en tejido entrecruzado con prepolímero de poliuretano que en el tejido entrecruzado con glutaraldehído. En consecuencia, el tratamiento de pericardio bovino con prepolímero de poliuretano se propone como una técnica efectiva para el entrecruzamiento en medio acuoso de tejido bio-protético.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad de Guanajuato por la beca de Formación de Jóvenes Investigadores otorgada a B.M.N. Se agradece a E. Jorge-Herrero del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (Madrid, España), G. Guinea Tortuero de la Universidad Politécnica de Madrid y J.V. Cauich Rodríguez del Centro de Investigación Científica de Yucatán por las facilidades otorgadas para la realización de ensayos biomecánicos y análisis SEM. Se agradecen las sugerencias de los revisores para mejorar este artículo.

REFERENCIAS

Carpentier, A., Lemaigre, G., Robert, L., Carpentier, S. and Dubost, C. (1969). Biological factors affecting the long-term results of valvular heterografts. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 58, 467-483.

Connolly, J. M., Alferiev, I., Clark-Gruel, J. N., Eidelman, N. Sacks, M., Palmatory, E., Kronsteiner, A., DeFelice, S., Xu, J., Ohri, R., Narula, N., Vyavahare, N. and Levy, R. J. (2005). Triglycidylamine crosslinking of porcine aortic valve cusps or bovine pericardium results in improved biocompatibility, biomechanics, and calcification resistance. *American Journal of Pathology* 116, 1-13

Drochioiu G., Sunel, V., Onisco, C., Basu, C. and Murariu, M. (2001). The breakdown of plant biostructure followed by amino acids determination. *Roumanian Biotechnological Letters* 6, 155-165.

Everaerts, F., Torrianni, M., van Luyn, M., van Wachem, P., Feijen, J. and Hendricks, M. (2004). Reduced calcification of bioprostheses cross-linked via an improved carbodiimide based method. *Biomaterials* 24, 5523-5530

Flanagan T. C., and Pandit A. (2003) Living artificial heart valve alternatives: a review. *European Cells & Materials Journal* 6, 28-45.

Guinea G. V., Atienza J. M., Fantidis P., Rojo F. J., Ortega A., Torres M. (2008). Increases of corporal temperature as a risk factor of atherosclerotic plaque instability. *Annals of Biomedical Engineering* 36, 66-76.

Jorge-Herrero, E., García Paez, J. M. and Del Castillo-Olivares Ramos, J. L. (2005). Tissue heart valve mineralization: Review of calcification mechanisms and strategies for prevention. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* 3, 67-82.

Lazarou, G., Powers, K., Pena, C., Bruck, L. and Mikhail, M. S. (2005). Inflammatory reaction following bovine pericardium graft augmentation for posterior vaginal wall defect repair. *International Urogynecology Journal* 16, 242-244.

Lee, J. M., Edwards, H. H. L., Pereira, C. A. and Samii, S. I. (1996). Crosslinking of tissue-derived biomaterials in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 7, 531-541.

Li, S. T. (2007). Biologic biomaterials: tissue-derived biomaterials (collagen). En Wong, J. Y. y Bronzino, J. D. (Ed.), *Biomaterials* (p. 7.1-7.23) Boca Raton, FL, USA, CRC Press.

Loke, W. K., Khor, E., Wee, A., Teoh, S. H. and Chian, K. S. (1996). Hybrid biomaterials based on the interaction of polyurethane oligomers with porcine pericardium. *Biomaterials* 17, 2163-2172.

Limpert, J. N., Desai, A. R., Kumpf, A. L., Fallucco, M. A. and Aridge, D. L. (2009). Repair of abdominal wall defects with bovine pericardium. *The American Journal of Surgery* 198, e60-e65.

Mata-Mata, J. L., Mendoza, D., Alvarado, D. I. y Amézquita, F. J. (2008). Dispersiones acuosas de poliuretano bloqueadas, una alternativa como agente curtierte. *Polímeros: Ciencia e Tecnología* 18, 138-143.

Matsagas, M. I. and Bali, C., Arnaoutoglou, E., Papakostas, J. C., Nassis, C., Papadopoulos, G. (2006). Carotid endarterectomy with bovine pericardium patch angioplasty: mid-term results. *Annals of Vascular Surgery* 20, 614-619.

Mendoza-Novelo, B. and Cauich-Rodríguez, J. V. (2009). The effect of surfactants, crosslinking agents and L-cysteine on the stabilization and mechanical properties of bovine pericardium. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanical* 7 (2) 123-131.

Naimark, W. A., Pereira, C. A., Tsang, K. and Lee, J. M. (1995). HMDC crosslinking of bovine pericardial tissue: a potential role of the solvent environment in the design of bioprosthetic materials. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 6, 235-241.

Nowatzki, P. J. and Tirrell, D. A. (2004). Physical properties of artificial extracellular matrix protein films prepared by isocyanate crosslinking. *Biomaterials* 25, 1261-1267.

Olde Damink, L. H. H., Dijkstra, P. J., Luyn, M. J. A., Wachem, T. P. B., Nieuwenhuis, P. and Feijen, J. (1995). Crosslinking of dermal sheep collagen using hexamethylene diisocyanate. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 6, 429-434.

- Oosthuysen, A., Zilla, P. P., Human, P. A., Schmidt, C. A. P. and Bezuidenhout, D. (2006). Bioprosthetic tissue preservation by filling with a poly(acrylamide) hydrogel. *Biomaterials* 27, 2123-2130.
- Schoen, F. J. and Levy, R. J. (1999). Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *Journal of Biomedical Materials Research* 47, 439-475.
- Sung, H. W., Chang, Y., Chang, W. H. and Chen, Y. C. (2000). Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: fixation rate and effect of pH, temperature and initial fixative concentration. *Journal of Biomedical Materials Research* 52A, 77-87.
- Sung, H. W., Chang, Y., Chiu, C. T., Chen, C. N. and Liang, H. C. (1999). Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Journal of Biomedical Materials Research* 47A, 116-126.
- Sung, H. W., Shih, J. S. and Hsu, C. S. (1996). Crosslinking characteristics of porcine tendons: Effects of fixation with glutaraldehyde or epoxy. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30, 361-367.
- Standard Test Method for Shrinkage Temperature of Leather, D 6076-97, p. 637-639.
- Tu, R., Lu, C. L., Thyagarajan, K., Wang, E., Nguyen, H., Shen, S., Hata, C. and Quijano, R. C. (1993). Kinetic study of collagen fixation with polyepoxy fixatives. *Journal of Biomedical Materials Research* 23, 3-9.
- Vasudev, S. C. and Chandy T. (1999). Polyethylene glycol-grafted bovine pericardium: a novel hybrid tissue resistant to calcification. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10, 121-128.
- Vesely, I. Heart valve tissue engineering. (2005). *Circulation Research* 97, 743-755.
- Zeeman, R., Dijkstra, P. J., van Wachem, T. P. B., van Luyn, M. J. A., Hendriks, M., Cahalan, P. T. and Feijen, J. (2000). The kinetics of 1,4-butanediol diglycidyl ether crosslinking of dermal sheep collagen. *Journal of Biomedical Materials Research* 51, 541-548.
- Zilla, P., Brink, J., Human, P. and Bezuidenhout D. (2008). Prosthetic heart valves: Catering for the few. *Biomaterials* 29, 385-406.