

## **AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE VÁLVULA BIOLÓGICA LIOFILIZADA**

Marina J. S. Maizato<sup>1</sup>, Sérgio A. Hayashida<sup>1</sup>, Fabio P. Taniguchi<sup>1</sup>, Olga Z. Higa<sup>2</sup>, Ronaldo N. M. Pitombo<sup>3</sup>, Idágene A. Cestari<sup>1</sup>, Adolfo A. Leirner<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/SP, São Paulo (SP), Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo (SP), Brasil  
E-mail: marina.maizato@incor.usp.br

**Resumo.** A liofilização de tecidos biológicos permite sua preservação a seco, facilitando a estocagem e esterilização por meio de raios gama para utilização em produtos médicos hospitalares. **Objetivo** - Avaliar o desempenho *in vitro* e *in vivo* de próteses valvulares liofilizadas. **Metodologia** - Duas próteses valvulares aórticas feitas de pericárdio bovino nº 23 de diferentes fabricantes foram avaliadas em um duplicador de pulso (80 bpm, 5 L/min, Shelhigh Inc, New Jersey, USA) antes e após a liofilização. Os sinais de fluxo e gradiente de pressão transvalvular foram registrados nos experimentos *in vitro* e *in vivo* e filmadas a abertura e fechamento das próteses no duplicador de pulsos. Antes e após a liofilização e reidratação, o excesso de água foi retirada com toalha de papel e as próteses foram pesadas. A reidratação das próteses valvulares liofilizadas se deu diretamente dentro do sistema duplicador de pulso durante o ensaio. A avaliação *in vivo* das próteses liofilizadas está sendo realizada em ovinos jovens da raça Santa Inês com o implante na posição pulmonar após reidratação (30 min, solução salina 0,9%). **Resultados** - Houve alteração no perfil de abertura e fechamento das próteses valvulares após a liofilização. O gradiente transvalvular registrado *in vitro* em duas válvulas foi de  $17,08 \pm 0,57$  e  $18,76 \pm 0,70$  mmHg antes da liofilização e  $34,24 \pm 0,59$  e  $30,40 \pm 0,97$  mmHg após a liofilização. A reidratação de ambas as válvulas liofilizadas em média foi de 82%. A média do gradiente transvalvular das próteses não liofilizadas *in vivo* foi de  $2,58 \pm 1,06$  imediatamente após o implante e  $7,71 \pm 3,92$  mmHg após 3 meses. Imediatamente após o implante, as válvulas liofilizadas apresentaram um gradiente transvalvular de  $8,14 \pm 5,12$  mmHg. **Conclusão** - A liofilização resultou em modificação da dinâmica das próteses valvares e aumentou em média 83% o gradiente transvalvular em ensaios *in vitro*. O gradiente encontrado em ensaios *in vivo* está dentro dos níveis aceitáveis. (Apoio financeiro - FAPESP)

**Palavras-chave:** Avaliação *in vivo*, Desempenho hidrodinâmico, Liofilização, Válvula biológica.

### **1. INTRODUÇÃO**

A liofilização pode ser definida como sendo 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 as suas estruturas e minimizando a perda de produtos voláteis que não são observados durante a secagem por meios convencionais. Diversos autores têm recentemente aplicado a técnica de liofilização a biomateriais com a finalidade de substituir ou restaurar órgãos e tecidos danificados fazendo com que estes materiais sejam biocompatíveis com o local de aplicação [Palmer, 2003, Kumar, 2002, Zaleske, 2003, Webb, 2002].

Próteses valvulares biológicas ou mecânicas são clinicamente utilizadas para a substituição de válvulas humanas quando estes apresentam problemas clínicos de diversas origens. As próteses valvulares mecânicas possuem uma vida útil longa, mas necessitam de uma anticoagulação permanente. As próteses valvulares biológicas de PB ou suíno possuem um tempo de vida útil menor, em média 15 anos, mas com a vantagem de não necessitarem de

uma anticoagulação, e a cirurgia para uma substituição dessas próteses valvulares poderem ser programadas.

Trabalhos anteriores do grupo mostraram que o processo de liofilização não altera significativamente as características mecânicas do PB, mas diminuíram significativamente a quantidade de aldeídos residuais [Maizato, 2003 e Maizato, 2003b], resultante do tratamento realizado nos tecidos de PB para melhorar as qualidades mecânicas e imunogênicas [Braile, 1990].

Otimização no processo de liofilização de tecidos biológicos tem sido estudada pelo grupo na tentativa de melhorar a qualidade das próteses valvulares biológicas de PB. Vários protocolos de liofilização foram avaliados e o escolhido foi a liofilização com tratamento térmico (*annealing*) que apresentou melhores resultados [Borgognoni, 2009].

Objetivando avaliar as alterações *in vitro* e *in vivo* de biopróteses valvulares de PB quando submetidos a esse protocolo de liofilização com *annealing*, algumas próteses valvulares biológicas de PB foram liofilizadas para um estudo *in vitro* em simuladores de desempenho hidrodinâmico e outras próteses valvulares após a liofilização foram esterilizadas para serem implantadas em ovinos para avaliação *in vivo*. A escolha de ovinos para o estudo foi pela semelhança do sistema hidrodinâmico dos ovinos com os humanos, além de serem considerados animais de eleição para o estudo da calcificação [Sillas, 2008 e Ozaki, 2004].

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

- Próteses valvulares de PB n°. 23 de empresas fabricantes distintas (X e Y)
- Solução salina de NaCl a 0,9%
- Ovinos jovens, machos da raça Santa Inês com peso entre 35 a 40 kg, n = 16
- Materiais cirúrgicos descartáveis para a realização das cirurgias: bombas centrífugas, reservatórios de cardioplegia, filtros de sangue, cânulas, conjunto de tubos para circulação extracorpórea, fios de sutura, etc.
- Fármacos: anestésicos, antibióticos, analgésicos, etc.

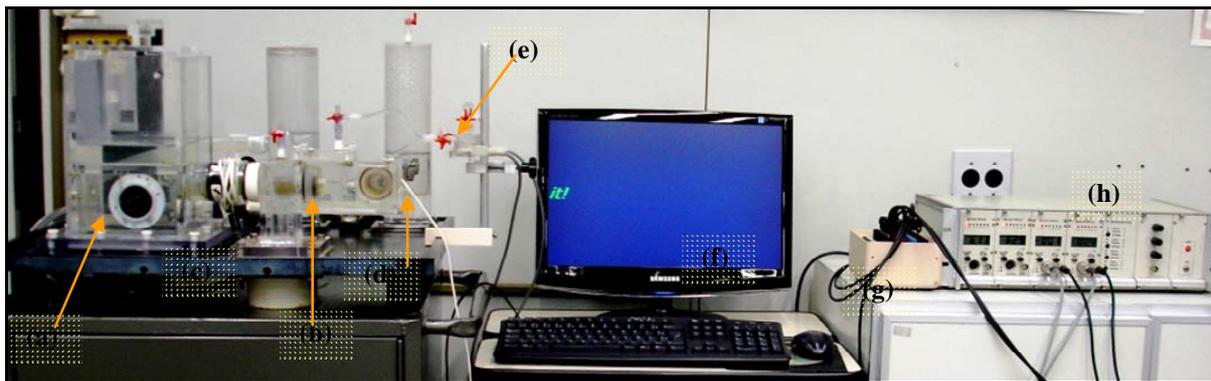
### 2.2 Instrumentais para ensaio *in vitro*

- Duplicador de pulsos Shelhigh® (*Shelhigh Inc, New Jersey, USA*)
- Fluxômetro Ultrassônico T101 (*Transonic System, Inc., USA*)
- Transdutores de Pressão Fisiológica TPS-2 (Bioengenharia, InCor/HC FMUSP, Brasil)
- Amplificador de Sinais Fisiológicos Lynx (Lynx Ltda, São Paulo, SP, Brasil)
- Sistema de Aquisição de dados Windaq® (*Dataq Instruments, Inc. Akron, USA*)
- Câmera digital Sony DSC-P150 (*Sony Corp, Japan*)

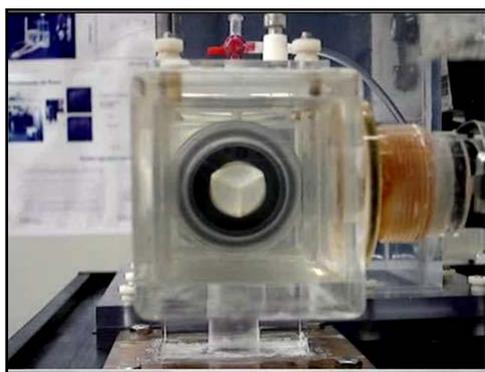
### 2.3 Métodos

**Ensaio *in vitro*.** O desempenho de próteses valvulares aórticas de PB n°. 23 de duas empresas X e Y foram avaliadas em um duplicador de pulso Shelhigh® (Shelhigh Inc, New Jersey, USA) em frequências de 60, 80 e 100 pulsos por minuto (bpm), com fluxos variando de 3 a 6,7 L/min, em posição aórtica. Os valores de gradiente apresentados correspondem somente ao ensaio de 80 bpm e fluxo de 4,5 a 5,0 L/min, antes e após a liofilização.

A Figura 1 apresenta o sistema de ensaio *in vitro* e na (Fig. 2) a vista frontal da prótese valvular aórtica sendo avaliada.



**Figura 1.** Sistema de avaliação de próteses valvulares: (a) Válvula padrão em posição mitral - Vista frontal, (b) Prótese em teste posicionado na posição aórtica - Vista lateral, (c) Duplicador de pulsos da Shelhigh® - Vista frontal, (d) Fiação do probe do Fluxômetro ultrassônico, (e) Transdutores de pressão, (f) Monitor do PC para visualização das variáveis de interesse, (g) Caixa do Sistema de Aquisição Windaq® e (h) Amplificador de sinais biológicos.



**Figura 2.** Vista frontal da válvula aórtica em avaliação no duplicador de pulsos.

As variáveis de interesse: pressão ventricular esquerda (PV) em mmHg, Pressão aórtica (PAo) em mmHg, Fluxo instantâneo através da válvula aórtica em L/min, e gradiente pressórico transvalvular (dP) em mmHg, (Fig. 4 e 5), foram monitorizadas e gravadas numa taxa de aquisição de 200 Hz por canal, para cálculos e análises posteriores (Software de Análise e Sistema de Aquisição de sinais da Windaq®).

Para a quantificação do gradiente transvalvular, foi utilizada a média das medidas em 10 pulsos seguidos de cada sequência (pré e pós-liofilização), de acordo com a norma ISO 5840. Durante os testes, o comportamento dinâmico das próteses aórticas em teste foi filmado com uma câmera digital, posicionada em um suporte fixo, proporcionando uma vista frontal do funcionamento valvular aórtico (Fig. 2).

Para averiguar o grau de reidratação, as próteses valvulares foram secadas em papel toalha e seus pesos registrados antes e após a liofilização e reidratação.

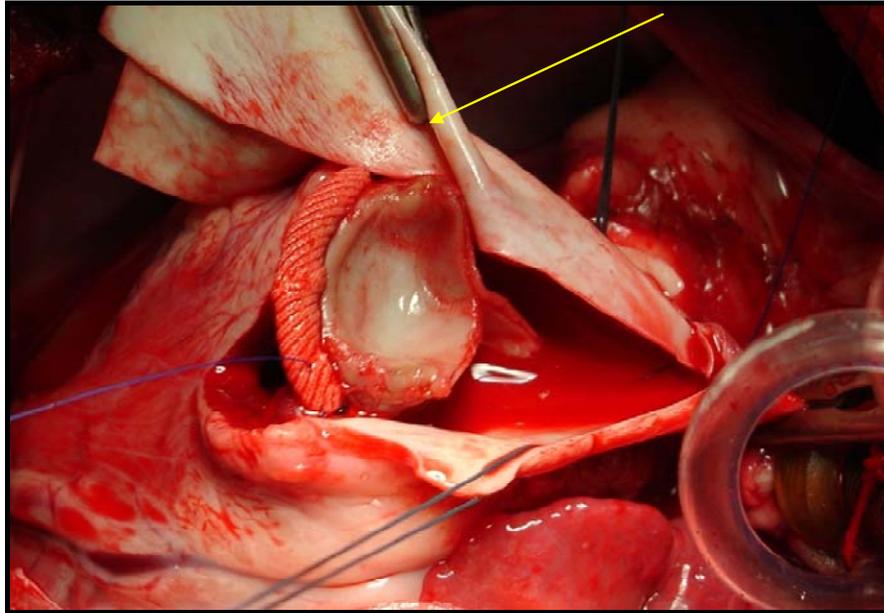
Após a liofilização as próteses valvulares foram colocadas novamente no duplicador de pulso, onde se deu a sua reidratação durante o ensaio.

**Ensaio in vivo.** Para a avaliação crônica (3 meses), da prótese valvular liofilizada foi escolhido ovino jovem da raça Santa Inês com peso entre 35 a 40 kg. Para este estudo foram realizadas implantações de próteses valvulares de PB comercialmente utilizadas, sem nenhum tratamento que foram utilizadas como controle e próteses valvulares liofilizadas, após a reidratação de 30 min em solução salina de NaCl a 0,9%. As próteses valvulares foram todas implantadas na posição pulmonar.

Os ovinos utilizados foram todos vermifugados, submetidos ao exame clínico e mantidos em observação por 10 dias antes de serem submetidos ao processo cirúrgico. Para a cirurgia os carneiros foram colocados em jejum de 24 horas de sólidos e 12 horas de líquidos. Todos foram anestesiados, entubados com sonda endotraqueal, colocados em ventilação mecânica e seus parâmetros hemodinâmicos monitorados, e registrados em um sistema de aquisição de dados Windaq® (*Dataq Instruments, Inc. Akron, USA*), em sala cirúrgica para experimentação animal.

Após a anestesia geral foi realizada a toracotomia esquerda no 4º espaço intercostal esquerda, o pulmão esquerdo afastado e o pericárdio seccionado. Esta abordagem possibilitou a exposição do tronco pulmonar. O carneiro foi colocado em assistência cardíaca direita utilizando uma bomba centrífuga, pela canulação única do átrio direito com tubo de 3/8 polegada e retorno sanguíneo pelo tronco pulmonar. O implante da válvula biológica número 23 foi realizado na via de saída da artéria pulmonar com ampliação utilizando um *patch* de pericárdio bovino (Fig. 3). O animal foi retirado da assistência circulatória, após o procedimento e estabilização hemodinâmica. Na finalização do procedimento cirúrgico foi feita uma verificação criteriosa de hemostasia. Antes de fechar o animal as pressões foram avaliadas e registradas no Windaq® (*Dataq Instruments, Inc. Akron, USA*) para a determinação do gradiente de pressão transvalvular do ventrículo direito-tronco pulmonar (gradiente VD-TP). Terminado os registros de pressões o animal foi suturado por planos, esperou-se a recuperação anestésica antes de ser encaminhado para o biotério.

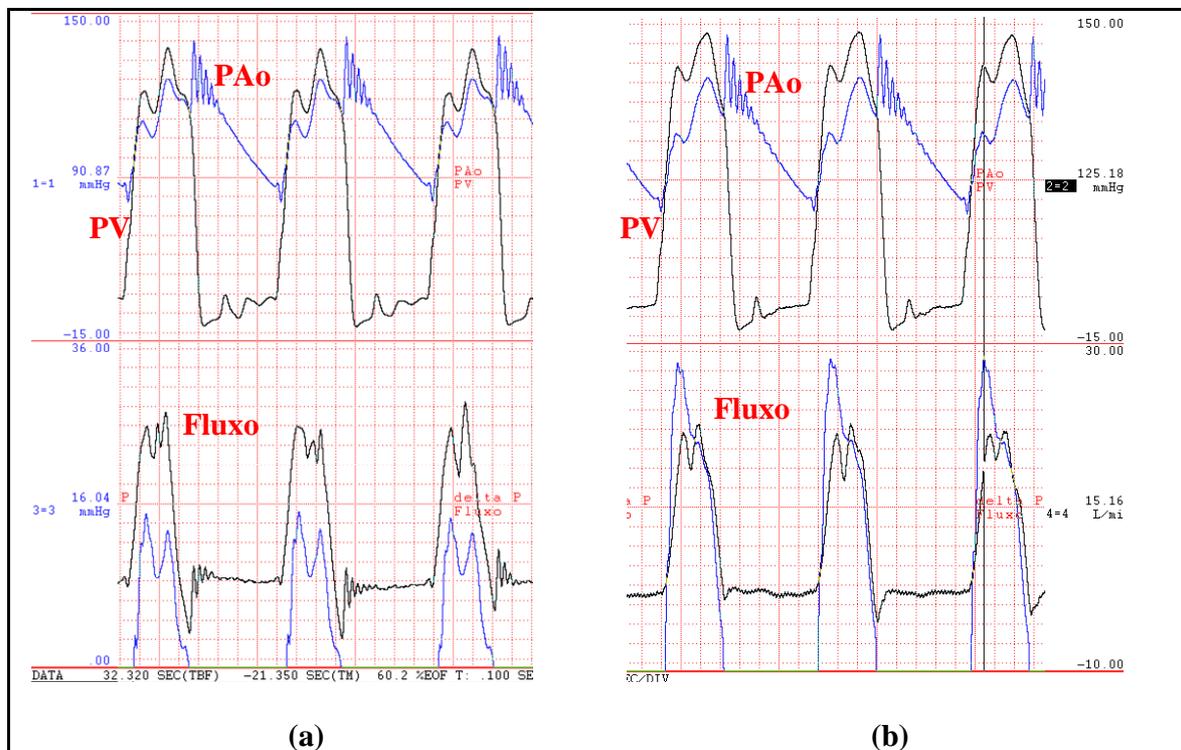
A duração do experimento crônico dos ovinos é de 3 meses. Para o registro dos parâmetros hemodinâmicos antes da eutanásia, os animais são anestesiados e colocados em ventilação mecânica. Depois do registro o carneiro é sacrificado, obedecendo aos critérios aprovados pela comissão de ética, para o explante das próteses valvulares implantadas, que serão avaliados macroscopicamente, por análise histológica e quantificação de cálcio por espectrometria de absorção atômica. Todos os animais que não sobreviveram por esse período ou por problemas intra-operatórios ou pós-operatórios foram excluídos do estudo.



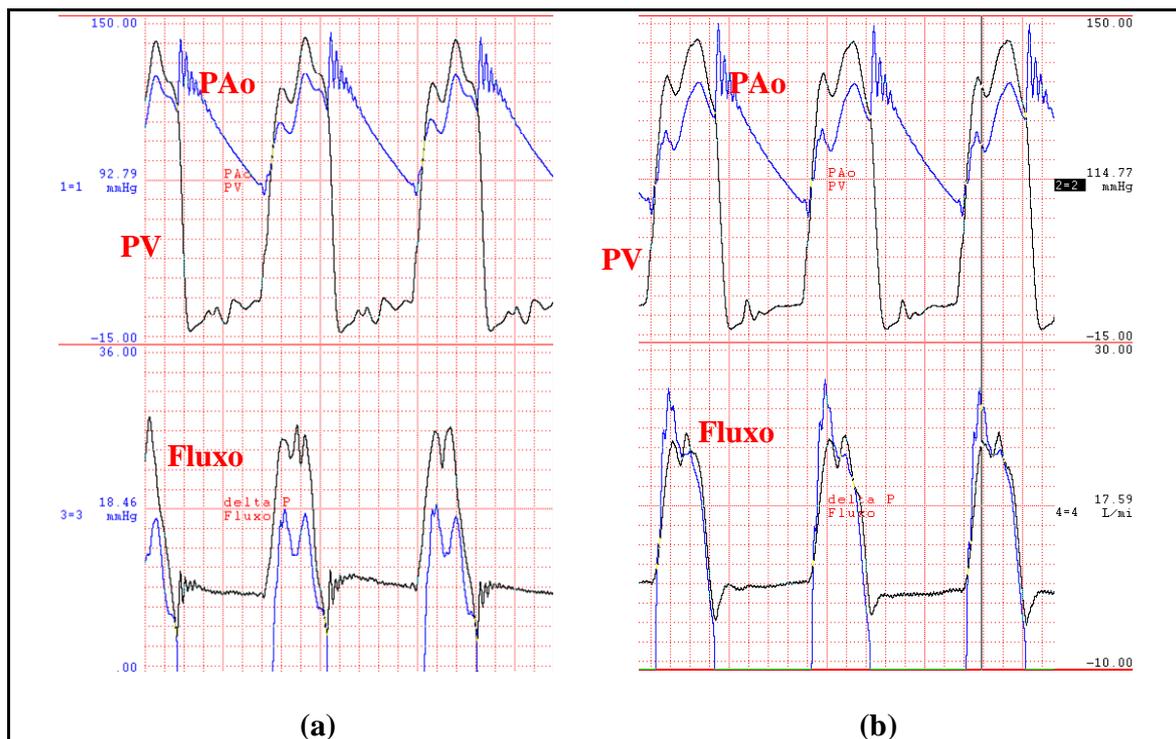
**Figura 3.** Avaliação crônica das próteses valvulares em ovinos jovens, machos da raça Santa Inês: Implante de prótese valvular de PB n.º 23 na posição pulmonar, com ampliação sendo realizada com a utilização de *patch* de PB (indicada pela seta).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Resultados dos ensaios *in vitro*



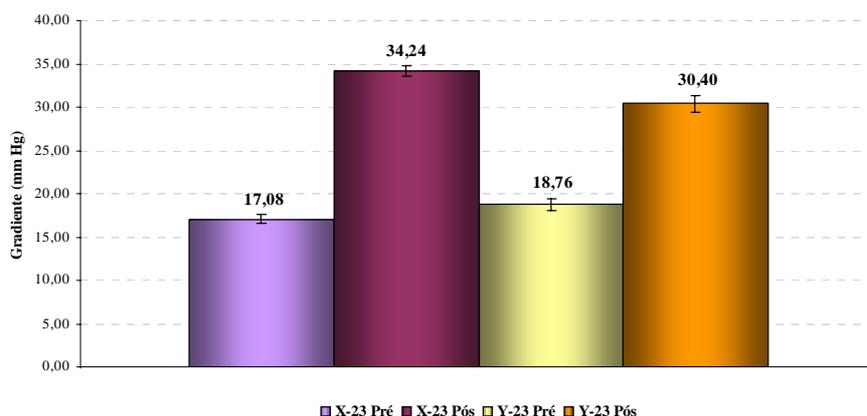
**Figura 4.** Registro dos sinais da Prótese X-23, (a) = antes e (b) = após a liofilização, com frequência de 80 bpm e fluxo de 4,5 a 5,0 L/min



**Figura 5.** Registro dos sinais da Prótese Y-23, (a) = antes e (b) = após a liofilização, com frequência de 80 bpm e fluxo de 4,5 a 5,0 L/min.

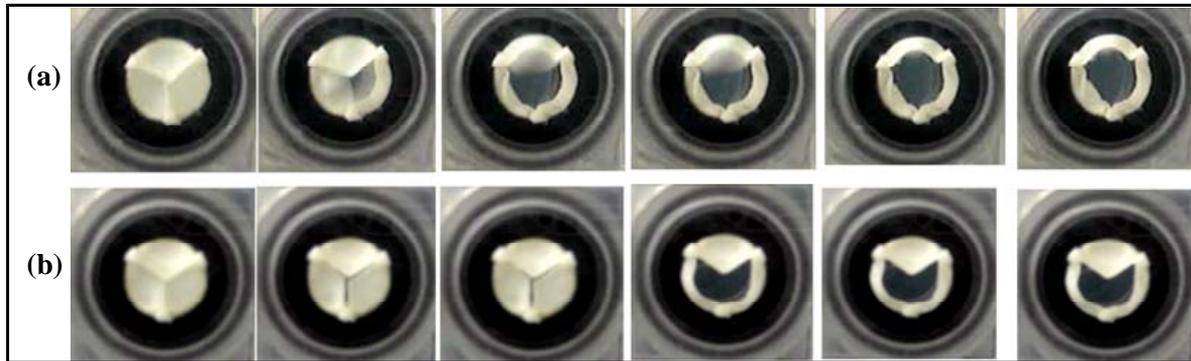
Tanto a prótese X-23 como a Y-23, demonstraram um significativo aumento no gradiente transvalvar após o processo de liofilização, em todas as condições testadas.

A 80 bpm, com fluxo de 4,5 a 5,0 L/min, o gradiente transvalvar da prótese X-23 variou de  $17,08 \pm 0,57$  mmHg, antes da liofilização, e atingiu  $34,24 \pm 0,59$  mmHg após a liofilização, a prótese Y-23 variou de  $18,76 \pm 0,70$  mmHg a  $30,40 \pm 0,97$  mmHg. (Fig. 6).



**Figura 6.** Variação do gradiente das próteses valvulares aórticas de PB, tamanho 23 dos fabricantes X e Y, avaliadas a 80 bpm e fluxo de 4,5 a 5 L/min, antes e após a liofilização.

Pela observação da filmagem das válvulas nos ensaios, foi verificada dificuldade na abertura dos folhetos de todas as próteses testadas, após a liofilização. Nos ensaios que foram realizados, pode-se notar que somente 2 folhetos se abrem totalmente com um fluxo de até 6,7 L/min (Fig. 7), promovendo aumento do gradiente pressórico transvalvar como descrito acima. Esse padrão de abertura ocorreu de maneira similar nas duas próteses valvulares X-23 e Y-23.



**Figura 7.** Sequência de abertura da prótese valvular aórtica X-23 (a) = antes da liofilização e (b) = após a liofilização.

A Tabela 1 apresenta a porcentagem de reidratação das próteses valvulares liofilizadas 15 min após reidratação durante o ensaio no sistema duplicador de pulso Shelhigh® até 72 h após ficarem imersos em solução salina de NaCl 0,9%.

**Tabela 1:** Porcentagem de reidratação das próteses valvulares liofilizadas de 15 min até 72 h.

| válvula  | % reidrat | % reidrat | % reidrat | % reidrat |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Fab - N° | 15 min    | 24 h      | 48 h      | 72 h      |
| X - 23   | 81,3      | 83,2      | 88,6      | 88,9      |
| Y - 23   | 83,4      | 83,7      | 90,5      | 92,7      |

reidrat = reidratação; Fab = fabricante

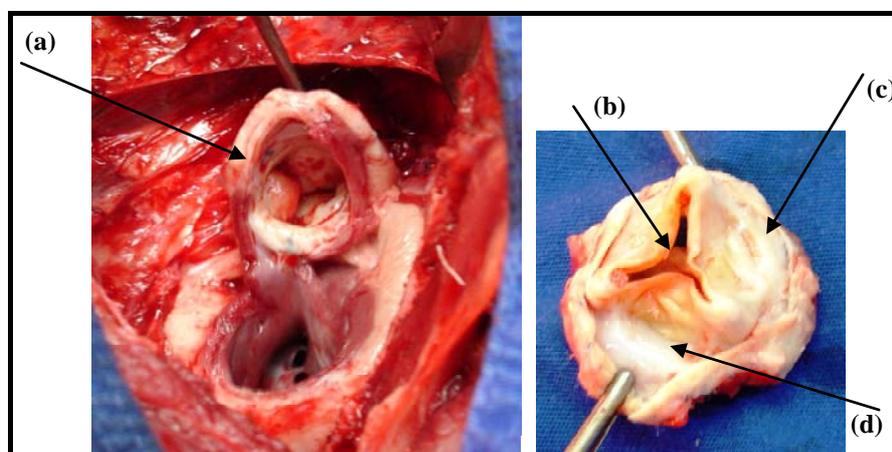
### 3.2 Resultado dos ensaios *in vivo*

A média  $\pm$  DP de gradiente VD-TP em carneiros em experimentos crônicos de implante de prótese valvular biológica de PB liofilizadas e não liofilizadas estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Média dos gradientes logo após o implante das próteses valvulares de PB em carneiros jovens, machos da raça Santa Inês e após 3 meses de implante, no lado pulmonar.

| Experimento            | Gradiente VD-TP (mmHg)         |
|------------------------|--------------------------------|
| C logo após o implante | 2,58± 1,06                     |
| C após 3 meses         | 7,71 ± 3,92                    |
| L logo após o implante | 8,14 ± 5,12                    |
| L após 3 meses         | Avaliação crônica em andamento |

C = prótese valvular biológica de PB não liofilizada, n = 5; L = prótese valvular biológica de PB liofilizada, n =4; VD-TP = ventrículo direito-tronco pulmonar



**Figura 8.** (a) = Prótese valvular de PB não liofilizada após 3 meses de implante na posição pulmonar do carneiro no momento da eutanásia. (b) Observa-se que os folhetos estão deformados e enrijecidos. (c) = Material esbranquiçado em toda volta da prótese valvular é formação de pannus. (d) = Pannus aderido ao patch de PB.

### 3.3 Discussão dos resultados *in vitro*

O funcionamento de uma bioprótese valvular cardíaca depende, dentre outras características [Bakhtiary, 2007, Dasi, 2009, Robicsek, 1999], das propriedades físicas dos folhetos. Elas precisam de rigidez para proporcionar uma força estrutural, e também de flexibilidade e elasticidade para seu perfeito funcionamento.

Segundo Benarcca [Benarcca, 2002], biopróteses com folhetos com baixo módulo de elasticidade resultam numa boa função hidrodinâmica, com uma abertura facilitada das 3 lacíneas, enquanto alto Módulo de Young pode ser benéfico em termos de durabilidade, pois tem reduzida tendência de acumular tensões durante a abertura e fechamento da válvula. No entanto, quanto mais rígido for o folheto da lacínea, a função hidrodinâmica da bioprótese é prejudicada, devido à dificuldade na abertura dos folhetos.

Os resultados obtidos nos experimentos sugerem que o tipo de liofilização realizada nas amostras avaliadas promoveu um aumento na rigidez dos folhetos valvulares, provavelmente

devido a uma reidratação inadequada do pericárdio bovino depois do processamento realizado.

### 3.4 Discussão dos resultados *in vivo*

A prótese valvular de PB liofilizada, quando reidratada em solução salina de NaCl a 0,9% durante 30 min fica visualmente semelhante ao de uma prótese não liofilizada e também ao tato. Quando essas próteses liofilizadas são implantadas o gradiente VD-TP comparado com o gradiente VD-TP de uma prótese não liofilizada, apresenta aumento em torno de 3,2 vezes (Tabela 2). O aumento do gradiente em carneiros com válvula liofilizada sugere haver alterações provocadas nas próteses valvulares liofilizadas, como as observadas nos resultados dos ensaios *in vitro*. Há referências de que gradientes VD-TP de 10 a 15 mmHg são aceitáveis resultando em desempenho da válvula pulmonar satisfatório [Maluf, 1993 e Pinto Jr, 1999]. Quando comparados os gradientes imediatamente após o implante das próteses liofilizadas nota-se semelhança com o de próteses não liofilizadas após 3 meses de implante, quando estes ao serem explantadas apresentavam os folhetos deformados e enrijecidos devido à calcificação (Fig. 8). Ainda nenhum ovino com prótese valvular liofilizada alcançou o tempo para o seu explante, assim sendo, não existem dados comparativos tardios entre as próteses valvulares de PB liofilizadas e não liofilizadas.

Trabalhos anteriores mostraram que a quantidade dos aldeídos residuais dos PB tratadas com glutaraldeído diminuiu consideravelmente quando submetidos à liofilização [Maizato, 2003]. Segundo a literatura o glutaraldeído residual é uma das causas de calcificações das próteses biológicas [Beuchamp, 1992 e Grabenwöger, 1998]. A expectativa é que as próteses valvulares liofilizadas após 3 meses se apresentem menos calcificadas do que as não liofilizadas.

## 4. CONCLUSÕES

A liofilização alterou o perfil de abertura e fechamento das próteses valvulares e aumentou em média 83% o gradiente transvalvular em ensaios *in vitro*. O resultado do ensaio *in vivo* sugere a manutenção dos níveis de pressão do animal que recebeu a prótese valvular liofilizada dentro de níveis aceitáveis para um desempenho satisfatório da prótese.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPESP (Projeto Temático - processo nº. 04/09566-8) e a toda equipe que participa desse trabalho de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- Bakhtiary, B., Dzemali, O., Steifenseiffer, U., Schmitz, C., Glasmacher, B., Moritz, A., Kleine, P. (2007), "Opening and Closing Kinematics of Fresh and Calcified Aortic Prostheses: An *in Vitro* Study", *J. Thorac. Cardiovas.c Surg.*, 134, 657-62.
- Beauchamp, R.O., St.Clair M.B., Fennell T.R., Clarke D.O., Morgan K.L. (1992), "A Critical Review of the Toxicology of Glutaraldehyde", *Critical Reviews in Toxicology*, 22(3, 4), 143-174.
- Bernacca, G.M., O'Connor, B., Williams, D.F., Wheatley, D.J. (2002), "Hydrodynamic Function of Polyurethane Prosthetic Heart Valves: Influence of Young's Modulus and Leaflet Thickness", *Biomaterials*, 23, 45-50.
- Borgognoni, C., Tattini Jr, V., Ayrosa, A.M.B., Polakiewicz, B., Leirner, A.A, Maizato, M.J.S., Higa, O.Z., Beppu, M.M, Pitombo, R.N.M. (2009), "The Influence of Freezing Rates on Bovine Pericardium Tissue Freeze-Drying", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 1493-1504.

- Braile, D. M. (1990) “Prótese Vascular de Pericárdio Bovino. Desenvolvimento em Posição Mitral”, Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- Dasi, L.P., Simon H.A., Sucosky, P., Yoganathan, A. (2009), “Fluid Mechanics of Artificial Heart Valves”, *Clin. Exp.Pharmacol. Physiol.* 36, 225-237.
- Grabenwöger, M. Böck, P., Fitzel, F., Schmidberger, A., Grimm, M., Laufer, G., Bergmeister, H., Wolner, E. (1998), “Acid Glycoproteins Accumulate in Calcified Areas of Bioprosthetic Tissue”, *J. Heart Valves Dis.*, 7(2), 229-234.
- Kumar, T.R.S. e Krishnan, L.K. (2002), “A Stable Matrix for Generation of Tissue Engineered Nonthrombogenic Vascular Grafts”, *Tissue Eng.*, 8(5), 763-770.
- Maizato, M.J.S., Higa, O.Z., Mathor, M.B., Camillo, M.A.P., Spencer, P.J., Pitombo, R.N.M., Zavaglia, A.C., Leirner, A.A. (2003), “Glutaraldehyde-Treated Bovine Pericardium: Effects of Liophilization on Cytotoxicity and Residual Aldehydes”, *Artificial Organs*, 27(8), 692-694.
- Maizato, M.J.S. (2003b), “Avaliação das Propriedades do Pericárdio Bovino Liofilizado”, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas – Departamento de Materiais e Processos da Faculdade de Engenharia Mecânica, Campinas.
- Maluf, M.A, Verde, J.L., Leal, J.C., Catani, R., Garcia Jr, H.V., Thevenard R., Carvalho, A.C., Andrade, J.L., Andrade, J.C.S., Braile, D.M., Leão, L.V., Buffolo, E. (1993), “Reconstituição da Valva Pulmonar e Via de Saída do Ventrículo Direito, com Prótese Bivalvular e Prótese Tubular Valvada de Tronco Pulmonar de Porco: Estudo Experimental e Aplicação Clínica”, *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, 8(1), 20-38.
- Ozaki, S., Herijgers, P., Flameng, W. (2004), “A New Model to Test the Calcification Characteristics of Bioprosthetic Heart Valves”, *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 10(1), 23-28.
- Palmer, E.M., Baum, L.G., Van Seventer, G.A. (2003), “Small Intestinal Submucosa Induces Loss of Mitochondrial Integrity and Caspase Dependent Apoptosis in Human T Cells”, *Tissue Eng.*, 9(2), 307-314.
- Pinto Jr. V.C., Carvalho Jr., W., Barroso, H. B., Mesquita, F.A., Mejia, J.A.C., Moreira, J.E.M., Cirino, C.M.F., Rocha, M.G., Branco, K.C., Maior, M.M.S., Sardenberg, R.F., Torres, J.M.S. (1999), “Cirurgia de Ross em Crianças”, *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, 14 (2), 114-20.
- Robicsek, F., Thubrikar, M.J. (1999), “Role of Sinus Wall Compliance in Aortic Leaflet Function”, *Am. J. Cardiol.*, 84, 944-946.
- Sillas, T., Costa, F.D.A., Vilani, R.O., Souza, F.P., Veiga, S.L., Dohmen, P.M., Wouk, A.F.P.F. (2008), “Cardiac Valvular Replacement in Sheep - Description of Surgical Technique and Outcome”, *Archives of Veterinary Science*, 13(1), 46-53.
- Webb, S.D., Cleland, J.L. Carpenter, J.F., Randolph, T.W. (2003), “Effects of Annealing Lyophilized and Spray-Lyophilized Formulations of Recombinant Human Interferon-Gamma”, *J. Pharm. Sci.*, 92(4), 715-729.
- Zaleske, D., Peretti, G., Allemann, F., Strongin, D., MacLean, R., Yates, K.E., Gloeacki, J. (2003), “Engineering a Joint: a Chimeric Construct with Bovine Chondrocytes in a Devitalized Chick Knee”, *Tissue Eng.*, 9(5), 949-59.

## IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF LIOPHILIZED BIOPROSTHETIC VALVE

Marina J. S. Maizato<sup>1</sup>, Sérgio A. Hayashida<sup>1</sup>, Fabio P. Taniguchi<sup>1</sup>, Olga Z. Higa<sup>2</sup>, Ronaldo N. M. Pitombo<sup>3</sup>, Idágene A. Cestari<sup>1</sup>, Adolfo A. Leirner<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bioengineering, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo (SP), Brazil

<sup>2</sup> Biotechnology Center, Energy and Nuclear Research Institute, IPEN - CNEN/SP, São Paulo (SP), Brazil

<sup>3</sup> Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, USP, São Paulo (SP), Brazil  
E-mail: marina.maizato@incor.usp.br

**Abstract.** Freeze-drying of biological tissues allows for dry storage and gamma ray sterilization, which may improve their use as medical prosthesis. **Objective** - Evaluate the rehydration characteristics and hydrodynamic performance of prosthetic valves before and after lyophilization. **Methodology** - Two bovine pericardium aortic valvular prosthesis size 23 of different manufacturers were evaluated in a pulse duplicator (80 bpm, 5 L/min, Shelhigh

*Inc., New Jersey, the USA) before and after lyophilization. Flow and transvalvular pressure gradient were registered in vitro and in vivo and images of opening and closing of the prosthesis were obtained in the pulse duplicator at a 12 frames per second. Rehydration was evaluated by comparison of dry valve weight with valve weight after 15 min, 1h, 24h, 48 h and 72h in saline solution, inside the pulse duplicator. In vivo performance was assessed by surgical implantation in young male sheep Santa Inês bred in the pulmonary position after 30 min rehydration with 0.9% saline. Transvalvular pressure gradient and flow measurements were obtained immediately after implantation and 3 months after surgery, when valves were explanted. The 3 months period of implantation is currently in progress. Results - Captured images showed a change in the profile opening and closing of valve prosthesis after lyophilization. The gradient measured (in vitro) in two valves was  $17.08 \pm 0.57$  and  $18.76 \pm 0.70$  mmHg before lyophilization and  $34.24 \pm 0.59$  and  $30.40 \pm 0.97$  mmHg after lyophilization. Rehydration of liophilized both valves was approximately 82%. Conclusion - The drying changed the profile of opening and closing of valve prostheses and increased on average by 83% the gradient in vitro tests. The result of the in vivo suggests maintaining pressure levels of the animal with the lyophilized prostheses within acceptable levels. (Financial Support - FAPESP)*

**Keywords:** *Biological valve, Hydrodynamic performance, In vivo evaluation, Liophilization*