

Estudo *in vivo* do comportamento de bioprótese liofilizada: seguimento de 3 meses em carneiros jovens

In vivo study of lyophilized bioprostheses: 3 month follow-up in young sheep

Fábio Papa Taniguchi¹, Marina Junko Shiotsu Maizato², Rafael Fávero Ambar³, Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo⁴, Adolfo Alberto Leiner⁵, Luiz Felipe Pinho Moreira⁵, Idágene Aparecida Cestari⁶, Noedir Antônio Groppo Stolf⁷

DOI: 10.5935/1678-9741.20120101

RBCCV 44205-1426

Resumo

Objetivo: Para melhorar as propriedades mecânicas e imunogênicas, o glutaraldeído é utilizado no tratamento do pericárdio bovino que é utilizado em biopróteses. A liofilização do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído diminui os radicais aldeído, com provável redução do potencial para calcificação. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da liofilização em biopróteses valvares de pericárdio bovino como mecanismo protetor na diminuição da disfunção estrutural valvar.

Métodos: Foi realizado o implante de biopróteses de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, liofilizadas ou não, em carneiros de 6 meses de idade, sendo os animais eutanasiados com 3 meses de seguimento. As biopróteses foram implantadas em posição pulmonar, com auxílio de circulação extracorpórea. Um grupo controle e outro grupo liofilizado foram avaliados quanto ao gradiente ventrículo direito/artéria pulmonar (VD/AP) no implante e explante;

análise quantitativa de cálcio; inflamação; trombose e pannus. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

Resultados: O gradiente médio VD/AP, no grupo controle, no implante, foi $2,04 \pm 1,56$ mmHg e, no grupo de liofilização, foi $6,61 \pm 4,03$ mmHg. No explante, esse gradiente aumentou para $7,71 \pm 3,92$ mmHg e $8,24 \pm 6,2$ mmHg, respectivamente, nos grupos controle e liofilização. O teor de cálcio médio, após 3 meses, nas biopróteses do grupo controle foi $21,6 \pm 39,12$ $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco, em comparação com um teor médio de $41,19 \pm 46,85$ $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco no grupo liofilizado ($P = 0,662$).

Conclusão: A liofilização de próteses valvares com pericárdio bovino tratado com glutaraldeído não demonstrou diminuição da calcificação neste experimento.

Descritores: Experimentação animal. Bioprótese. Procedimentos cirúrgicos cardíacos. Liofilização.

1. Hospital do Servidor Público Estadual – IAMSPE; Pós-Doutor em Cirurgia Torácica e Cardiovascular – USP, São Paulo, SP, Brasil.
2. Instituto do Coração – HCFMUSP; Doutor em Engenharia – Unicamp, São Paulo, SP, Brasil.
3. Hospital do Servidor Público Estadual – IAMSPE; Médico Residente de Cirurgia Geral, São Paulo, SP, Brasil.
4. Faculdade de Química - Universidade de São Paulo; Professor Titular, São Paulo, SP, Brasil.
5. Instituto do Coração – HCFMUSP; Professor Livre Docente, São Paulo, SP, Brasil.
6. Instituto do Coração – HCFMUSP; Doutor em Ciências Biológicas pela UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil.
7. Instituto do Coração – HCFMUSP; Professor Emérito de Cirurgia Cardiovascular, São Paulo, SP, Brasil.

Trabalho realizado no Instituto do Coração – HCFMUSP, São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência

Fábio P. Taniguchi

Rua Itapeva, 202 – conj 91 – São Paulo, SP, Brasil – CEP: 01332-001

E-mail: taniguchi@sbccv.org.br

Apoio: FAPESP (processo nº 04/0566-8)

Artigo recebido em 8 de maio de 2012

Artigo aprovado em 27 de agosto de 2012

Abreviaturas, acrônimos & símbolos	
BPBL	Bioprótese de pericárdio bovino liofilizado
CEC	Circulação extracorpórea
CIA	Comunicação interatrial
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCA	Tempo de coagulação ativado
VD	Ventrículo direito
VD/AP	Ventrículo direito / artéria pulmonar

Abstract

Objective: Glutaraldehyde is currently used in bovine pericardium bioprosthesis to improve mechanical and immunogenic properties. Lyophilization is a process that may decrease aldehyde residues in the glutaraldehyde treated pericardium decreasing cytotoxicity and enhancing resistance to calcification. The aim of this study is to evaluate bioprosthetic heart valves calcification in adolescent sheep and to study the potential of lyophilization as a mechanism to protect calcification.

Methods: Two groups were evaluated: a control group in which a bovine pericardium prosthetic valve was implanted in pulmonary position and a lyophilized group in which

the bovine pericardium prosthetic valve was lyophilized and further implanted. Sixteen sheeps 6 months old were submitted to the operation procedure. After 3 months the sheeps were euthanized under full anesthesia.

Results: Six animals of the control group reached 95.16 ± 3.55 days and six animals in the lyophilized group reached 91.66 ± 0.81 days of postoperative evolution. Two animals had endocarditis. Right ventricle/pulmonary artery (RV/PA) mean gradient, in the control group, at the implantation was 2.04 ± 1.56 mmHg, in the lyophilization group, the RV/PA mean gradient, at the implantation was 6.61 ± 4.03 mmHg. At the explantation it increased to 7.71 ± 3.92 mmHg and 8.24 ± 6.25 mmHg, respectively, in control and lyophilization group. The average calcium content, after 3 months, in the control group was 21.6 ± 39.12 $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ dry weight, compared with an average content of 41.19 ± 46.85 $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ dry weight in the lyophilization group ($P=0.662$).

Conclusion: Freeze drying of the bovine pericardium prosthesis in the pulmonary position could not demonstrate calcification mitigation over a 3 month period although decreased inflammatory infiltration over the tissue.

Descriptors: Animal experimentation. Bioprosthesis. Cardiac surgical procedures. Freeze drying.

INTRODUÇÃO

As biopróteses são utilizadas em cirurgia cardiovascular por serem alternativas viáveis no tratamento das valvas cardíacas quando apresentam disfunção morfológica e funcional significativas. As biopróteses devem apresentar longa durabilidade no desempenho da função, porém a disfunção estrutural valvar pode ocorrer precocemente pela calcificação dos tecidos biológicos [1-3].

A necessidade de reoperação por disfunção estrutural valvar tem sido inferior a 5%, em 5 anos; inferior a 10%, em 10 anos, e superior a 70%, em 15 anos. Quando ocorre essa disfunção estrutural valvar é necessária a substituição da bioprótese, com aumento da morbimortalidade cirúrgica [1,4,5].

A liofilização é um processo de secagem de um produto previamente congelado onde o solvente é removido por sublimação. Por meio desse processo podem ser obtidos produtos desidratados de alta qualidade, preservando-se as estruturas e minimizando a perda de produtos voláteis que não são observados durante a secagem por meios convencionais.

Tecidos biológicos liofilizados para implante em animais e humanos já foram utilizados. Na década de 1960, heteroenxertos de válvula aórtica liofilizados foram utilizados, porém os resultados foram desfavoráveis [6,7].

Trabalhos anteriores de nosso grupo com o protocolo de annealing demonstraram que o processo de liofilização não altera significativamente as características mecânicas do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído [8], mas diminui significativamente a quantidade de aldeídos residuais que pela citotoxicidade relacionam-se aos processos inflamatórios e calcificação do tecido [9].

Foi delineado um protocolo no qual biopróteses de pericárdio bovino tratadas com glutaraldeído foram liofilizadas e implantadas em modelo animal crônico. O implante foi realizado em carneiros jovens, pois é conhecido que esse modelo possibilita o estudo dos processos biológicos inerentes à calcificação e consequente disfunção estrutural valvar em meses após o implante [10].

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da liofilização com annealing em biopróteses de pericárdio bovino tratadas com glutaraldeído em modelo animal crônico.

MÉTODOS

Todos os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com o "Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório", publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH publicação 85-23, revisado em 1996). A Comissão de Ética do Instituto do Coração da

Universidade de São Paulo aprovou o estudo (protocolo nº 994/05).

Definição dos grupos

Dois grupos foram constituídos. Um grupo denominado controle, no qual uma bioprótese de pericárdio bovino (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, SP) foi implantada, e um grupo denominado bioprótese de pericárdio bovino liofilizado (BPBL), no qual uma bioprótese de pericárdio bovino (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, SP) foi liofilizada e, posteriormente, implantada.

Bioprótese de pericárdio bovino liofilizado (BPBL)

Inicialmente, a bioprótese de pericárdio bovino foi lavada em solução salina para remover todo o excesso de aldeído. A bioprótese foi liofilizada em um FTS Systems, modelo TDS-00209-A (Dura-Stop, Dura-Dry-MP, STF Systems, Stone Ridge, NY, EUA). O processo de congelamento foi iniciado colocando-se a bioprótese em um ultrafreezer por 2 horas a -50°C . Na sequência, foi aquecida a -20°C durante 1 hora.

Finalmente, as biopróteses foram resfriadas a -50°C e liofilizadas. O secamento primário foi realizado a -5°C com pressão atmosférica de 160 mTorr. Para o secamento secundário, a temperatura foi aumentada para 25°C na mesma pressão atmosférica.

Implante cirúrgico

Foram utilizados carneiros da raça Santa Inês neste estudo. Dezesesseis carneiros com 6 meses de idade e peso médio de $36,53 \pm 3,42$ kg (28,5 kg a 42 kg) foram submetidos ao procedimento de operação com sucesso.

Anestesia

Os animais permaneceram por 36 horas em jejum. A anestesia foi induzida com ketamina (8 mg/kg) e midazolam (0,5 mg/kg). Isoflurano e fentanil (5 mg/kg) foram utilizados na manutenção da anestesia. Na indução, cefuroxima (750 mg) foi administrada por via intravenosa como antibiótico profilático.

Circulação extracorpórea (CEC)

O circuito da CEC foi preenchido com 400 mL de ringer lactato, 50 mL de manitol 20%, 10 mL de gluconato de cálcio 10%, 10 mL de sulfato de magnésio 10%, 500 mg de hidrocortisona, 750 mg de cefuroxima e 5000 UI de heparina.

Normotermia a 36°C foi empregada durante a circulação com fluxo não-pulsátil arterial de 2,4 L/min/m² com uma bomba centrífuga (FlowPump 6000S, IBC, Austin, Texas, EUA) para manter a pressão de perfusão entre 60 a 80 mmHg. Um conjunto de tubos, reservatório infantil de

sangue venoso e filtro arterial (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, SP) foram utilizados.

Procedimento cirúrgico

Foi realizada toracotomia ântero-lateral esquerda, no quarto espaço intercostal, para exposição do coração após a pericardiotomia. Heparina sódica foi administrada (4 mg/kg) para alcançar um tempo de coagulação ativado (TCA) superior a 480s. Para a realização do desvio circulatório do átrio direito para tronco da artéria pulmonar, uma cânula arterial 20F foi posicionada na artéria pulmonar, 1 cm abaixo do ramo esquerdo, e uma cânula venosa 34F foi posicionada no átrio direito. Não foi realizada parada cardíaca e foi mantida a ventilação pulmonar.

A artéria pulmonar foi pinçada, procedendo-se à arteriotomia longitudinal no tronco pulmonar com secção do anel valvar e via de saída do ventrículo direito. As cúspides pulmonares foram retiradas. A bioprótese foi implantada no anel valvar com sutura contínua de polipropileno 5-0. Um patch de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído não-liofilizado foi utilizado para ampliar a via saída do ventrículo direito e artéria pulmonar. Todos os animais receberam implante de prótese de válvula de pericárdio bovino nº23 (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, SP). Previamente ao implante, as biopróteses do grupo controle e BPBL foram lavadas com solução salina por 30 minutos. A CEC foi interrompida e todo o volume foi infundido para atingir pressão arterial média de 80 mmHg. Sulfato de protamina não foi administrado em qualquer animal.

Gradiente de pressão

Na avaliação do gradiente transvalvar punccionou-se o tronco pulmonar e via de saída do ventrículo direito (VD) com uma agulha de 0,9 mm conectada a um analisador multiparamétrico (5900 CAGE Signal Conditioner, Gould Inc., Valley View, Ohio, EUA). Foram analisados 10 ciclos com um sistema de software (WINDAQ v.2.19, DATAQ Instruments, Inc., Akron, OH, EUA), que utilizou a média das pressões sistólicas em 10 ciclos para análise. O mesmo procedimento foi realizado no momento da eutanásia.

Exérese da prótese

Após três meses, os animais foram eutanasiados sob anestesia geral. O coração foi dissecado e através do átrio direito todo o sangue foi drenado. A excisão da prótese foi realizada com um segmento da artéria pulmonar, parede anterior do ventrículo direito e o patch de pericárdio bovino não liofilizado.

Cada cúspide protética foi nomeada de acordo com a relação anatômica com a aorta, o átrio esquerdo e o patch não liofilizado. Posteriormente, as cúspides da prótese foram removidas, divididas em duas partes

simétricas para a realização de exames histológicos com coloração por hematoxilina e eosina, coloração de von Kossa e determinação da quantidade de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica. O patch de pericárdio bovino não-liofilizado também foi analisado pelos métodos descritos.

Avaliação macroscópica

Cada bioprótese foi cuidadosamente examinada post mortem para a avaliação morfológica após o implante. Foram avaliados mobilidade das cúspides, lacerações, pannus, calcificação, vegetações e formação de trombos.

Avaliação microscópica

Foram realizados exames anatomopatológicos com hematoxilina-eosina e coloração de von Kossa para análise específica de cálcio. Nos segmentos examinados, foram avaliadas inflamação, presença de trombo e pannus e intensidade da calcificação. Foi utilizada como critério a intensidade, sendo classificada em ausente; (+) detecção rara; (++) dispersa, porém consistente; (+++) presente com uniformidade; e (+++++) distribuição generalizada.

Quantificação do cálcio

A determinação da quantidade de cálcio foi realizada após hidrólise ácida em um espectrofotômetro de absorção atômica por chama (Analytik Jena, AAS Vario 6, Jena, Alemanha).

Análise estatística

Dados de espectroscopia de absorção atômica foram expressos como média \pm desvio padrão. Os grupos foram comparados utilizando-se o Teste de Mann-Whitney. Escores para cálcio, trombo, pannus e inflamação foram avaliados por meio de uma escala contínua. O nível de significância estabelecido foi de 5%. Foi utilizado o programa Statistical Package for the Social Sciences v.11.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA).

RESULTADOS

Dentre os 16 animais submetidos à cirurgia, 12 apresentaram a sobrevida prevista de 90 dias. Seis animais do grupo controle atingiram $95,1 \pm 3,5$ dias (91 a 99 dias) de evolução pós-operatória. Dois animais morreram nos dias 37 e 48, ambos por pneumonia. Um animal que sobreviveu por 91 dias não foi considerado na análise para quantificação de cálcio, pois foi evidenciada presença de endocardite.

No grupo BPBL, seis animais atingiram $91,6 \pm 0,8$ dias (91 a 93 dias), dois animais deste grupo morreram com 51 e 68 dias, em decorrência de pneumonia e endocardite.

Clinicamente, todos os animais que completaram o estudo apresentaram atividade física na normalidade a

partir do primeiro dia de pós-operatório. Os animais não apresentaram quaisquer sintomas de insuficiência cardíaca ou problemas de saúde geral no decorrer do estudo.

Gradiente ventrículo direito / artéria pulmonar (VD/AP)

No grupo controle, o gradiente médio VD / AP no implante foi de $2,04 \pm 1,56$ mmHg, variando de 0 a 4,38 mmHg. No explante, houve aumento para $7,71 \pm 3,92$ mmHg, variando de 3,25 a 11,95 mmHg.

No grupo BPBL, o gradiente médio VD/AP no implante foi de $6,61 \pm 4,03$ mmHg, variando de 4,55 a 11,84 mmHg. No explante, houve aumento para $8,24 \pm 6,25$ mmHg, variando de 3,78 a 17,48 mmHg.

A Figura 1 apresenta a evolução do gradiente para cada animal do grupo controle e BPBL. Neste gráfico, não são apresentados os animais excluídos.

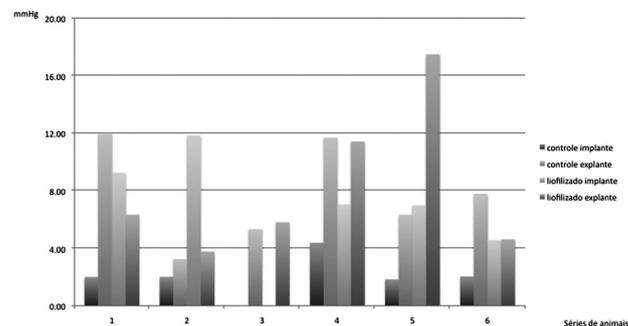


Fig. 1 – Análise do gradiente transvalvar VD/AP

Observações post mortem

Na eutanásia, todos os animais apresentavam aderências firmes entre a pleura, o pericárdio e o coração. O patch de pericárdio bovino encontrava-se flexível, com pontos de calcificação dispersos.

Avaliação macroscópica

Não foi observada presença de trombos ou lacerações em qualquer bioprótese implantada. As cúspides dos dois grupos apresentavam mobilidade parcial prejudicada, com focos de calcificação não-homogêneos. Todas as próteses no grupo controle e liofilizado desenvolveram pannus.

Avaliação microscópica

Houve desenvolvimento significativo de pannus nas biopróteses em ambos os grupos. Foi observada, descritivamente, maior intensidade de inflamação nas biopróteses do grupo controle em relação às do grupo BPBL (Figura 2), que apresentaram menor infiltrado inflamatório (Tabela 1).

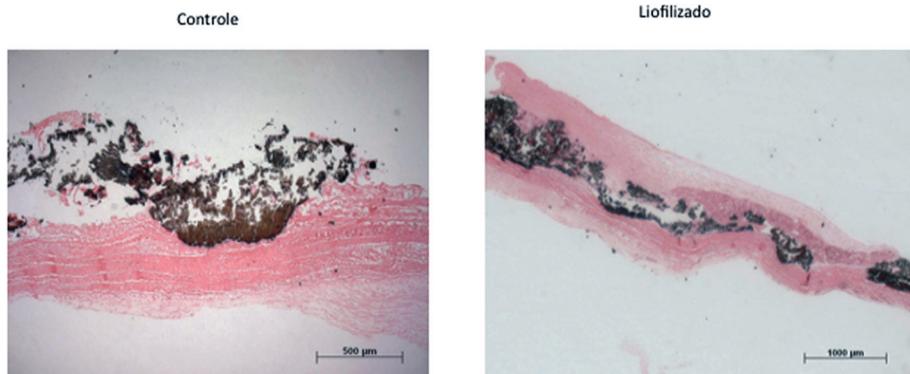


Fig. 2 – Calcificação nas próteses valvares evidenciada pelo método de von Kossa

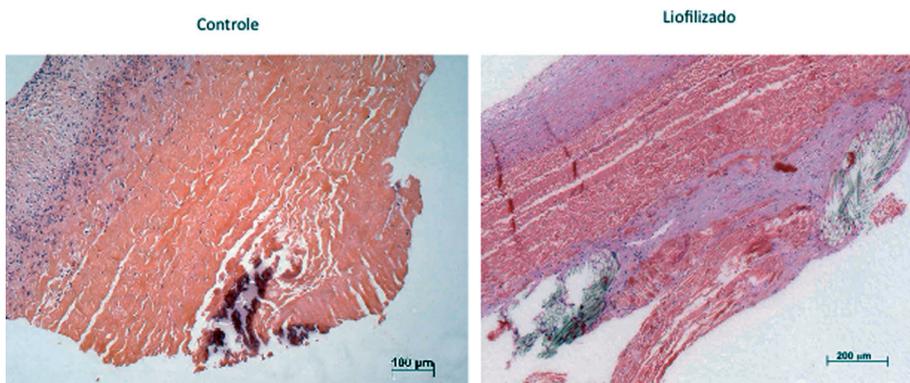


Fig. 3 – Infiltrado inflamatório nas biopróteses

Tabela 1. Alterações histológicas observadas após o implante das biopróteses.

Bioprótese implantada	Formação de panus	Inflamação na prótese	Inflamação no RP
Controle 1	++++	+++	++++
Controle 2	++++	+++	++++
Controle 3	++++	+++	++++
Controle 4	++++	+	++++
Controle 5	+++++	+	++++
Controle 6	++++	-	-
Liofilizada 1	+++++	-	+
Liofilizada 2	++	-	+
Liofilizada 3	+++	+	+
Liofilizada 4	++++	-	+
Liofilizada 5	++++	-	++
Liofilizada 6	+++	+	+++

(-)=ausente; (+) = raro; (++) = disperso; (+++) =uniforme; (+++++) = generalizado

A presença de calcificações foi evidenciada nas próteses do grupo controle e grupo de BPBL (Figura 3).

Análise quantitativa de cálcio

A quantidade média de cálcio nas cúspides no grupo controle foi $21,60 \pm 39,12 \mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco, em comparação com uma quantidade média de $41,19 \pm 46,85 \mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco no grupo BPBL ($P = 0,818$). O animal excluído do grupo controle em decorrência de endocardite tinha uma quantidade média de cálcio nas cúspides de $11,63 \pm 6,45 \mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco e $0,63 \pm 0,01 \mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco no patch de pericárdio.

No grupo controle, a média de quantidade de cálcio no patch foi de $1,52 \pm 0,98 \mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco e, no grupo BPBL, $1,14 \pm 0,51 \mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco. Não houve diferença estatística entre os grupos ($P = 0,662$).

A Tabela 2 apresenta a quantidade média de cálcio ($\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco) nas cúspides e no patch de pericárdio, grupos controle e BPBL.

Tabela 2. Determinação de cálcio pela espectrofotometria de absorção atômica.

	Determinação de cálcio ($\mu\text{gCa}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco)	
	Cúspides	Patch de pericárdio
Grupo controle		
1	91,43 \pm 55,77	0,67 \pm 0,04
2	1,72 \pm 0,79	1,66 \pm 0,01
3	0,92 \pm 0,35	2,83 \pm 0,02
4	5,37 \pm 8,34	2,00 \pm 0,20
5	8,87 \pm 7,32	0,44 \pm 0,01
Grupo BPBL		
1	1,93 \pm 0,71	0,75 \pm 0,03
2	114,60 \pm 38,63	1,34 \pm 0,09
3	65,60 \pm 69,64	0,70 \pm 0,03
4	60,9 \pm 75,46	1,92 \pm 0,03
5	1,23 \pm 0,28	0,67 \pm 0,01
6	2,89 \pm 0,75	1,47 \pm 0,03

DISCUSSÃO

As biopróteses são alternativas viáveis no tratamento das valvas cardíacas em pacientes com disfunção valvar morfológica e funcional significativa [1,2]. Mesmo com os avanços tecnológicos na técnica de processamento e manuseio dos tecidos biológicos, os estudos clínicos continuam demonstrando que os pacientes ainda sofrem com a deterioração estrutural da bioprótese [11-14].

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que a liofilização do pericárdio bovino tratado com o glutaraldeído promove a redução de resíduos de aldeídos, provenientes do tratamento tecidual com glutaraldeído [9]. Como é conhecido, o glutaraldeído é utilizado no pericárdio bovino como uma das alternativas de tratamento de tecidos biológicos, a fim de melhorar as propriedades mecânicas e imunogênicas, pois estabiliza a estrutura do colágeno, aumenta a resistência à degradação enzimática, reduz a trombogenicidade e diminui a antigenicidade [15,16]. A desvantagem desse processo é que, durante o processo de fixação com glutaraldeído, há perda de células endoteliais, de viabilidade celular intersticial e de processos inibidores da calcificação, pois a fragmentação das membranas celulares cursa com a liberação de fosfolipídios que permitem a deposição de fosfatos de cálcio.

Infelizmente, tais processos aumentam a calcificação dos tecidos biológicos [15,16]. Além disso, os grupos aldeídos livres e os fosfolipídios em combinação com íons de cálcio da circulação podem induzir a calcificação [11,17]. Diferentes estratégias para prevenir a calcificação foram relatadas, incluindo utilização de inibidores de

calcificação no tecido fixado, remoção ou modificação dos componentes calcificantes, modificação no processo de fixação e utilização de outros agentes fixantes [18-20]. O desenvolvimento de métodos de extração para os derivados de glutaraldeído demonstraram que o processo de calcificação repousa nos dialdeídos e nos produtos da sua polimerização [20,21]. Nesse sentido, nosso grupo avaliou a possibilidade de uma bioprótese valvar de pericárdio bovino, quimicamente tratada com glutaraldeído, que quando submetida ao processo de liofilização por annealing poderia apresentar menor calcificação no seguimento, uma vez que se considera como fator de calcificação o glutaraldeído residual.

Apesar de existirem trabalhos da década de 1960 referentes à liofilização de homoenxertos com resultados desfavoráveis [6,7], este estudo diferencia-se por utilizar bioprótese de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído e posteriormente liofilizado por técnica que incorpora o processo de *annealing*.

No septo interatrial, após a criação de uma comunicação interatrial (CIA) em cachorros, e implante de um patch de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído liofilizado foi relatada a formação de discreto pannus [22]. Em nosso estudo, a formação de pannus foi relevante nas biopróteses liofilizadas ou não. Embora tenhamos utilizado próteses biológicas e Santibáñez-Salgado et al., *patch* no septo interatrial, consideramos que a formação do pannus em nosso estudo possa estar relacionada à baixa pressão no átrio direito e à artéria pulmonar. Nas biopróteses de pericárdio bovino, a presença de células inflamatórias relaciona-se ao aumento da degeneração estrutural valvar, resultando em lacerações das cúspides [23]. Neste estudo, observou-se que o grupo controle apresentou maior intensidade da resposta inflamatória quando comparado ao grupo BPBL, evidenciando possível mecanismo protetor do processo de liofilização na resposta inflamatória.

Em um experimento com cinco meses de pós-operatório após implante em posição mitral com prótese de pericárdio bovino (Arbor Surgical Technologies Inc, Irvine, CA), houve média de 1,05 $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco (intervalo 0,65 - 2,58 $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco), sendo que na prótese de Carpenier-Edwards Perimount (Edwards Lifesciences, Irvine, CA, EUA) a média era de 3,23 $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco (intervalo de 1,52 - 23,8 $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco) [10]. Em nosso experimento com implante por três meses em posição pulmonar, houve maior quantidade média de cálcio com 21,60 \pm 39,12 $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco (intervalo de 0,92 - 91,43 $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco) no grupo controle. Não foi observado, neste experimento, que a liofilização diminuiu a calcificação, pois a quantidade média de cálcio foi 41,19 \pm 46,85 $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de peso seco na

BPBL (intervalo de 1,93 - 114,60 $\mu\text{g Ca}^{2+}/\text{mg}$ de peso seco).

Também é relevante que o gradiente final, através das biopróteses, durante o período de três meses demonstrou resultados semelhantes entre os grupos ($7,71 \pm 3,92$ versus $8,24 \pm 6,25$ mmHg), apesar da diferença no implante ($2,04 \pm 1,56$ mmHg versus $6,61 \pm 4,03$ mmHg). Entendemos que o significado é pelo fato das BPBL não terem sido totalmente hidratadas durante os 30 minutos de lavagem com solução salina, causando maior rigidez de suas cúspides na fase inicial.

Neste estudo há alguns fatores limitantes. Trata-se de estudo experimental que foi conduzido com uma amostra inicial reduzida de animais. A sobrevida tardia envolveu múltiplas variáveis no tratamento dos animais que ficaram sobre vigilância veterinária rigorosa, porém não padronizada. O seguimento no pós-operatório para avaliação da calcificação da bioprótese, apesar de discutível, poderia contemplar maior tempo para observação. Também, o implante em posição pulmonar avaliou as biopróteses em sistema com menor pressão, o que reduziu os processos de degeneração estrutural valvar. Apesar deste estudo não ter conseguido demonstrar que a liofilização protegeu quanto à calcificação, ela sinalizou uma melhora no aspecto inflamatório, o que a nosso ver é uma vantagem no aspecto de degeneração estrutural das biopróteses.

Aliado a isso, tem a vantagem de fácil manipulação e preservação, pois a bioprótese pode ser armazenada seca e esterilizada por meios convencionais como a radiação gama. Cabe melhorar o aspecto da hidratação das biopróteses, alterando alguns parâmetros da liofilização com annealing, para que a completa hidratação ocorra em menor tempo. O fato de não ter havido diferença estatística quanto à calcificação no grupo controle e liofilizado pode também significar que o fator calcificação nas biopróteses de pericárdio bovino devido ao glutaraldeído residual proveniente do tratamento das membranas de pericárdio não seja a grande causa para a calcificação ou não das biopróteses.

CONCLUSÃO

Finalmente, concluímos que este estudo não conseguiu demonstrar o mecanismo protetor da liofilização como agente anticalcificante do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído. A avaliação histológica evidenciou menor processo inflamatório dos tecidos liofilizados, mas necessita de estudos mais aprofundados.

AGRADECIMENTOS

Este projeto recebeu apoio financeiro da FAPESP (processo n° 04/0566-8).

REFERÊNCIAS

1. Rahimtoola SH. Choice of prosthetic heart valve in adults an update. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(22):2413-26.
2. David TE, Armstrong S, Maganti M. Hancock II bioprosthesis for aortic valve replacement: the gold standard of bioprosthetic valves durability? *Ann Thorac Surg.* 2010;90(3):775-81.
3. Clark JN, Ogle MF, Ashworth P, Bianco RW, Levy RJ. Prevention of calcification of bioprosthetic heart valve cusp and aortic wall with ethanol and aluminum chloride. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(3):897-904.
4. Ruel M, Kulik A, Rubens FD, Bédard P, Masters RG, Pipe AL, et al. Late incidence and determinants of reoperation in patients with prosthetic heart valves. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;25(3):364-70.
5. Poirer NC, Pelletier LC, Pellerin M, Carrier M. 15-year experience with the Carpentier-Edwards pericardial bioprosthesis. *Ann Thorac Surg.* 1998;66(6Suppl):S57-61.
6. Duran CG, Gunning AJ, Whitehead R. Experimental aortic valve heterotransplantation. *Thorax.* 1967;22(6):510-8.
7. Duran CM, Whitehead R, Gunning AJ. Implantation of homologous and heterologous aortic valves in prosthetic vascular tubes. *Thorax.* 1969;24(2):142-7.
8. Borgognoni CF, Maizato MJ, Leirner AA, Polakiewicz B, Beppu MM, Higa OZ, et al. Effect of freeze-drying on the mechanical, physical and morphological properties of glutaraldehyde-treated bovine pericardium: evaluation of freeze-dried treated bovine pericardium properties. *J Appl Biomater Biomech.* 2010;8(3):186-90.
9. Maizato MJ, Higa OZ, Mathor MB, Camillo MA, Spencer PJ, Pitombo RN, et al. Glutaraldehyde-treated bovine pericardium: effects of lyophilization on cytotoxicity and residual aldehydes. *Artif Organs.* 2003;27(8):692-4.
10. Flameng W, Meuris B, Yperman J, De Visscher G, Herijgers P, Verbeken E. Factors influencing calcification of cardiac bioprostheses in adolescent sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;132(1):89-98.
11. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(3):1072-80.
12. McClure RS, Narayanasamy N, Wiegerinck E, Lipsitz S, Maloney A, Byrne JG, et al. Late outcomes for aortic valve replacement with the Carpentier-Edwards pericardial bioprosthesis: up to 17-year follow-up in 1,000 patients. *Ann Thorac Surg.* 2010;89(5):1410-6.
13. Jamieson WR, Lewis CT, Sakwa MP, Cooley DA, Kshetry VR, Jones KW, et al. St Jude Medical Epic porcine bioprosthesis:

-
- results of the regulatory evaluation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;141(6):1449-54.e2.
14. ISTHMUS Investigators. The Italian study on the Mitroflow postoperative results (ISTHMUS): a 20-year, multicentre evaluation of Mitroflow pericardial bioprosthesis. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011;39(1):18-26.
 15. Beauchamp RO Jr, St Clair MB, Fennell TR, Clarke DO, Morgan KT, Kari FW. A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. *Crit Rev Toxicol*. 1992;22(3-4):143-74.
 16. Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Levy RJ. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *Am J Pathol*. 1987;127(1):122-30.
 17. Guldner NW, Jasmund I, Zimmermann H, Heinlein M, Girndt B, Meier V, et al. Detoxification and endothelialization of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium with titanium coating: a new technology for cardiovascular tissue engineering. *Circulation*. 2009;119(12):1653-60.
 18. Clark JN, Ogle MF, Ashworth P, Bianco RW, Levy RJ. Prevention of calcification of bioprosthetic heart valve cusp and aortic wall with ethanol and aluminum chloride. *Ann Thorac Surg*. 2005;79(3):897-904.
 19. Hahn SK, Ohri R, Giachelli CM. Anti-calcification of bovine pericardium for bioprosthetic heart valves after surface modification with hyaluronic acid derivatives. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2005;10:218-24.
 20. Zilla P, Fullard L, Trescony P, Meinhart J, Bezuidenhout D, Gorlitzer M, et al. Glutaraldehyde detoxification of aortic wall tissue: a promising perspective for emerging bioprosthetic valve concepts. *J Heart Valve Dis*. 1997;6(5):510-20.
 21. Weissenstein C, Human P, Bezuidenhout D, Zilla P. Glutaraldehyde detoxification in addition to enhanced amine cross-linking dramatically reduces bioprosthetic tissue calcification in the rat model. *J Heart Valve Dis*. 2000;9(2):230-40.
 22. Santibáñez-Salgado JA, Olmos-Zúñiga JR, Pérez-López M, Aboitiz-Rivera C, Gaxiola-Gaxiola M, Jasso-Victoria R, et al. Lyophilized glutaraldehyde-preserved bovine pericardium for experimental atrial septal defect closure. *Eur Cell Mater*. 2010;19:158-65.
 23. Zilla P, Brink J, Human P, Bezuidenhout D. Prosthetic heart valves: catering for the few. *Biomaterials*. 2008;29(4):385-406.