

## QUANTIFICAÇÃO DO EFEITO DA LIOFILIZAÇÃO NO PERICÁRDIO BOVINO EM MODELO ANIMAL CRÔNICO

Fabio P. Taniguchi<sup>1</sup>, Rafael F. Ambar<sup>2</sup>, Marina J. S. Maizato<sup>2</sup>, Olga Z. Higa<sup>3</sup>, Ronaldo N. M. Pitombo<sup>4</sup>, Idágene A. Cestari<sup>2</sup>, Noedir A. G. Stolf<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Divisão de Cirurgia, Instituto do Coração (InCor) - HC FMUSP, São Paulo (SP), Brasil

<sup>2</sup>Divisão de Bioengenharia, Instituto do Coração (InCor) - HC FMUSP, São Paulo (SP), Brasil

<sup>3</sup>Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/SP, São Paulo (SP), Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo (SP), Brasil

E-mail: taniguchi@sbccv.org.br

**Resumo.** A calcificação de biomateriais é uma das causas da falência dos materiais implantados. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da liofilização em biomateriais em modelo animal crônico. **Material e Métodos:** Foi realizado implante de tubos de pericárdio bovino (PB) em 4 carneiros (*Ovis aries*), machos, com peso ( $28,3 \pm 4,7$ kg). Cada animal recebeu um tubo de PB controle na artéria carótida esquerda e um tubo de PB liofilizado na artéria carótida direita. Os tubos foram confeccionados com 3 cm de extensão e 4 mm de diâmetro. Após heparinização cada artéria carótida foi pinçada proximal e distal sendo o tubo de PB implantado no segmento ressecado. Procedeu-se à revisão de hemostasia e sutura por planos. Os animais foram eutanasiados, após 3,9 meses em média, para determinação de calcificação por análise histológica em amostras retiradas do controle e liofilizado das posições proximal e distal (coloração de von Kossa) e espectrofotometria de absorção atômica (EspAA). **Resultados:** A análise qualitativa pela histologia demonstrou para: Animal 1 e Animal 4 ausentes, muito discreto para o Animal 3 e no Animal 2 ausente no controle e discreto no liofilizado proximal e muito discreto no liofilizado distal. A análise qualitativa (média e DP para 3 amostras em mg/g material seco) pela EspAA evidenciou para controle (Animal 1, 2, 3 e 4 respectivamente):  $0,484 \pm 0,001$ ;  $0,422 \pm 0,004$ ;  $0,544 \pm 0,007$ ;  $0,31 \pm 0,01$ . Para o liofilizado (Animal 1, 2, 3 e 4 respectivamente):  $0,380 \pm 0,003$ ;  $1,04 \pm 0,05$ ;  $0,408 \pm 0,002$ ;  $0,30 \pm 0,01$ . **Conclusões:** O modelo animal descrito é eficaz para a avaliação de calcificação em modelo crônico. A liofilização é comparável ao PB preservado em solução de glutaraldeído e formaldeído. Entretanto, o material liofilizado é superior para o armazenamento sem aumento da calcificação. (Suporte financeiro FAPESP)

**Palavras-chave:** Liofilização, Pericárdio, Procedimentos operatórios

### 1. INTRODUÇÃO

Os materiais biológicos têm sido utilizados na confecção de implantes [Zerbini, 1975, Gabbay, 1988, Braile, 1998, Goissis, 1999] sob as formas mais variadas, como enxertos tubulares, enxertos valvados, próteses valvares e materiais para remendos e reforços. As características que os tornam ímpares consistem na sua extraordinária resistência mecânica a solicitações cíclicas repetidas.

A estrutura de tecidos biológicos, tipo pericárdio bovino (PB), é basicamente de colágeno e são tratados física e/ou quimicamente para melhorar as propriedades mecânicas e imunogênicas, além de controlar os processos de degradação ou calcificação [Herrero, 1999].

A liofilização pode ser definida como sendo um processo de secagem de um produto previamente congelado onde a maior parte da água é removida por sublimação. Aplica-se a remoção de qualquer solvente, mas em biotecnologia, o interesse fundamental se prende à água. Pode ser considerada como parte de uma terceira geração na tecnologia de secagem, já que foi desenvolvida para superar danos estruturais e perdas de compostos voláteis, observados nos processos convencionais. O processo de liofilização permite que materiais biológicos sejam conservados secos, facilitando a sua manipulação e estocagem, possibilitando a sua esterilização com raios gama ou outros meios que garantam uma

esterilização efetiva do material, em especial a eliminação de vírus lentos, para subsequente utilização como produtos médico-hospitalares.[Hafeez, 2005]. É reconhecidamente o melhor método para a produção de produtos desidratados de alta qualidade como os tecidos biológicos.

A técnica de liofilização a biomateriais tem sido utilizada com a finalidade de substituir ou restaurar órgãos e tecidos danificados fazendo com que estes materiais sejam compatíveis com o ambiente fisiológico [Kumar e Krishnan, 2002; Zaleske, 2003]. Estudos preliminares têm revelado que a liofilização resulta em menor citotoxicidade, menor liberação de resíduos químicos e potencial para menor calcificação [Maizato, 2003]. A liofilização, apesar de ser um método sofisticado, está longe da maturidade. O potencial apresentado no aumento da vida útil das próteses tubulares implantadas é desejável, justificando uma investigação profunda a cada novo produto.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados seis ovinos da raça Santa Inês (*Ovis Áries*), com idade entre 5 e 6 meses, confirmada pelo tempo de erupção dental e peso. O peso variou entre 25 e 30 kg ( $28,3 \pm 4,7$  kg). Os animais foram submetidos a exame clínico geral por médico veterinário, e considerados clinicamente sadios para a intervenção cirúrgica. Todos os animais receberam um número de identificação individual e uma ficha clínica, contendo todos os cuidados a serem recebidos durante a permanência dos mesmos neste estudo.

Todos os experimentos foram realizados na Divisão de Bioengenharia do Instituto do Coração (InCor), tendo sido aprovado pela Comissão Científica do InCor e de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### **2.2 Preparo dos animais**

Os animais receberam medicação para o controle de verminoses e foram mantidos em quarentena ao procedimento cirúrgico. Os animais permaneceram em jejum de sólidos por 24 horas e de líquidos nas 12 horas que antecederam a cirurgia.

### **2.3 Anestesia**

Quinze minutos antes da indução anestésica foi administrado 1mg de sulfato de atropina 1M. A veia jugular externa esquerda foi cateterizada. A indução anestésica foi realizada através da administração endovenosa (EV) de 12,5 mg/kg de tiopental sódico. A ventilação mecânica estabelecida foi de volume de 12 ml de O<sub>2</sub> /kg e frequência de 12 ciclos/min. A manutenção da anestesia foi realizada pela administração de sulfato de halotano a 1,5% por via inalatória e de 100 mg de cloreto de suxametônio EV. Foram administrados 250 mg de metilprednisolona e 1 g de cefalotina EV. A pressão arterial média, o eletrocardiograma e a temperatura retal foram monitorizados.

### **2.4 Procedimento cirúrgico**

O animal foi posicionado em decúbito lateral direito, e após a anti-sepsia, e colocação de campos estéreis procedeu-se a incisão cervical lateral tendo como referência a veia jugular externa. A veia jugular externa foi dissecada lateralmente, com exposição da artéria carótida comum(ACC) esquerda (ACCE). Procedeu-se a dissecção da ACCE. Após heparinização

sistêmica com 150 UI/kg, a ACC esquerda foi pinçada nas porções proximal e distal do segmento isolado. Após arteriotomia transversal foi ressecado cerca de 2 cm da ACC e implantado o tubo de pericárdio bovino (enxerto) controle de 4 mm de diâmetro e 3 cm de comprimento com anastomoses término-terminal com sutura contínua com polipropileno 7.0. Após revisão criteriosa da hemostasia procedeu-se à sutura em planos.

Em seguida, o animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo e o mesmo procedimento foi realizado na ACC direita, utilizando, desta vez, tubo de pericárdio bovino liofilizado.

## 2.5 Recuperação pós-operatória

Os animais foram mantidos por dois dias em acompanhamento pós-operatório em biotério. Neste período foi realizado anticoagulação dos animais com enoxaprina sódica (40 mg/dia).

O “animal 4” recebeu enoxaparina sódica subcutânea(1mg/kg) até a eutanásia.

## 2.6 Seguimento dos animais

Após a recuperação dos animais em biotério, os mesmos foram encaminhados ao Instituto Butantã, em São Paulo, onde foram acompanhados por médico veterinário.

Os animais foram acompanhados por 3 meses quando foi realizado eutanásia.

## 2.7 Avaliação do desempenho das biopróteses liofilizadas

*Avaliação microscópica.* O tecido foi longitudinalmente seccionado e foram avaliados os fragmentos proximal, médio e distal após imersão em parafina. Cortes de 4 micrômetros foram realizados e corados com hematoxilina-eosina.

*Análise de Cálcio.* Foram utilizadas as técnicas de von Kossa para a avaliação de calcificação pela microscopia ótica e espectrometria de absorção atômica (EspAA) para quantificação de cálcio.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Sobrevida

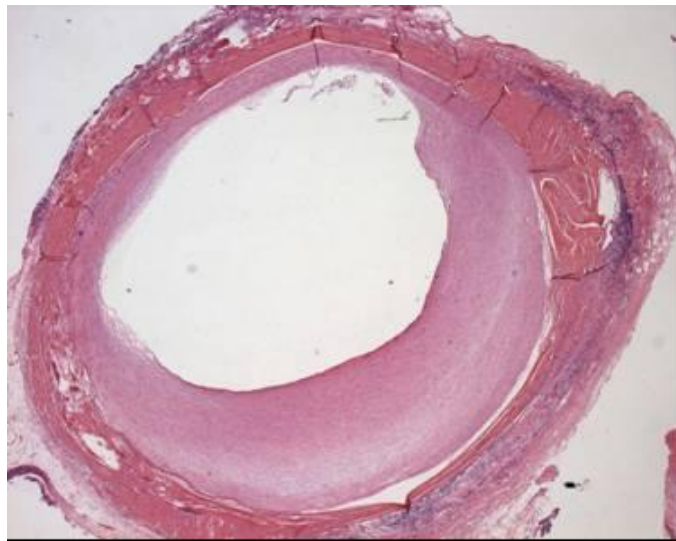
Quatro animais foram submetidos a implante de bioprótese de pericárdio bovino, com sobrevida média dos quatro animais estudados foi de 3,9 meses após a cirurgia (Tabela 1).

**Tabela 1:** sobrevida dos animais após implantação da prótese.

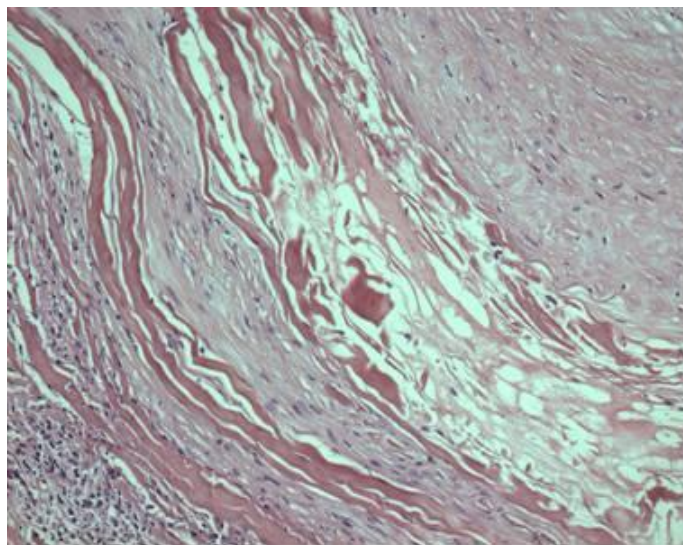
Animal	Sobrevida (meses)
1	5,8
2	3,1
3	3,6
4	3,1

### 3.2 Avaliação microscópica

**Animal 1.** O enxerto controle foi analisado quanto aos segmentos proximal, médio e distal (Fig.1) e, não demonstraram calcificação. Focos de infiltrado inflamatório mononuclear no tecido conjuntivo que envolve o pericárdio, com presença de fragmentos de fio cirúrgico, por vezes no próprio pericárdio (fio cirúrgico). Presença de tecido conjuntivo denso recobrimdo a luz vascular, sem calcificações, correspondendo à provável trombo completamente organizado, não oclusivo. O enxerto liofilizado (Fig. 2) foi igualmente analisado em 3 fragmentos cujos achados foram semelhantes ao controle, além de exibir focalmente aspecto “degenerado”, com vacuolizações e áreas de infiltração fibrosa.

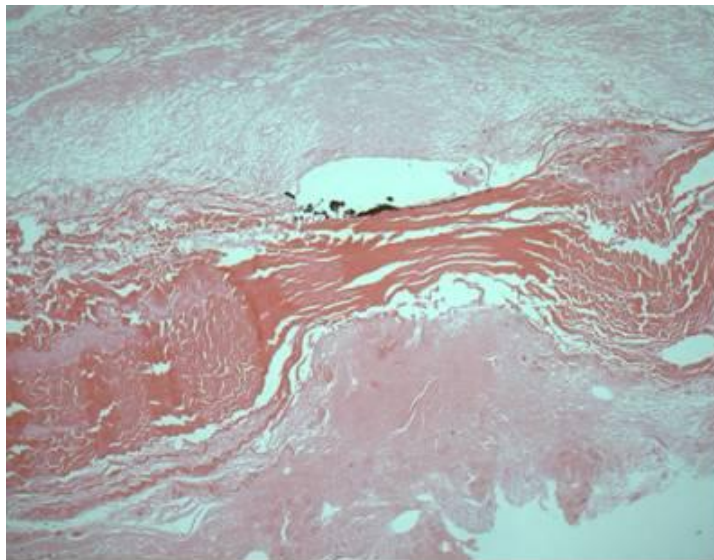


**Figura 1.** HE x 25. Animal 1; tubo de pericárdio bovino controle. Segmento distal com trombo antigo.



**Figura 2.** HE x200. Animal 1; tubo de pericárdio bovino liofilizado distal com degeneração do colágeno do pericárdio.

**Animal 2.** A avaliação microscópica para o enxerto controle identificou pericárdio sem calcificação no segmento proximal, e com pequena calcificação focal no segmento distal, notando-se reação inflamatória no tecido conjuntivo que o envolve, com presença de reação gigantocelular a corpos estranhos (fio cirúrgico). Presença de trombose organizada na luz vascular, com focos de calcificação do trombo no segmento proximal. Trombose organizada de fragmento arterial (carótida) junto do segmento distal. Já no enxerto liofilizado, foi identificado, no segmento proximal, pericárdio apresentando aspecto mais “degenerado” que o controle, com acentuada e extensa calcificação no segmento proximal. Há reação inflamatória mais exuberante que a dos controles, às custas de células mononucleares, com poucas células gigantes multinucleadas, não sendo observado corpos estranhos. Há trombose em diferentes fases evolutivas, com áreas recentes, apresentando abundante fibrina, ao contrário dos controles, que exibem apenas trombose organizada e, no segmento distal, aspecto bastante distinto do proximal, não sendo observada calcificação do pericárdio, de forma mais semelhante ao controle. Há discreta reação inflamatória, com presença de poucas células gigantes multinucleadas e fragmentos de corpo estranho. Presença de trombose luminal organizada, que se espalha para o segmento arterial nativo, com focos de calcificação (Fig. 3).

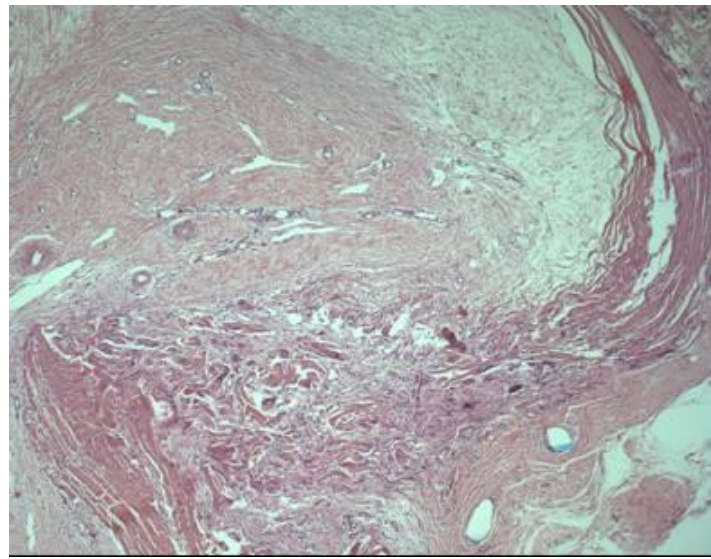


**Figura 3.** von Kossa x25. Animal 2; prótese liofilizada proximal positivo.

**Animal 3.** O enxerto controle foi analisado em três fragmentos, semelhantes entre si, apresentando pericárdio sem calcificação. Luz vascular ocluída por trombose antiga, com raros focos de calcificação do trombo no segmento distal. Há focos de infiltrado inflamatório mononuclear no tecido conjuntivo que envolve o pericárdio, com discreta intensidade, evidenciando focalmente áreas de penetração por fibrose e “degeneração” do pericárdio. No liofilizado, os achados foram similares, apresentando pericárdio sem calcificação, focos de infiltrado inflamatório mononuclear no tecido conjuntivo que envolve o pericárdio, com presença de fragmentos de fio cirúrgico. No segmento distal nota-se áreas de fragmentação do pericárdio com reação gigantocelular do tipo corpo estranho associada. Além disso, o

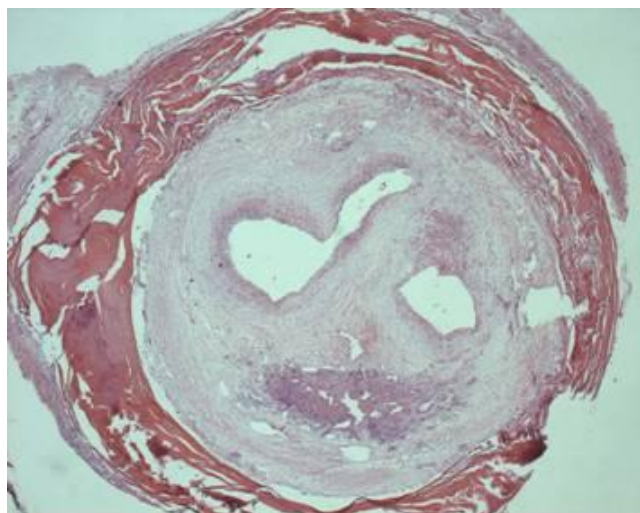


pericárdio exibe focalmente aspecto “degenerado”, com áreas de infiltração fibrosa. Luz vascular ocluída por trombose antiga.(Fig. 4)



**Figura 4.** HE x50. Animal 3; tubo de pericárdio liofilizado distal com fragmentação do pericárdio e reação inflamatória tipo corpo estranho.

**Animal 4.** O enxerto controle foi analisado em três fragmentos semelhantes entre si, que mostram pericárdio praticamente sem calcificação, havendo pequeno foco isolado no segmento proximal. Luz vascular ocluída por trombose organizada. Presença de acentuado infiltrado inflamatório mononuclear com fragmentos de fio cirúrgico e reação gigantocelular do tipo corpo estranho no tecido fibroso que envolve o pericárdio, com focos de penetração dessa reação inflamatória por entre o colágeno do pericárdio. No liofilizado os fragmentos proximal, médio e distal apresentam pericárdio praticamente sem calcificação, havendo pequeno foco isolado no segmento proximal. Luz vascular ocluída por trombose organizada, parcialmente recanalizada. Presença de infiltrado inflamatório mononuclear com fragmentos de fio cirúrgico e reação gigantocelular do tipo corpo estranho no tecido fibroso que envolve o pericárdio, com focos de penetração dessa reação inflamatória por entre o colágeno do pericárdio. O infiltrado inflamatório é discreto no segmento médio, menor que nas extremidades e no segmento médio do grupo controle. Pericárdio com aspecto “degenerado” no segmento distal. (Fig. 5)



**Figura 5.** HE x2,5. Animal 4; prótese liofilizada segmento médio.

### 3.3 Análise de cálcio

A análise de calcificação pela coloração de von Kossa revelou ausência de calcificação para os animais 1 e 4, muito discreta para o animal 3 e, no animal 2, ausência de calcificação no controle, discreta calcificação no segmento proximal do liofilizado e calcificação muito discreta no segmento distal do liofilizado (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados da análise quantitativa por coloração de von Kossa

	<i>Animal 1</i>		<i>Animal 2</i>		<i>Animal 3</i>		<i>Animal 4</i>	
	<i>Proximal</i>	<i>Distal</i>	<i>Proximal</i>	<i>Distal</i>	<i>Proximal</i>	<i>Distal</i>	<i>Proximal</i>	<i>Distal</i>
<i>Controle</i>	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Liofilizado</i>	-	-	++	+	+	+	-	-

“-“ ausente; “+” muito discreto; “++” discreto.

A quantificação de cálcio pela espectrometria de absorção atômica (média e DP para 3 amostras em mg/g material seco) demonstrou para “Animal 1” (controle e liofilizado respectivamente)  $0,484 \pm 0,001$  e  $0,380 \pm 0,003$ , para “Animal 2”  $0,422 \pm 0,004$  e  $1,04 \pm 0,05$ , para “Animal 3”  $0,544 \pm 0,007$  e  $0,408 \pm 0,002$  e, para “Animal 4”  $0,31 \pm 0,01$  e  $0,30 \pm 0,01$  (Tabela 3).

**Tabela 3.** Análise qualitativa (média e DP por 3 amostras) pela EspAA

	<i>Animal 1</i>	<i>Animal 2</i>	<i>Animal 3</i>	<i>Animal 4</i>
<i>Controle</i>	$0,484 \pm 0,001$	$0,422 \pm 0,004$	$0,544 \pm 0,007$	$0,310 \pm 0,010$
<i>Liofilizado</i>	$0,380 \pm 0,003$	$1,040 \pm 0,050$	$0,408 \pm 0,002$	$0,300 \pm 0,010$

#### 4. DISCUSSÃO

A liofilização é uma técnica que pode ser utilizada para a conservação de tecidos biológicos. O objetivo da liofilização é preservar o material biológico por congelamento da água e remoção do gelo por sublimação. As vantagens da liofilização na prática clínica incluem a diminuição da morbidade e tempo cirúrgico, avaliação precoce dos tamanhos das próteses e armazenamento. [Leirner, 2009]

A liofilização já foi utilizada em pericárdio bovino e em modelos de engenharia de tecido. [James, 1991, Faraj 2007]

O pericárdio bovino é habitualmente tratado com glutaraldeído (GA) para melhorar as propriedades mecânicas e imunogênicas, para reduzir a trombogenicidade, controlar a degradação e permitir maior tempo de armazenamento.

O processo de calcificação do pericárdio bovino é potencializado pelo GA [Maizato, 2003, Beachump, 1992]. Ainda, os resíduos de aldeído comprometem a durabilidade do material biológico pelo aumento da citotoxicidade. Maizato e cols. [Maizato, 2003] demonstraram que a liofilização do pericárdio bovino diminui a concentração de resíduos de aldeído com potencial para a diminuição do processo de calcificação. Assim, este trabalho objetivou estudar a calcificação do pericárdio bovino, liofilizado ou não, em modelo circulatório no animal crônico.

O carneiro como modelo experimental para o estudo de calcificação é amplamente utilizado pois o animal em fase de crescimento é modelo eletivo para o estudo dos processos de calcificação em biopróteses. O carneiro tem como vantagens o fato de ser animal dócil, com anatomia cardiovascular semelhante ao humano, sistema de coagulação semelhante ao humano e o processo de calcificação é acelerado. [Flammeng, 2006]

A disfunção e calcificação de próteses valvares cardíacas com pericárdio bovino implantadas no carneiro por meses é comparável à disfunção observada em próteses valvares cardíacas implantadas no homem após anos da cirurgia.

Para a avaliação dos enxertos optou-se pelo implante, no mesmo procedimento cirúrgico, de enxertos de pericárdio bovino liofilizado ou não em segmento da artéria carótida comum bilateralmente. A estratégia possibilitou a investigação dos mecanismos de calcificação tendo-se a comparação em cada um dos animais.

O implante bilateral teve como desvantagem a perda de animais pela oclusão dos enxertos. A presença de circulação colateral não desenvolvida, com necessidade aguda da manutenção dos fluxos cerebrais foi incapaz de manter dois animais vivos.

Os resultados apresentados demonstram que a oclusão crônica dos enxertos vasculares, liofilizados ou não, pode ser observada pela formação de trombos organizados na luz dos enxertos. Deve ser considerado que os enxertos vasculares apresentavam diâmetro de 4mm que é fator agravante para oclusão de enxertos vasculares [Teebken, 2002]. Ainda, o comprimento do enxerto pode ter facilitado o desenvolvimento da trombose pelo aumento da superfície de contato. Da mesma forma, a utilização de enxertos corrugados também aumentou a superfície de contato.

Os animais receberam heparina de baixo peso molecular – enoxaparina sódica nas primeiras 48 horas após o procedimento cirúrgico. O último animal da série recebeu enoxaparina sódica por 3 meses, porém os achados histológicos não foram diferentes daqueles que não receberam por longo prazo.

A análise histológica pelo método de von Kossa foi coerente aos com os resultados pela EspAA que é descrita como “padrão ouro” para a quantificação de cálcio. Apesar do pequeno número de animais, com exceção do animal 2, não houve comportamento anormal para calcificação. Deve ser considerado que a análise estatística não foi considerada para tal afirmativa.



Muitos são os fatores que podem influenciar a interpretação destes resultados o que representa uma importante limitação desta pesquisa. No entanto, o pericárdio bovino liofilizado poderá se tornar amplamente empregado em enxertos vasculares, caso sejam confirmados estes resultados em estudos subsequentes.

## 5. CONCLUSÃO

Conclui-se que o modelo animal descrito é viável e eficaz para avaliação de calcificação em modelo crônico, com anatomia favorável ao acesso cirúrgico. O pericárdio bovino liofilizado tem características comparáveis ao PB preservado em glutaraldeído e formaldeído. No entanto, é superior ao PB em relação ao armazenamento sem acarretar aumento da calcificação.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio financeiro da FAPESP (Projeto Temático - processo nº 04/09566-8), ao Dr. Luiz Alberto Benvenuti do Laboratório de Patologia do InCor pelo estudos histológicos e ao anestesista veterinário Evaldo de Matos Jr.

## REFERÊNCIAS

- Beauchamp, R.O., St. Clair, M.B., Fennel, T.R., Clarke, D.O., Morgan, K.L. (1992), "A critical review of the toxicology of glutaraldehyde", *Crit Rev Toxicol*, 22, 143-74
- Braile, D.M., Soares, M.J., Souza, D.R., Ramirez, V.D., Suzigan, S., Godoy, M.F. (1998), "Mapping of Bovine Pericardium: Physical and Histologic Tests", *J. Heart Dis.*, 7(2), 202-6.
- Gabbay, S., Kadam, P., Factor, S., Cheung, T.K. (1988), "Do Heart Valve Bioprostheses Degenerate for Metabolic or Mechanical Reasons?", *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 95(2), 208-215.
- Goissis, G., Marcantonio, J.E., Marcantônio, R.A.C., Comelli, L.R.C., Cancian, D.C.J., Carvalho, W.M. (1999), "Biocompatibility Studies of Anionic Collagen Membranes with Different Degree of Glutaraldehyde Cross-Linking", *Biomaterials*, 20(1), 27-34.
- Faraj, K.A., van Kuppevelt, T.H., Daamen W.F. (2007). "Construction of collagen scaffolds that mimic the three-dimensional architecture of specific tissues". *Tissue Eng*, 13(10), 2387-2394.
- Flammeng, W., Meuris, B., Yperman, J., De Vischer, G., Herijgers, P., Verbeken, E. (2006). "Factors influencing calcification of cardiac bioprostheses in adolescent sheep". *J Thorac Cardiovasc Surg* 132(1), 89-98.
- Hafeez, Y.M., Zuki, A.B.Z., Yusof, N., Asnah, H., Loqman, M.Y., Noordin, M.M., Ainul-Yuzairi, M.Y. "Effect of freeze-drying and gamma-irradiation on biomechanical properties of bovine pericardium". (2005). *Cell Tissue Banking* 6(2):85-89.
- Herrero, E.J., Fernández, P., Turnay, J., Olmo, N., Calero, P., García, R., Freile, I., Olivares, J.L.C. (1999), "Influence of Different Chemical Cross-linking Treatments on the Properties of Bovine Pericardium and Collagen", *Biomaterials*, 20(6), 539-545.
- James, N.L., Poole-Warren L.A., Schindhlem, B.K., Mitchell, R.M., Mitchell, R.E., Howlett CR. (1991) "Comparative evaluation of treated bovine pericardium as a xenograft for hernia repair", *Biomaterials*, 12(9), 801-809.
- Kumar T.R.S., Krishnan L.K. (2002), "A Stable Matrix for Generation of Tissue Engineered Nonthrombogenic Vascular Grafts", *Tissue Eng.*, 8(5), 763-770.
- Leirner, A.A., Jr. Tattini, V., Pitombo, R.N.M. (2009) "Prospects in Lyophilization of Bovine Pericardium", *Artificial Organs*, 33(3):221-229.
- Maizato, M.J.S., Higa, O.Z., Mathor, M.B., Camillo, M.A.P., Spencer, P.J., Pitombo, R.N., Cecília, A.C., Leirner, A.A. (2003), "Glutaraldehyde-Treated Bovine Pericardium: Effects of Liophilization on Cytotoxicity and Residual Aldehydes", *Artificial Organs*, 27(8) 692-694.
- Teebken O.E., Haverich A. (2002), "Tissue Engineering of Small Diameter Grafts", *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 23(6), 475-85.
- Zaleske, D., Peretti, G., Allemann, F., Strongin D., MacLean R., Yates K.E., Glowacki J. (2003), "Engineering a Joint: a Chimeric Construct with Bovine Chondrocytes in a Devitalized Chick Knee", *Tissue Eng.*, 9(5), 949-959.

Zerbini, E.J. (1975), "Results of Replacement of Cardiac Valves by Homologous Dura mater valves", *Chest*, 67(6), 706-710.

## QUANTIFICATION OF THE FREEZE DRYING PROCESS EFFECT ON THE BOVINE PERICARDIUM IN CRONIC ANIMAL MODEL

Fabio P. Taniguchi<sup>1</sup>, Rafael F. Ambar<sup>2</sup>, Marina J. S. Maizato<sup>2</sup>, Olga Z. Higa<sup>3</sup>, Ronaldo N. M. Pitombo<sup>4</sup>, Idágene A. Cestari<sup>2</sup>, Noedir A. G. Stolf<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Divisão de Cirurgia, Instituto do Coração (InCor) - HC FMUSP, São Paulo (SP), Brasil

<sup>2</sup>Divisão de Bioengenharia, Instituto do Coração (InCor) - HC FMUSP, São Paulo (SP), Brasil

<sup>3</sup>Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/SP, São Paulo (SP), Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo (SP), Brasil  
E-mail: taniguchi@sbccv.org.br

**Abstract.** Biomaterials calcification is a cause of materials implantation failure. The study objective is to evaluate the freeze drying process effect in biomaterials in a chronic animal model. Materials and Methods: Four male sheep (*Ovis áries*) weighting  $28,3 \pm 4,7$ kg got a tubular bovine pericardium prosthesis implant. Each animal got a control bovine pericardium tubular graft in the left Common Carotid artery (CCA) and a freeze dried bovine pericardium tubular graft in the right CCA. The tubes were manufactured measuring 4mm in diameter and 3cm in length. After the I.V. administration of 5000 UI of sodic heparin, each CCA was clamped at the proximal and distal regions and the prosthesis was implanted in the dissected segment. The flux is, then, reestablished followed by layered sutures. The average survival before euthanasia was 15weeks. After the euthanasia, calcification was determined by histological analyses of proximal and distal fragments from the control and freeze dried prostheses and by atomic absorption spectrometry (AAS). Results: Histological qualitative analyses showed to Animal 1 and Animal 4 absent, very discrete to Animal 3 and, to Animal 2, absent in control and discrete in the freeze dried proximal segment and very discrete in freeze dried distal segment. Calcium quantification by AAS (average and SD for 3 samples in mg/g of dry material) revealed to control graft (Animal 1, 2, 3 and 4 respectively):  $0,484 \pm 0,001$ ;  $0,422 \pm 0,004$ ;  $0,544 \pm 0,007$ ;  $0,31 \pm 0,01$  and to the freeze dried one (Animal 1, 2, 3 and 4 respectively):  $0,380 \pm 0,003$ ;  $1,04 \pm 0,05$ ;  $0,408 \pm 0,002$ ;  $0,30 \pm 0,01$ . Conclusions: The described animal model is efficient for calcification evaluation in chronic model. The freeze dried bovine pericardium is comparable to bovine pericardium preserved in glutaraldehyd and formaldehyd. Nevertheless, the freeze dried graft is greater regarding gathering and does not show more calcification. (financial support by FAPESP)

**Key-words:** freeze drying process, pericardium, surgery procedures