

O PROCESSO DA TECNOLOGIA CROSS LINK: UMA ANÁLISE TÉCNICA DOS IMPLANTES PERMACOL™

INTRODUÇÃO

O implante cirúrgico Permacol™ é uma matriz acelular de colágeno dérmico porcino fibrosa, estéril, esbranquiçada, úmida, resistente, porém flexível e com exclusivo design de ligação cruzada (Cross Link) acelular de seus constituintes de fibras de elastina.

Foi projetado para implantação e destina-se ao uso como um emplastro para reforçar o tecido mole onde existe fraqueza e para o reparo cirúrgico de membranas danificadas ou rompidas.

É especificamente indicado para o reparo de defeitos na parede abdominal e hérnias, mas não limitadas à hérnia inguinal, incisional, diafragmática e parastomais.

O implante cirúrgico Permacol™ foi fabricado para ser biocompatível, o que permite a incorporação no tecido hospedeiro com crescimento celular e neovascularização associada. Os implantes cirúrgicos Permacol™ possuem a tecnologia Cross Link, ou seja, ligação cruzada, usando hexametileno diisocianato (HMDI). O Cross Link fornece resistência à degradação pela colagenase, conferindo os benefícios de longevidade, durabilidade e estabilidade.

O objetivo desse artigo é fornecer uma análise da tecnologia Cross Link, os benefícios e possíveis limitações desse processo. A literatura relevante atual, em relação ao Cross Link, também será incluída nessa análise.

QUÍMICA DO COLÁGENO – LIGAÇÕES CRUZADAS NATURAIS

O colágeno é uma proteína fibrosa com uma unidade estrutural básica (tropocolágeno), a qual é composta de três cadeias de polipeptídeos de aproximadamente 100 aminoácidos cada, arranjadas em uma estrutura helicoidal tripla. As moléculas de tropocolágeno são arranjadas na formação alternada para formar as fibrilas de colágeno. Essas fibrilas são, então, agrupadas para formar as fibras de colágeno.^{1,2}

A estrutura de tropocolágeno, também chamada de estrutura de tripla hélice, é estabilizada por ligações cruzadas naturais, chamadas ligações de hidrogênio, entre três filamentos da hélice, e é o rígido invólucro das cadeias que confere a alta força de tensão ao colágeno. Novos aminoácidos são empregados no colágeno para facilitar a ligação de hidrogênio. Esses são 4-hidroxiprolina, 3-hidroxiprolina e 5-hidroxilisina. Os resíduos de lisina podem também ser modificados dentro das moléculas de tropocolágeno para formar derivados do aldeído, o qual é capaz de formar uma ligação cruzada covalente intramolecular estável entre dois filamentos dentro do tropocolágeno. Essas ligações cruzadas podem variar dependendo da natureza e idade do tecido colagenoso. Com a ligação cruzada, ocorre aumento da resistência à lise por enzimas, aumentada com a idade.^{3,4} Portanto, as ligações cruzadas naturais existem no colágeno nativo e têm função de estabilizar a estrutura da proteína de colágeno, fornecendo força mecânica.⁵

QUÍMICA DA LIGAÇÃO CRUZADA

Os implantes cirúrgicos Permacol™ possuem ligação cruzada usando hexametileno diisocianato (HMDI). As ligações cruzadas fornecem estabilidade e tornam as moléculas de colágeno resistentes à atividade da enzima colagenase in vivo, conforme ilustrado na Figura 1. O HMDI reage com água no meio salino para produzir o derivado não tóxico solúvel em água hexametilendiamina (HMDA). O implante cirúrgico resultante de Permacol™ com ligação cruzada ao HMDI é seguro e biocompatível.

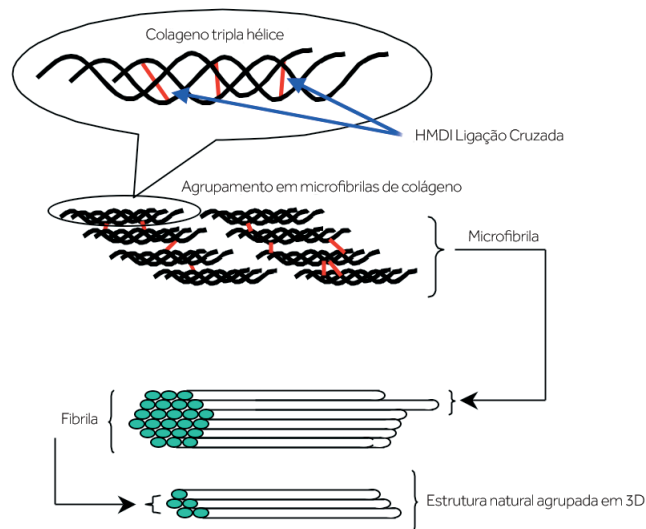


Figura 1: Ligação cruzada de tripla hélice de colágeno e fibrilas

O HMDI reage com a lisina ou resíduos de hidroxilisina dentro das moléculas de colágeno, conforme ilustrado na Figura 2. O HMDI reagido fica incorporado ao colágeno como parte da ligação cruzada. Qualquer resíduo de HMDI não reagido é removido por enxágues de solução salina após a ligação cruzada. Investigações histopatológicas foram conduzidas para determinar se o HMDI em ligação cruzada modifica a estrutura do colágeno.

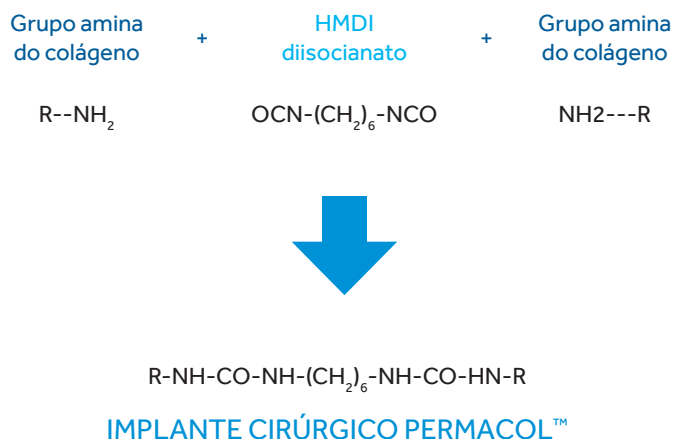


Figura 2: Reação química da ligação cruzada de colágeno com HMDI.⁶

Amostras retiradas antes e depois da etapa de ligação cruzada durante o processo de fabricação do implante cirúrgico Permacol™ foram fixadas em 10% de solução formol-salina, fixadas em bloco de cera e coradas com hematoxilina, e eosina e picosirius vermelho/elastina. As imagens microscópicas do colágeno são apresentadas nas Figuras 3-6.

Essas seções coradas com picosirius vermelho mostram que nas amostras com ligação cruzada e sem ligação cruzada, a estrutura morfológica e a presença de colágeno são idênticas. Não houve áreas de alteração da estrutura do colágeno e não houve áreas de desnaturação do colágeno existente nas amostras de ligação cruzada e sem ligação cruzada. Esses resultados mostram que, no nível morfométrico, não existem diferenças em termos de estrutura entre o implante cirúrgico Permacol™ com ligação cruzada e sem ligação cruzada.

Sabe-se que uma vez que o colágeno dérmico recebeu ligação cruzada, a estrutura do colágeno fica resistente às quebras enzimáticas in vivo,⁷ mantendo sua estrutura e oferecendo resistência mecânica ao local dos implantes muito depois da inserção do implante.

No caso do implante cirúrgico Permacol™, o desempenho in vivo do complexo colágeno HMDI foi demonstrado e verificado pela avaliação do implante cirúrgico Permacol™ em ratos. Em todos os casos, demonstrou-se que a força de tensão é equivalente ao tecido hospedeiro em seis meses e não houve evidência de toxicidade clínica ou microscópica. Ademais, estudos sobre a implantação demonstraram neovascularização e infiltração por fibroblastos com o implante cirúrgico Permacol™ antes de duas semanas após a implantação. Os dados coletados usando o rato como modelo foram fundamentados por experiência clínica com o implante cirúrgico Permacol™.^{8,9}

Figura 3-6: Histologia do implante cirúrgico Permacol™ antes e depois da ligação cruzada

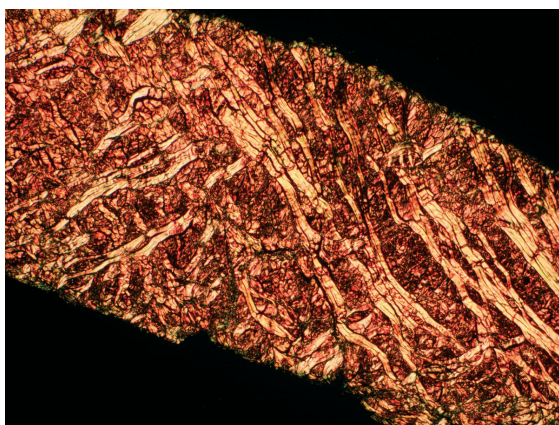


Figura 3: Sem ligação cruzada, ampliação de 100x

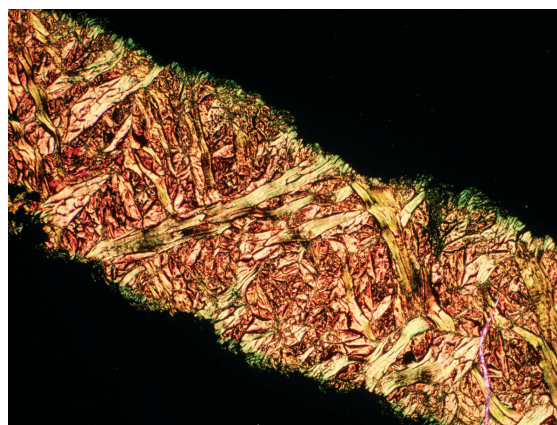


Figura 4: Com ligação cruzada, ampliação de 100x

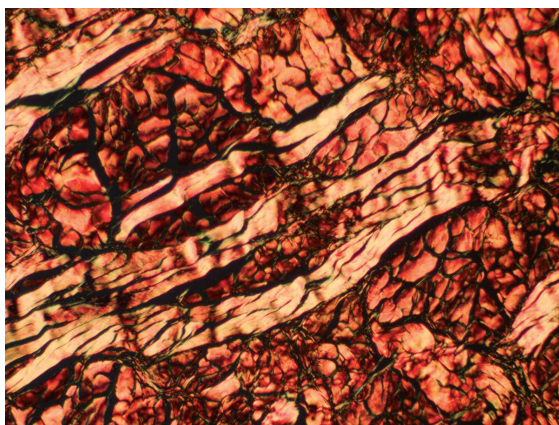


Figura 5: Sem ligação cruzada, ampliação de 100x

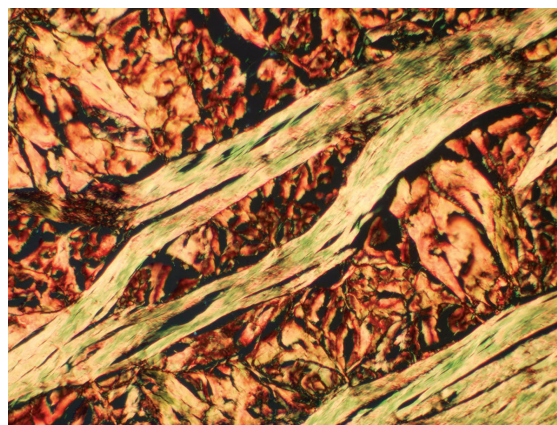


Figura 6: Com ligação cruzada, ampliação de 100x

REMODELAÇÃO DE COLÁGENO IN VIVO

A collagenase é uma metaloprotease da matriz (MMP) que atua como parte do reparo, remodelando o metabolismo do colágeno in vivo.¹⁰ A collagenase liga-se às moléculas individuais de tripla hélice, aproximadamente três quartos de distância do final aminoterminal, de forma dependente de conformação. Então, a collagenase digere especificamente a molécula de colágeno por meio de uma sequência específica única.¹¹ A digestão do colágeno, por fim, resulta no desenrolamento da estrutura de tripla hélice e as fibras de colágeno parcialmente digeridas e desenroladas estão suscetíveis à digestão adicional por outras enzimas proteolíticas.¹² Esse processo está ilustrado na Figura 7.

A presença de ligação cruzada com HMDI no colágeno do implante cirúrgico Permacol™ interfere com a capacidade da enzima collagenase acessar o sítio de ligação específico do colágeno e o sítio de quebra necessário para a digestão do colágeno (dito interferência estérica). Portanto, o colágeno do implante cirúrgico Permacol™ em ligação cruzada com HMDI possui maior resistência à digestão pela collagenase.

Digestão do colágeno pela collagenase

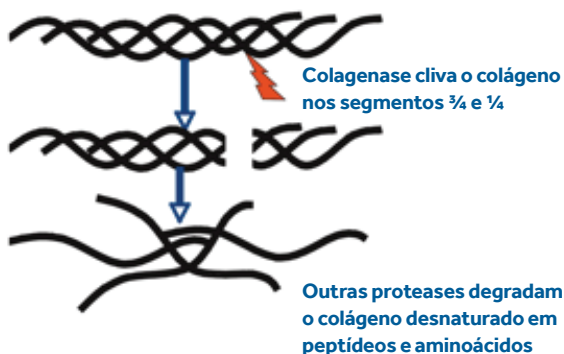


Figura 7: Digestão enzimática do colágeno¹³

EFEITO DE LIGAÇÃO CRUZADA EM BIOMATERIAIS IN VIVO

A ligação cruzada química foi utilizada como um método de estabilizar biomateriais para implantação por muitos anos. O uso de glutaraldeído ou glutaraldeído com formaldeído é bem documentado na literatura. No entanto, esse tratamento está geralmente associado com aumento da calcificação/mineralização, citotoxicidade e alterações às propriedades mecânicas ou rigidez tecidual,^{14,16} tornando-o uma opção menos atraente para a ligação cruzada. O uso e benefícios do HMDI como um agente de ligação cruzada foram discutidos nesse artigo e em outros documentos.¹⁷

Um estudo foi realizado para determinar o efeito da quantidade de ligação cruzada do pericárdio bovino no padrão de regeneração tecidual.¹⁸ Foi realizada ligação cruzada do tecido do pericárdio com genipina em três concentrações conhecidas e foi comparada com o tecido fresco em um modelo de implantação subcutâneo no rato. Após um mês de implantação, os tecidos foram explantados e comparados. Os tecidos fresco e com ligação cruzada em 30% estavam com tamanho significativamente reduzido no momento (Figura 8) e, além disso, estavam totalmente degradados em três meses após a implantação, enquanto os tecidos com ligação cruzada em 60% e 95% ainda estavam presentes um ano após a implantação.¹⁸



Figura 8: Digestão enzimática do colágeno¹³

O artigo também avaliou a infiltração celular e demonstrou que a profundidade de infiltração reduziu com o aumento dos níveis de ligação cruzada. A regeneração tecidual foi observada com os tecidos em ligação cruzada de 60% e 95%, embora isso seja restrito a apenas à parte externa do tecido em ligação cruzada de 95%, enquanto a regeneração foi observada em todo o tecido em 60%. Os tecidos frescos e com ligação cruzada em 30% não foram remodelados, uma vez que foram totalmente degradados antes que os fibroblastos infiltrados fossem capazes de formar matriz extracelular e depositar novo colágeno.¹⁸ Portanto, a quantidade de ligação cruzada influencia diretamente na taxa de degradação e o padrão de regeneração do tecido de um implante cirúrgico (conforme ilustrado na Figura 9).

A LIGAÇÃO CRUZADA É VANTAJOSA PARA UM IMPLANTE CIRÚRGICO?

Os implantes cirúrgicos que não tiveram ligação cruzada demonstraram ser reabsorvidos rapidamente (3 a 12 meses)¹⁸ e não tiveram proteção ao ataque enzimático. Além disso, como a ligação cruzada funciona como uma tampa aos epítomos imunogênicos nas moléculas de colágeno, os produtos sem ligação cruzada podem apresentar potencial imunogênico aumentado em relação aos homólogos com ligação cruzada.¹⁸

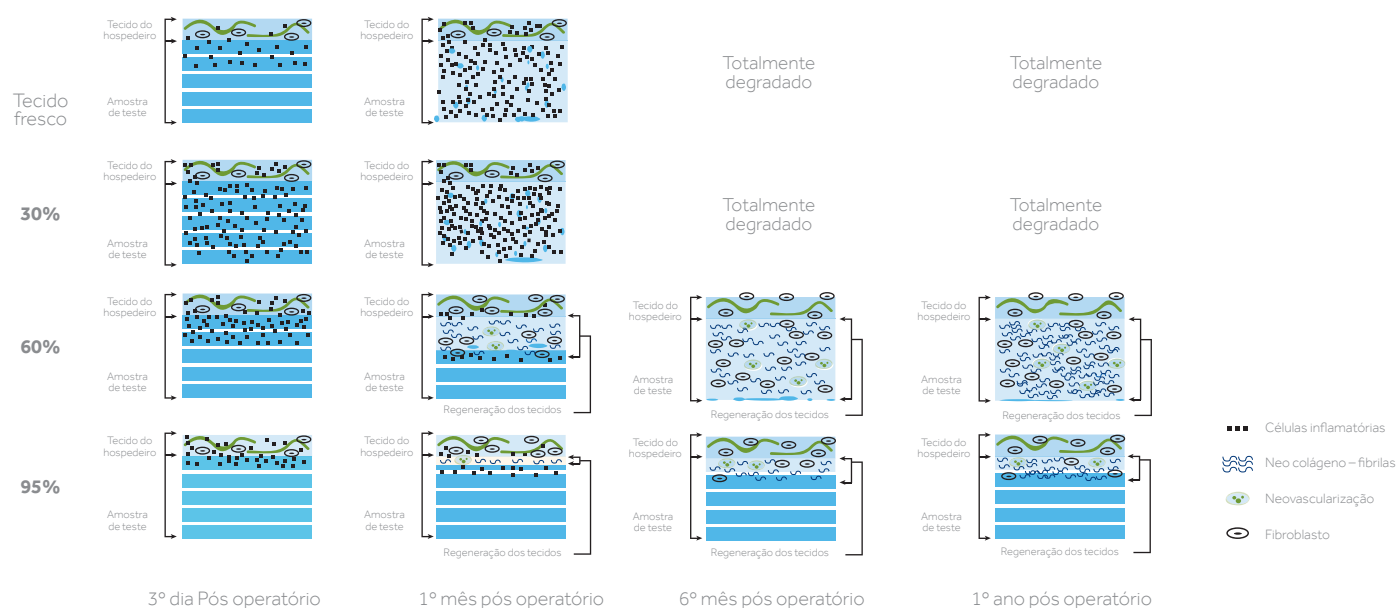


Figura 9: Relação do nível de ligação cruzada com a degradação e regeneração tecidual de um implante cirúrgico^{18*}

É vantajoso o material de implante fornecer resistência e estrutura à região de reparo durante a infiltração de células hospedeiras, permitindo, desse modo, crescimento gradual do tecido. O processo de remodelação em um implante cirúrgico com ligação cruzada, enquanto gradual, é ordenado e organizado, resultando em uma deposição de colágeno no hospedeiro de forma organizada. O uso de agente de ligação cruzada permite o controle sobre o reparo da ferida/processo de remodelação, sendo que a taxa desse processo pode ser modificada pela alteração do nível de ligação cruzada. Sem a ligação cruzada, não existe controle do processo e, portanto, o implante pode falhar em sua função se o remodelamento ocorrer muito rápido ou de forma desorganizada.¹⁸

Embora o encapsulamento seja geralmente citado como um problema com os implantes cirúrgicos, parece que é um termo imprecisamente usado, o qual na verdade refere-se à formação de uma camada de fibroblastos sobre a superfície do implante cirúrgico Permacol™. Essa é uma etapa precursora da infiltração celular e neovascularização no implante, conforme observado em estudos com animais e também mencionada em diversas publicações.^{20,22} Essa camada organizada de fibroblastos que migra ativamente à membrana

do implante cirúrgico Permacol™, é claramente diferente da cápsula de tecido fibroso, a qual pode formar-se ao redor de muitas membranas sintéticas, demonstrando uma resposta inflamatória acentuada ao corpo estranho do material.^{23,24}

Portanto, pode-se concluir que a ligação cruzada (Cross Link) confere vantagens funcionais significativas aos materiais de implante cirúrgico.

CONCLUSÕES

As ligações cruzadas naturais existem no colágeno nativo e têm a função de estabilizar a estrutura da proteína colágena, fornecendo resistência mecânica.

A ligação cruzada química confere resistência à colagenase e aos implantes cirúrgicos derivados cirurgicamente, fornecendo um implante cirúrgico durável e estável.

A ligação cruzada fornece controle e ordem ao reparo da lesão/processo de remodelamento. Sem isso, o implante pode falhar em sua função se o remodelamento ocorrer muito rápido ou de forma desorganizada. Assim, a ligação cruzada oferece diversas vantagens para um material cirúrgico utilizado como implante cirúrgico.

REFERÊNCIAS

1. Alberts B, et al, (1983) Molecular Biology of the Cell p700.
2. Bailey AJ, (1968) The nature of collagen, in Comprehensive Biochemistry 26 p297-423.
3. Hamlin C et al, (1975) Apparent accelerated aging of human collagen in diabetes mellitus, Diabetes 24 p902.
4. Harris E and Farrell M, (1972) Resistance to collagenase: a characteristic of collagen fibrils crosslinked by formaldehyde, Biochim Biophys Acta 278 p133.
5. Sims TJ et al, Quantitative Determination of Collagen Crosslinks Methods in Molecular Biology 139 p11 – 26.
6. Golding B, (1959) In Polymers and Resins. Published by D. Van Nostrand Company Inc p328.
7. Oliver RF et al, (1976) Histological studies of subcutaneous and intraperitoneal implants of trypsin prepared dermal collagen allografts in the rat. Clinical Orthopaedics and Related Research p291-302.
8. Harper C, (1998) Human clinical testing case report review, as per 510(k) No. K992556, data on file.
9. Harper C, (2000) The clinical application of Permacol™ in 140 case studies.
10. Dresden M, (1971) Evidence for the Role of Collagenase in Collagen Metabolism, Nature New Biol 231, p55.
11. Bailey AJ and Light ND, (1989) Connective tissue in meat and meat products p67.
12. Geigy Scientific Tables, Excerpts from the Eighth Edition.
13. Sellers A and Murphy G, (1981) Collagenolytic enzymes and their naturally occurring inhibitors, International Review of Connective Tissue Research 9 p151-189.
14. Speer DP et al, (1980) Surgical effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials, J of Biomed Mats Res 14 p753-764.
15. Schoen FJ et al, (1988) Biomaterial-associated calcification: Pathology, mechanisms, and strategies for prevention, Biomed. Mater Res.: Applied Biomaterials 22 p11-36.
16. Woodruff EA (1977) Use of glutaraldehyde and formaldehyde to process tissue heart valves, J Bioeng 2 (1-2) p1-9.
17. Naimark WA et al, (1995) HMDC crosslinking of bovine pericardial tissue: potential role of the solvent environment in the design of prosthetic materials, J of Mat Sci: Materials in Medicine 6 p235-241.
18. Liang HC et al, (2004) Effects of crosslinking degree of an acellular surgical tissue on its tissue regeneration pattern, Biomaterials 25 p3541-3552.
19. Proffitt J, (2010) Effect of crosslinking on the performance of a collagen-derived biomaterial as an implant for soft tissue repair: a rodent model.
20. Gandhi S, (2005) Histopathologic changes of porcine dermis xenografts for transvaginal suburethral slings. Am J Obstet Gynecol. 2005;192:1643-1648.
21. Macleod TM, Williams G, Sanders R, Green CJ. (2005) Histological evaluation of Permacol™ as a subcutaneous implant over a 20-week period in the rat model. Brit J Plastic Surg 2005; 58: 518-532.
22. Zheng et al, Host response after reconstruction of abdominal wall defects with porcine dermal collagen in a rat model. Am Jou of Obs and Gyn. 2004;191: 1961-70.
23. Klinge et al, (1999) Influence of polyglactin-coating on functional and morphological parameters of polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair, Biomaterials 20 p613-623.
24. Rosengren A and Bjursten LM et al, (2003) Pore size in implanted polypropylene filters is critical for tissue organization p918-926.

Reg. 10349000286 - © 2016 Medtronic. Todos os direitos reservados. A Medtronic, o logotipo da Medtronic e Further, Together são marcas registradas da Medtronic.™

* Marcas de terceiros são marcas registradas de seus respectivos proprietários. Todas as outras marcas são marcas registradas de uma empresa da Medtronic. M. Luz 09/2016.