

Efecto de las radiaciones gamma en el proceso de calcificacion de valvulas aorticas biologicas implantadas en ratas

GLORIA I. LAMAS^{1*}, EULOGIA KAIRIYAMA¹, JOSE NAVIA²

RESUMEN

Las valvulas aorticas porcinas fijadas con glutaraldehido se injertan en pacientes cuyas valvulas nativas presentan un funcionamiento deficiente. Sin embargo, la calcificacion es uno de los factores mas importantes de deterioro valvular en el largo plazo. La radiation gamma actua cortando al azar los enlaces de glutaraldehido. Como consecuencia de la irradiación, las fibras polimericas proteicas que constituyen el tejido valvular tambien son cortadas, constituyendo zonas desorganizadas de fibras de colageno. De acuerdo con la literatura existente, las fibras de colageno presentes en el tejido actuarían como un nucleador pasivo de sales en donde se precipitarían las sales de fosfato de calcio. Estos depósitos fueron descriptos en asociación con sitios desintegrados de fibras proteicas, los que podrían favorecer la formación de nuevos sitios donde las sales de calcio podrían depositarse. Debido a que la irradiation es una tecnica utilizada para la esterilización de valvulas aorticas porcinas, el objetivo del trabajo fue el de estudiar el efecto de distintas dosis de irradiation gamma sobre el proceso de calcificacion de valvulas implantadas subcutaneamente en ratas de la cepa Wistar. Las valvulas aorticas porcinas fijadas en glutaraldehido se sometieron a distintas dosis de irradiation gamma en una fuente de ⁶⁰Co y luego se cortaron en piezas pequenas, que se implantaron en ratas. Para valorar el grado de calcificacion se emplearon dos metodos: a) observación en placas radiograficas de rayos X y b) cuantificación por espectrofotometria de absorción atómica. En las condiciones y dosis de irradiación en las que se realizaron las experiencias, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de calcio entre las valvulas controles y las irradiadas, por lo que se concluye que con las dosis utilizadas en el presente trabajo la radiation gamma no modifica el proceso de calcificacion. REV ARGENT CARDIOL 2000; 68: 263-269.

Palabras clave Radiation gamma - Valvula cardiaca - Calcification

INTRODUCCION

Las valvulas aorticas porcinas fijadas con glutaraldehido se injertan en pacientes cuyas valvulas nativas presentan un funcionamiento deficiente. (1) Esta practica se viene desarrollando con singular éxito desde 1960. Estas valvulas presentan un excelente funcionamiento hemodinamico, una tasa baja de tromboembolia en pacientes sin anticoagulantes y

una reduction de la respuesta inmune, entre otras características. (2)

Sin embargo, con el aumento de la frecuencia de implantes y la disponibilidad de information sobre ellos en el largo plazo, se ha observado que el tejido valvular presenta una funcionalidad limitada a causa de los enlaces de glutaraldehido entre las fibras polimericas proteicas y la mineralización del tejido.

¹ Grupo de Aplicaciones Biologicas, Unidad de Actividad Ciencias de la Salud, Centro Atomico Ezeiza, Comision Nacional de Energia Atomica

² Servicio de Cirugia Cardiovascular, Hospital Italiano, Buenos Aires

† Becaria de la Comision Nacional de Energia Atomica

Trabajo recibido para su publicacion: 9/99 Aceptado: 3/2000

Dirección para separatas: Gloria I. Lamas - Centro Atomico Ezeiza, Calle Juan Gonzalez y Aragon 15 - (1804) Ezeiza, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Tel.: 4379-8237 - Fax: 4379-8583 - [E-mail: lamas@cae.cnea.gov.ar](mailto:lamas@cae.cnea.gov.ar)

(3, 4) Debido a que la radiación gamma actúa cortando al azar los enlaces de glutaraldehído, se ha propuesto que esta interacción disminuye la rigidez inicial de la bioprotésis, prolongando su vida útil en el tiempo.

Como consecuencia de esta aplicación, las fibras poliméricas proteicas que constituyen el tejido valvular también son cortadas, constituyendo zonas desorganizadas de fibras de colágeno. De acuerdo con la literatura existente, las fibras de colágeno presentes en el tejido actuarían como un nucleador pasivo de sales, en donde se precipitarían las sales de fosfato de calcio. (2) Estos depósitos se describieron en asociación con sitios desintegrados de fibras proteicas. (5) Las rupturas en las fibras podrían favorecer la formación de nuevos sitios donde las sales de calcio se depositarían.

La calcificación es uno de los factores más importantes de deterioro tisular en el largo plazo. (6-8) Las evidencias clínicoquirúrgicas sugieren que la mineralización es más frecuente y comienza antes en niños que en adultos, debido a un mayor metabolismo de calcio durante el crecimiento. (2) La frecuencia de fallas valvulares debidas a la calcificación es del orden del 10% a los 10 años en adultos mayores de 60 años y del 50% a los 5 años en niños y jóvenes. (9)

Muchos estudios se han realizado en pos de dilucidar los mecanismos de calcificación de las válvulas implantadas, los sitios de su iniciación y sus causas, así como para desarrollar métodos de anticalcificación. Las técnicas recientes de anticalcificación se basan sobre agentes químicos capaces de inhibir o alterar el proceso de mineralización de una bioprotésis *in vivo*. Tales serían los casos de BiLix[®], No-React[®] y AOA[®], entre otros. (7, 10, 11)

En el presente trabajo, el objetivo fue el de estudiar el efecto de distintas dosis de radiación gamma sobre el proceso de calcificación en válvulas aórticas porcinas fijadas con glutaraldehído, implantadas subcutáneamente en ratas de la cepa Wistar.

MATERIAL Y METODOS

El tejido biológico fijado con glutaraldehído presenta calcificación en el corto plazo cuando se implanta subcutánea o intramuscularmente en el abdomen de ratas. (2, 8, 12) Debido a esto se utilizaron 20 ratas Wistar como modelo de un sistema de mineralización *in vivo*.

Se cortaron piezas pequeñas, de 0,5 cm por 0,5 cm, de válvulas aórticas porcinas fijadas en glutaraldehído, de las que 60 se separaron para control y otras 60 se irradiaron con distintas dosis: 25, 30 y 40 kGy a una velocidad de dosis de 0,087 kGy/min, en una fuente de ⁶⁰Co perteneciente a la Planta de Irradiación Semi Industrial ubicada en el Centro Atómico Ezeiza. Las piezas se irradiaron y mantuvie-

ron hasta el momento del implante en su solución original de glutaraldehído al 0,55% a temperatura ambiente. Las dosis se verificaron con dosímetros nitrato/nitrito de potasio para dosis altas. (13)

La dosis absorbida es la cantidad de energía de radiación ionizante entregada por unidad de masa de un material determinado. La unidad de dosis es el gray (Gy), donde 1 gray es equivalente a la absorción de 1 Joule/kg. La relación matemática es el cociente aE/am, aE es la cantidad de energía entregada por la radiación ionizante a un lm de masa de materia de un material determinado. La velocidad de dosis es la energía absorbida por la unidad de masa en la unidad de tiempo. (14)

Tanto las piezas control como las irradiadas se implantaron asepticamente en forma subcutánea en ratas macho de la cepa Wistar de dos meses de vida. Se implantaron en cada animal tres muestras irradiadas con la misma dosis y sus respectivos controles, en un total de 20 animales. Inmediatamente previo a la implantación de las piezas estas se lavaron en solución fisiológica estéril.

Los animales fueron alojados, para un mejor manejo de ellos, en grupos de cinco ratas por jaula con provisión de agua y alimento adecuado, manteniéndolos en condiciones ambientales apropiadas para el desarrollo de la especie.

El grado de calcificación presente en el tejido implantado se estudió por dos métodos: a) observación en placas radiográficas de rayos X y b) cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica.

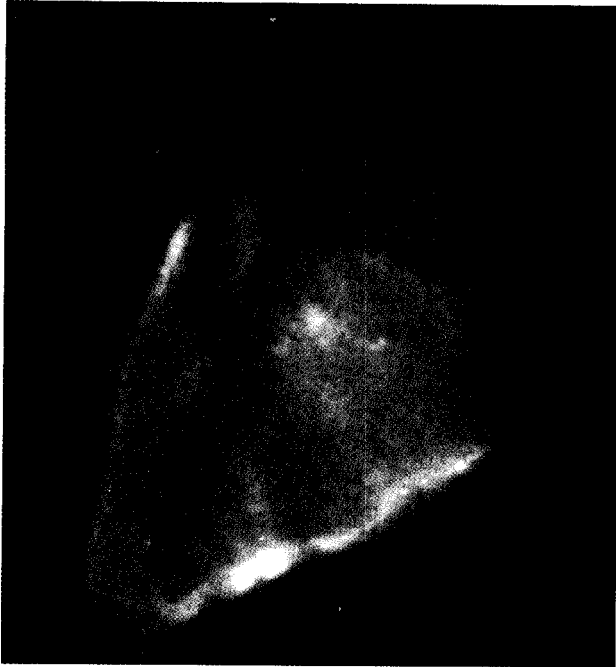
Luego de distintos períodos de implantación (30, 60 y 90 días) se extrajeron las piezas: 2 muestras (control e irradiada) a los 30 días, otras 2 a los 60 días y las 2 últimas del mismo animal a los 90 días. Se radiografiaron de inmediato (Mammomat C3 de Siemens) y se liofilizaron. A causa de experiencias futuras que se han de realizar con las piezas controles e irradiadas, solamente se emplearon 77 de las 120 piezas implantadas, las que fueron tratadas con HC16N a 78°C durante 96 horas. (2) El calcio se midió en el extracto ácido por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer 2385). Los extractores controles para la calibración del equipo se prepararon a partir de piezas de válvulas aórticas porcinas fijadas con glutaraldehído no implantadas, las cuales se procesaron de la misma manera que las muestras implantadas.

Análisis de datos

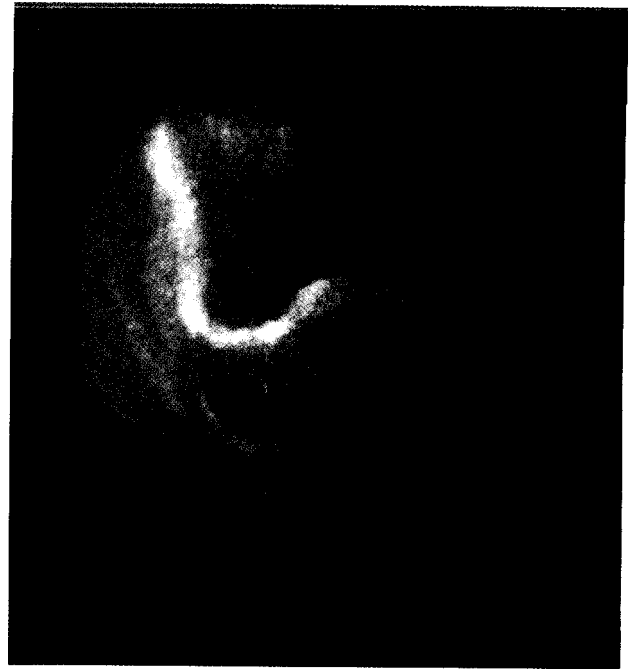
Los datos se expresan como media \pm desvío estándar y se analizaron con la prueba de la t de Student, considerándose significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

El material irradiado y los controles fueron bien



Panel A



Panel B

Fig. 1. Radiografías de piezas implantadas en forma subcutánea en el abdomen de ratas durante 30 días. Panel A: pieza control ($n = 6$). Panel B: pieza irradiada con 25 kGy ($n = 8$).

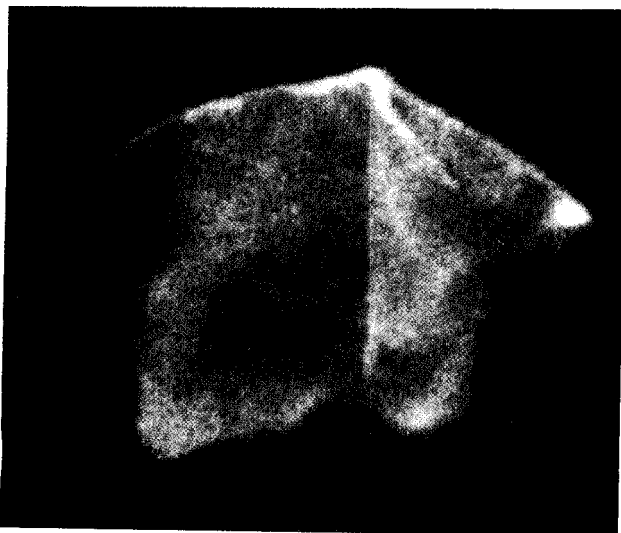
tolerados por las ratas, ya que estas aparentemente no presentaron procesos inflamatorios ni rechazo del tejido heterólogo.

Todas las piezas implantadas se extrajeron y radiografiaron en toda su superficie. El material de mineralización aparece como incrustaciones blancas y opacas en la placa radiográfica.

La Figura 1 muestra, en la placa radiográfica, una

pieza control (panel A) y una irradiada con 25 kGy (panel B), respectivamente, ambos implantados por 30 días. En ellas los depósitos de calcio se presentan sobre uno o dos de los cuatro bordes de las piezas.

La Figura 2 muestra radiografías de una pieza control (panel A) y una irradiada con 25 kGy (panel B), después de 60 días de implantadas. A este tiempo, en ambos paneles se observa el material de mi-



Panel A

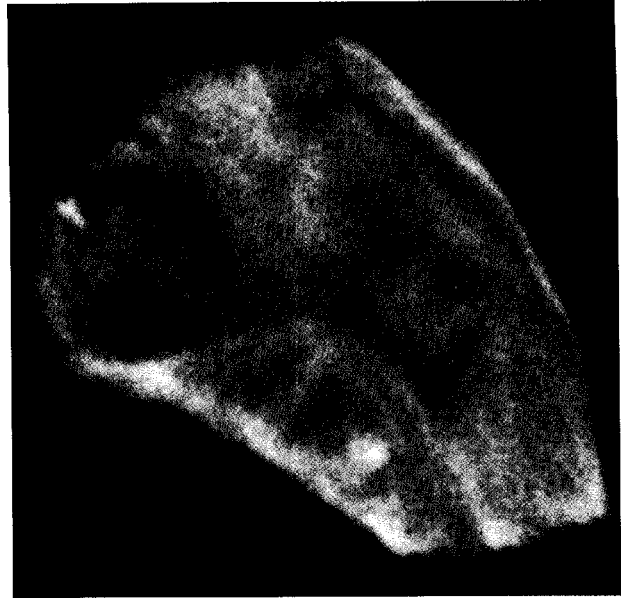


Panel B

Fig. 2. Radiografías de piezas implantadas en forma subcutánea en el abdomen de ratas durante 60 días. Panel A: pieza control ($n = 6$). Panel B: pieza irradiada con 25 kGy ($n = 5$).



Panel A



Panel B

Fig. 3. Radiografías de piezas implantadas en forma subcutánea en el abdomen de ratas durante 90 días. Panel A: pieza control (n = 8). Panel B: pieza irradiada con 25 kGy (n = 7).

neralización en bordes que a los 30 días (Figura 1) no estaban mineralizados. Paralelamente, se observa un aumento de la calcificación respecto de aquellas zonas que estaban mineralizadas a los 30 días. Se observa, también, que la mineralización comienza a extenderse por la superficie de las piezas.

A los 90 días de implantadas las muestras (Figura 3, paneles A y B), tanto el tejido control como el irradiado presentan el mayor grado de calcificación con respecto a los grupos anteriores. El material de mineralización se deposita en los bordes y en la superficie de las piezas control e irradiadas.

No se observaron diferencias radiográficas en

cuanto a la secuencia de deposición del material de calcificación entre piezas controles, así como en las piezas irradiadas con distintas dosis, e implantadas durante el mismo periodo.

La Figura 4 muestra la concentración de calcio en muestras irradiadas con 25 kGy y sus respectivos controles, implantadas durante 30, 60 y 90 días. Los valores de la cuantificación del calcio (expresados como mg de calcio por gramo de peso seco) fueron: en el tejido irradiado a los 30 días $88,7 \pm 19,0$, a los 60 días $177,4 \pm 23,0$, y a 90 días $182,0 \pm 23,0$; en el tejido control a los 30 días $94,8 \pm 29,0$, a los 60 días $141,0 \pm 24,0$, y a los 90 días $171,5 \pm 29,0$. Se observa

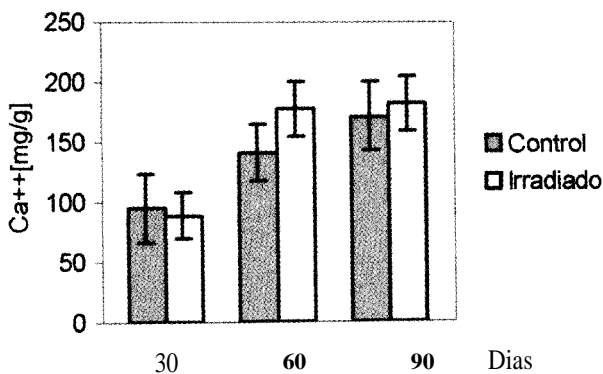


Fig. 4. Cuantificación de calcio en piezas control (30 días, n = 6; 60 días, n = 6; 90 días, n = 8) y piezas irradiadas con 25 kGy (30 días, n = 8; 60 días, n = 5; 90 días, n = 7) luego de haber sido implantadas en forma subcutánea en el abdomen de ratas.

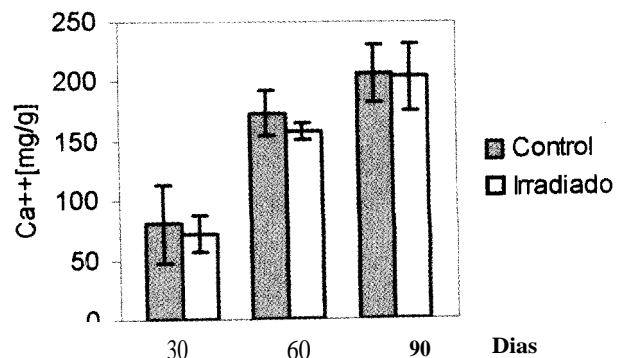


Fig. 5. Cuantificación de calcio en piezas control (30 días, n = 5; 60 días, n = 5; 90 días, n = 4) y piezas irradiadas con 40 kGy (30 días, n = 5; 60 días, n = 5; 90 días, n = 4) luego de haber sido implantadas en forma subcutánea en el abdomen de ratas.

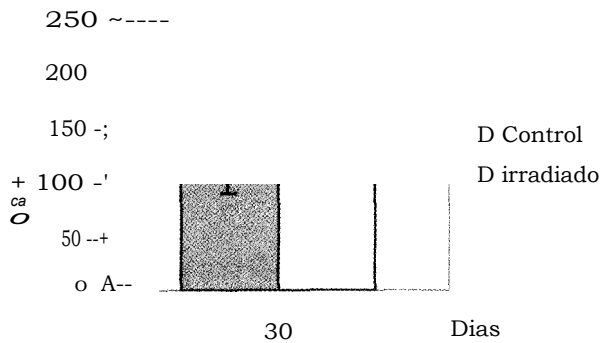


Fig. 6. Cuantificación de calcio en piezas control (30 días, n = 4) y piezas irradiadas con 30 kGy (30 días, n = 5) luego de haber sido implantadas en forma subcutánea en el abdomen de ratas.

que a los distintos tiempos de implantación de las piezas no hay diferencias significativas entre las muestras irradiadas con 25 kGy y sus controles.

En la Figura 5 se presentan los valores que se obtuvieron de la cuantificación del calcio en muestras irradiadas con 40 kGy y sus controles no irradiados; ambos tipos de piezas implantadas durante 30, 60 y 90 días. Los valores de cuantificación de calcio (expresados como mg de calcio por gramo de peso seco) en el tejido irradiado fueron: a los 30 días $72,0 \pm 16,0$, a los 60 días $157,8 \pm 7,0$, y a los 90 días $203,5 \pm 28,0$. Mientras que los valores de sus respectivos controles fueron: $80,4 \pm 33,0$, $173,2 \pm 19,0$ y $206,0 \pm 24,0$. La concentración de calcio en el tejido no presenta diferencias significativas entre las muestras tratadas con 40 kGy y sus controles en los distintos periodos de implantación.

En las Figuras 4 y 5 se evidencia un aumento del nivel de calcificación proporcional al tiempo, tanto en el tejido irradiado como en el no irradiado.

Se obtuvieron evidencias en placas radiográficas y cuantificación del calcio en muestras irradiadas con 30 kGy e implantadas durante 30 días. Esto se debió a la mortalidad de los animales. La cuantificación se expone en la Figura 6, en la que se muestra que no hay diferencias significativas entre las muestras irradiadas con 30 kGy y sus controles, cuyos valores de calcio (expresados como mg de calcio por gramo de peso seco) fueron: $116,6 \pm 14,0$ y $121,3 \pm 34,0$, respectivamente.

DISCUSION

La calcificación es un factor de deterioro valvular importante en el largo plazo cuyo mecanismo todavía no está dilucidado totalmente. (7,9) El principal síntoma del deterioro tisular primario es la regurgitación aórtica por ruptura valvar protésica, que además puede combinarse con insuficiencia y estenosis valvulares.

Numerosos factores se relacionan entre sí y desempeñan un papel importante en el proceso de cal-

cificación. Los resultados de este estudio muestran que la aplicación de las radiaciones gamma, en el tejido valvular previamente tratado con glutaraldehído, no favorece el aumento de la calcificación en las condiciones de irradiación con las que se trabajó. El tejido irradiado con 25,30 y 40 kGy e implantado subcutáneamente en el sistema de mineralización *in vivo* utilizado, presentó calcificación a los 30, 60 y 90 días. El tejido control no irradiado e implantado durante los mismos periodos, también presentó mineralización. Los valores de la cuantificación del calcio fueron similares entre el tejido irradiado y el no irradiado.

No debemos ignorar los cambios biológicos y físicos que las diferentes técnicas originan en las bioprotésis al ser tratadas para su acondicionamiento y posterior utilización en pacientes. (15, 16) Gibbons y Alladine (17) examinaron válvulas irradiadas por técnicas histológicas, mostrando que el tejido irradiado con 40 kGy no presentaba alteraciones en su estructura histológica y su apariencia macroscópica permanecía sin cambios. El tejido irradiado en seco con 50 kGy o más, no mostraba cambios visibles en el tejido, mientras que si la irradiación se realizaba en medio líquido, algunas fibras de colágeno se cortaban. Por otro lado, estudiaron *post mortem* válvulas irradiadas en pacientes que habían fallecido por causas ajenas a fallas de la válvula implantada y observaron infiltración de fibroblastos y formación de tejido endotelial. Más tarde, Donnelly y colaboradores (16) compararon distintas técnicas con la irradiación de válvulas cardíacas con una dosis de 25 kGy y a 4°C de temperatura. Las fibras de colágeno de estas válvulas fueron morfológicamente similares a las de los controles normales no tratados, sin que presentarían cambios ultraestructurales al microscopio electrónico. Se implantaron en pacientes válvulas irradiadas en esas condiciones por un lapso mayor de 3 años.

Estos autores tienen en común que en ninguno de los trabajos mencionados cuantificaron los depósitos de calcio. En nuestro trabajo estudiamos y cuantificamos la calcificación en el tejido valvular porcino, previamente fijado con glutaraldehído e irradiado con radiación gamma e implantado subcutáneamente en ratas.

El glutaraldehído produce entrecruzamiento entre las fibras de colágeno valvular y de estas con otras proteínas extracelulares, restringiendo significativamente el movimiento relativo de las fibras de colágeno, que así da por resultado una estructura fija más compacta que la estructura del tejido valvular fresco. (18) La radiación gamma interacciona con el tejido valvular y el medio líquido en que se encuentra la válvula, produciendo rupturas, polimerizaciones y radicales libres. (19, 20) Los radicales que se

originan como producto de radiolisis del agua (e_a^- y OH^\cdot , H^\cdot entre otros) son altamente reactivos (19, 20) e interaccionarian por efecto indirecto (21) con el glutaraldehido y con algunos de los grupos libres de las fibras de colageno, entre ellos, hidroxilisina, hidroxiprolina, uniones disulfuro, galactosa, glucosa, (22) siendo las velocidades de reaccion de los radicales libres (expresadas en dm^3/Mol por segundo) e_a^- y H^\cdot con el grupo aldehido: $3,5 \times 10^7$ y 3×10^7 ; radicales libres e_a^- , OH^\cdot y H^\cdot con union disulfuro 10^{10} , 10^9 , 10^{10} y con hidroxilisina 10^9 , 10^1 , 10^5 , respectivamente. (19) La radiacion gamma actuaría principalmente por efecto directo sobre el tejido valvular y la acción indirecta estaría minimizada debido a la estructura compleja y compacta del tejido valvular fijado.

En las condiciones y dosis de irradiación en las que se realizaron las experiencias no se encontraron diferencias significativas en los niveles de calcio entre muestras irradiadas y controles. Es sabido que el método de preparación y las condiciones de almacenamiento de las bioprotesis es de gran importancia y puede determinar la longevidad funcional y estructural de la válvula, así como favorecer su calcificación. Experiencias futuras serían necesarias para determinar el método de procesamiento y posterior almacenamiento de las válvulas que se correspondan con la aplicación de la radiación gamma utilizada para disminuir los niveles de calcificación del tejido.

Así como la preservación y la estabilidad de la estructura de las válvulas son de gran importancia, la esterilización del tejido también lo es. (23) Las válvulas biológicas cardíacas se pueden esterilizar y almacenar por diversos métodos. La esterilización química con (3-propiolactona u óxido de etileno y posterior almacenamiento en un *freezer* se ha impulsado en 1965, pero los resultados clínicos que se obtuvieron utilizando válvulas tratadas por estos métodos fueron insatisfactorios. (16) Otros investigadores utilizaron antibióticos donde se coloca la válvula, sugiriendo que podrían ser tóxicos para el tejido valvular protésico. (24)

La esterilización por medio de la aplicación gamma posee varias ventajas sobre otros métodos. (23, 25) Para garantizar la esterilidad y la compatibilidad de la radiación con el material, el proceso de esterilización se valida basándose sobre normas internacionales, en particular Norma ISO, (26,27) para aplicar la dosis mínima necesaria para alcanzar un coeficiente de seguridad de esterilidad 10^{-6} .

Estas dosis y las condiciones de irradiación tienen que estar en concordancia con la dosis necesaria para disminuir la rigidez, esterilizar y mejorar la funcionalidad valvular del tejido fijado, sin deteriorar la ultraestructura del tejido irradiado ni alterar sus propiedades físicas. El presente trabajo muestra

que con las dosis de esterilización utilizadas, la radiación gamma no modifica el proceso de calcificación. De esta manera, la radiación gamma en válvulas podría aportar una nueva forma de procesamiento del tejido.

SUMMARY

GAMMA RADIATION AND ITS ROLE IN BIOPROSTHETIC AORTIC VALVES IMPLANTED IN RAT HEARTS

Porcine heart valves glutaraldehyde fixed are implanted in patients with valvular deterioration. Mineralization may be the major factor in the long-term failure of tissue bioprosthesis.

Gamma radiation randomly breaks some glutaraldehyde cross-links. As a consequence of irradiation, the polymeric fibers belonging to the valvular tissue are broken too, leading to sites of collagen fiber disorganization. It is well known that the collagen fibers may act as a passive nucleator of salts where the calcium phosphate salts precipitate. These salt concentration has been described in association with desintegrated sites of protein fiber, which may favour new sites where the calcium salts would be deposit. The irradiation process is a technique used for sterilization of porcine heart valve. The main objective of this work was to study the effect of different doses of gamma radiation on the calcification process of subcutaneously implanted valves in rats.

Small pieces from glutaraldehyde fixed valves, irradiated to different doses with a ^{60}Co source were implanted subcutaneously in rats. The calcium was measured by X-ray and atomic absorption spectrophotometry.

In our experimental conditions and at the radiation doses used in these tests, the calcium measurements on control and irradiated material were not significantly different. We conclude that, at the employed doses, the gamma radiation does not alter the process.

Key words Gamma radiation - Heart valve - Calcification

Agradecimientos

Se agradece la colaboración en la realización del presente trabajo a los integrantes del Laboratorio de Dosimetría de Altas Dosis, de la Planta de Irradiación Semi Industrial, del Bioterio y del Laboratorio de Química Analítica del Centro Atómico Ezeiza, así como a los integrantes de la Unidad de Medicina Experimental y del Servicio de Diagnóstico por Imágenes: Ecografías-Mamografías del Hospital Italiano de Buenos Aires.

BIBLIOGRAFIA

1. Vrandecien M, Gontijo B, Fantini F y col. Stentless heart valve concept: New anticalcificant tissue tanning prelini-

- cal trial. *En:* Piwnica, Westaby (eds). Stentless bioprostheses. Hong Kong, China, Duh Hua Printing Press Co Ltd 1995; pp 93-99.
2. Lentz D, Pollock E, Olsen D y col. Inhibition of mineralization of glutaraldehyde fixed Hancock bioprosthetic heart valves. *En:* Color L, Gallucci V (eds). Cardiac bioprostheses. Yorke Medical Books Press 1982; pp 306-319.
 3. Girardot M, Torrianni M, Dillehay D y col. Role of glutaraldehyde in calcification of porcine heart valves: Comparing cusp and wall. *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 793-801.
 4. Cheung D, Perelman N, Ko E y col. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde. III. Reaction with collagen tissues. *Connet Tiss Res* 1985; 13: 109-115.
 5. Deck J, Thubrikar M, Nolan S y col. Role of medical stress in calcification of bioprostheses. *En:* Cohn L, Gallucci V (eds). Cardiac bioprostheses. Yorke Medical Books Press 1982; pp 293-305.
 6. Milano A, Bortolotti U, Talenti E y col. Calcific degeneration as the main cause of porcine bioprosthetic valve failure. *Am J Cardiol* 1984; 53:1066-1070.
 7. Schoen F, Levy R. Pathology of substitute heart valves: New concepts and developments. *J Card Surg* 1994; 9 (Suppl): 222-227.
 8. Mako W, Vesely I. In vivo and in vitro models of calcification in porcine aortic valve cusps. *J Heart Valve Dis* 1997; 6: 316-323.
 9. Carpentier A, Nashref A, Carpentier S y col. Prevention of tissue valve calcification by chemical techniques. *En:* Cohn L, Gallucci V (eds). Cardiac bioprostheses. Yorke Medical Books Press 1982; pp 320-327.
 10. Walther T, Gilnther B, Diegeler A y col. Anticalcification treatments for stentless bioprostheses. *En:* Huysmans H, Westaby S (eds). Stentless bioprostheses (2nd ed). Oxford, Reino Unido, Isis Medical Media Press 1999; pp 235-240.
 11. Hirsch D, Drader J, Thomas T y col. Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate: Preincubation and controlled release studies. *J Biomed Mater Res* 1993; 27:1477-1484.
 12. Walther T, Falk V, Autschbach R y col. Comparison of different anticalcification treatments for stentless bioprostheses. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: S249-254.
 13. Dorda E, Muioz S. Dosímetro de nitrato/nitrito de potasio para altas dosis. Proceeding of an international symposium on high-dose dosimetry 1985; pp 193-202.
 14. ASTM Subcommittee E10.01. Standard terminology pertaining to radiation measurements and dosimetry (draft). *En:* ASTM (ed). Dosimetry for radiation processing, progress report 47. ASTM press 1999; pp 71-81.
 15. Welch W. A comparative study of different methods of processing aortic homografts. *Thorax* 1969; 24: 746-749.
 16. Donnelly R, Aparicio S, Dexter P y col. Gamma radiation of heart valves at 4°C; a comparative study using techniques of histochemistry and electron and light microscopy. *Thorax* 1973; 28: 95-101.
 17. Gibbons J, Alladine F. Homograft heart valve replacements. Report on 110 consecutive replacements using gamma irradiated grafts. *En:* International Atomic Energy Agency. Sterilization and preservation of biological tissue by ionizing radiation. Viena, Austria, International Atomic Energy Agency 1970; pp 95-105.
 18. Simic M. Radiation chemistry of water-soluble food components. *En:* Josephson E, Peterson M (eds). Preservation of food by ionizing radiation, Vol II. Boca Raton, CRC Press 1983; pp 1-73.
 19. Von Sonntag C. Amino acids, oligopeptides and proteins. *En:* Von Sonntag C. The chemical basis of radiation biology. London, Great Britain, Taylor & Francis Ltd 1987; pp 394-428.
 20. Hilbert S, Barrick M, Ferrans V. Porcine aortic valve bioprostheses: A morphologic comparison of the effects of fixation pressure. *J Biomed Mater Res* 1990; 24: 773-787.
 21. Lower R, Pillsbury C, Angell W y col. Homograft heart valves. *Circulation* 1966; 33:135-139.
 22. Diehl J. Radiolytic effects in foods. *En:* Josephson E, Peterson M (eds). Preservation of food by ionizing radiation, Vol I. Boca Raton, CRC Press 1983; pp 279-357.
 23. Lisenmayer T. What is extracellular matrix? *En:* Hay E (ed). Cell biology of extracellular matrix (2nd ed). New York, Plenum Press 1991; pp 7-44.
 24. Gibbon J, Alladine F. Gamma ray sterilization of homograft aortic valves. *En:* International Atomic Energy Agency. Radiosterilization of medical products. Viena, Austria, International Atomic Energy Agency 1967; pp 181-186.
 25. Gibbon J, Alladine F. Gamma ray sterilization of Starr-Edwards heart valve prostheses. *En:* International Atomic Energy Agency. Radiosterilization of medical products. Viena, Austria, International Atomic Energy Agency 1967; pp 289-294.
 26. Technical Committee ISO/TC 198, Sterilization of health care products. International Organization Standardization (ISO) ISO 11137, Sterilization of health care products - Requirements for validation and routine control - Radiation sterilization. *En:* ISO (ed). ISO 11137. Ginebra, Suiza, ISO Press 1995.
 27. Technical Committee ISO/TC 198, Sterilization of health care products. International Standardization (ISO) ISO/TR 13409, Sterilization of health care products - Radiation sterilization - Substantiation of 25 kGy as a sterilization dose for small of infrequent production batches. *En:* ISO (ed). ISO/TR 13409. Ginebra, Suiza, ISO Press 1996.