

Influencia del tratamiento químico con cloroformo/metanol en el comportamiento elástico del pericardio de ternera utilizado en la construcción de bioprótesis cardiacas

GARCÍA PÁEZ J.M.¹, JORGE HERRERO E.¹, CARRERA SANMARTIN A.², GARCÍA SESTAFE J.V.³,
CORDON A.², CALERO P.¹, CASTILLO-OLIVARES J.L.¹

¹Servicio de Cirugía Experimental, Unidad de Biomateriales, Clínica Puerta de Hierro

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Universidad Politécnica Madrid

³Universidad Nacional a Distancia.

Resumen

Se estudia el comportamiento mecánico del pericardio de ternera utilizado en la construcción de bioprótesis cardiacas cuando se trata químicamente cloroformo/metanol (CM) comparándolo con tratamiento estándar con glutaraldehído (G). Se ensayan a tracción hasta rotura 40 probetas, veinte con cada tratamiento y de estas el 50% suturadas en su parte central con seda 4/0. La pérdida de resistencia media a la rotura de las probetas suturadas fue de alrededor de 6 MPa sin encontrar diferencias entre el tipo de tratamiento utilizado. No obstante en el análisis de las curvas promedio estrés/deformación para valores de estrés a tracción inferiores a 2.5 MPa, apenas encontramos diferencias entre las series suturadas y no suturadas tratadas con cloroformo/metanol anulando parcialmente el efecto deletéreo de la sutura en ese rango de estrés que incluye el estrés estimado de trabajo, de 0.25MPa. El tratamiento con cloroformo/metanol podría, además de retrasar los procesos de calcificación del pericardio, mejorar el comportamiento elástico de las probetas suturadas disminuyendo la interacción con la sutura. Ensayos de fatiga real con este tratamiento químico deberán ser realizados para verificar esta hipótesis.

Palabras clave: pericardio de ternera, tratamiento químico, clorometanol, resistencia mecánica.

Introducción

Calcificación¹⁻⁴, fracaso mecánico⁵⁻⁹, o ambos¹⁰⁻¹¹, son las causas conocidas de fallo de las bioprótesis cardiacas fabricadas con pericardio de ternera tratado químicamente con glutaraldehído. No obstante, la interacción entre estos dos procesos esta escasamente definida. La reducción o supresión del desarrollo de la calcificación por medio de tratamientos químicos que previenen la calcificación del biomaterial ha sido objeto de nume-

rosos estudios, pero una solución satisfactoria a este grave problema no ha sido aún encontrada. Por otra parte parece que el tejido pericárdico es incapaz de soportar el estrés mecánico cuando este se ejerce durante largo tiempo, aspecto éste último de crucial importancia cuando se emplea en la construcción de bioprótesis cardiacas cuya misión es la de mantenerse normofuncionantes el mayor tiempo posible.

En publicaciones previas de nuestro grupo^{3,12,14} y de otros autores^{13,15} se definen estrategias para disminuir la influencia de ciertos componentes estructurales químicos del tejido, como son los fosfolípidos, que están directamente implicados en la calcificación de los tejidos. Tratamientos con disolventes orgánicos como cloroformo/metanol o detergentes como el dodecil sulfato sódico son

Correspondencia:

J.M. García Páez, Servicio de Medicina Preventiva,
Clínica Puerta de Hierro.

C/San Martín de Porres nº 2 Madrid 28035.

E-mail: ejorge@hpth.insalud.es

eficaces para eliminar lípidos del tejido y para prevenir o retrasar el depósito de calcio de los biomateriales utilizados en la construcción de velos de bioprótesis cardiacas(pericardio de ternera o tejido porcino). El uso de estas sustancias afecta la estabilidad de los tejidos. Sin embargo teniendo en cuenta que estas sustancias se emplean para prótesis implantables dentro del torrente circulatorio, es necesario conocer su resistencia mecánica al estrés y el riesgo de calcificación. Por ello, el objetivo buscado y que es necesario garantizar, para cualquier tratamiento químico de entrecruzamiento ó anticalcificante, es que el comportamiento visco-elástico del biomaterial sea igual o mejor que el observado con el tratamiento estándar con glutaraldehído.

El objetivo de este trabajo es comprobar si con un tratamiento químico anticalcificante con cloroformo/metanol se mantienen o mejoran las propiedades mecánicas elásticas del biomaterial, mediante un ensayo de tracción, comparando los resultados con los de un tratamiento estándar con glutaraldehído.

Material y métodos

Se utilizó pericardio de ternera obtenido de reses jóvenes sacrificadas en un matadero local y transportado en suero salino isotónico helado (0.15 M cloruro sódico). Cada tejido fue cuidadosamente limpiado retirándose la grasa y seleccionando inicialmente solo aquellos sacos de pericardio con un excelente aspecto y sin ninguna lesión macroscópica. Cada saco pericárdico se abrió dejando los ligamentos diafragmáticos en el centro y el ligamento esternopericárdico en la circunferencia. Abierto de esa forma se obtuvieron los especímenes para ensayo, con dimensiones de 12x2 cm. Para medir el espesor se utilizó un micrómetro Mitutoyo (Elecount serieE.A33/8) que tiene una precisión a 20° C de +/- 3 micras. Las mediciones se realizaron cada 0.5cm. Las muestras de pericardio que tenían alguna medición menor de 0.3 mm o mayor de 0.7 mm, fueron rechazadas.

Las muestras se dividieron en dos grupos diferentes de acuerdo con el tratamiento químico recibido: Grupo de control (G) fue tratado durante 24 horas con glutaraldehído al 0.625 % en tampón fosfato 0.1 M de fosfato(pH 7.4) en una proporción de 1:50 (p/v); Grupo Tratamiento, con cloroformo/metanol(CM) el tejido se trató con CM 1:4 (v/v)durante 2 horas en una proporción de 1:30 (p/v) seguido de un tratamiento similar en el grupo de control (G).

Tratamiento	Nº Probetas	Sutura
G	10	No sutura
G _s	10	Seda 4/0
CM	10	No sutura
CM _s	10	Seda 4/0

G: grupo control; CM: Cloroformo/metanol; _s:series suturadas.

Tabla 1. Series de ensayos.

Se ensayaron al esfuerzo de tracción, 40 muestras de pericardio de ternera tomadas aleatoriamente y cortadas como se describió previamente. Veinte muestras recibieron el primer tratamiento químico como grupo control(G) y diez de estas probetas (50%) se cortaron en su parte media de forma perpendicular a su máxima longitud, para ser luego suturadas, previamente al ensayo, con seda 4/0, multifilamento (Lorca Marin Inc). Las restantes veinte muestras recibieron tratamiento químico con cloroformo/metanol (CM) y de ellas diez también fueron cortadas en su parte media de forma perpendicular a máxima longitud y suturadas de igual manera e hilo que las anteriores para su puesta en ensayo. Se realizaron cuatro series de ensayo (tabla 1).

Todas las muestras se ensayaron al esfuerzo de tracción hasta la rotura, realizándose estos ensayos en una maquina INSTRON TTG4. (Instron Id, High, Wycombe, Buck, England),que registra el estrés de tracción y la deformación . Las muestras se sujetaron mediante mordazas (figura 1) para el ensayo dejando una luz libre de 50 mm. El registro gráfico de la maquina proporcionó el diagrama car-

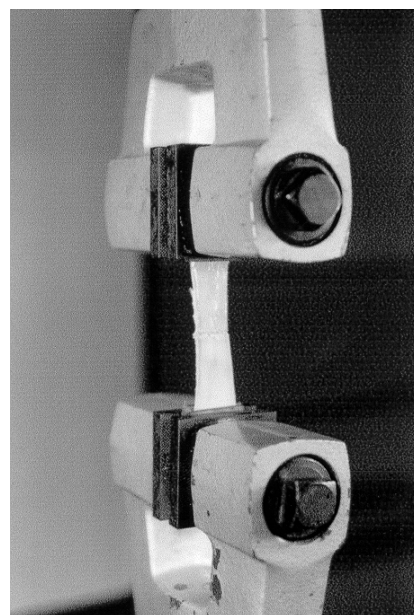


Figura 1. Vista parcial de las mordazas de la maquina Instron ensayando a tracción una muestra de pericardio.

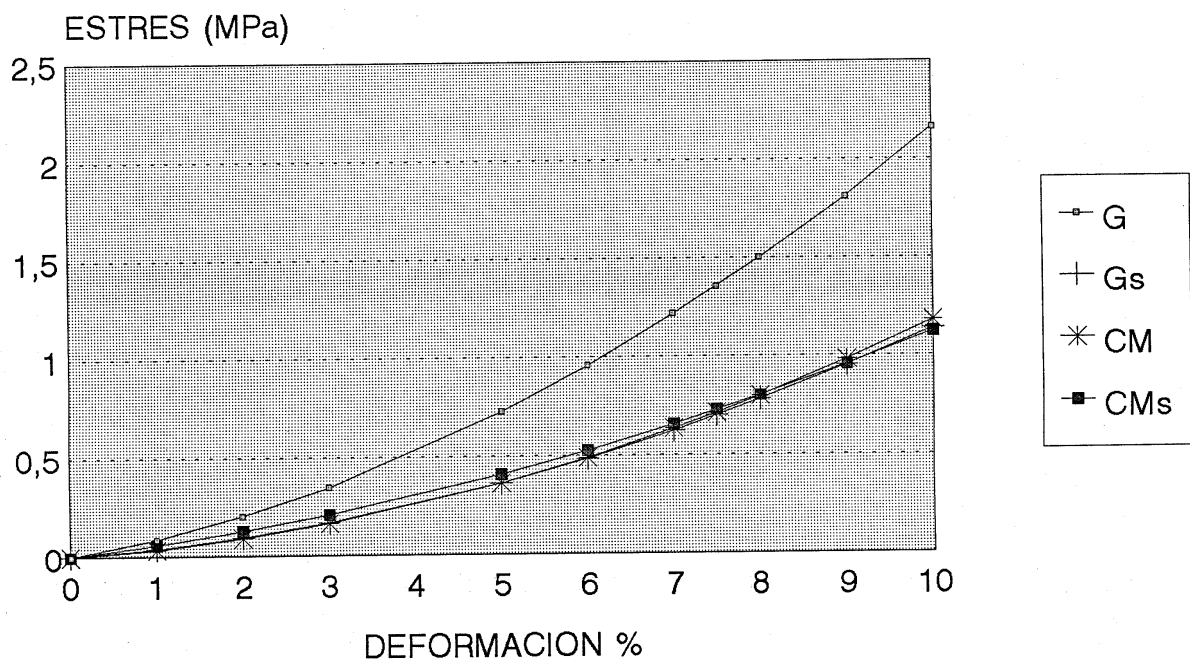


Figura 2. Curvas de estrés/deformación de los valores medios de cada serie: Control (G), Control suturado Gs, Cloroformo/metanol (CM) y cloroformo/metanol suturado (CMs).

ga en Kg./alargamiento, necesario para el posterior estudio y cálculo de las curvas tracción/deformación. El estrés de tracción del pericardio se calculó teniendo en cuenta su sección media.

Estudio estadístico

Se realizó estudio estadístico y análisis matemático de los resultados.

Para el análisis de los resultados a rotura se utilizó la t de Student para el constaste de las medias. Se realizó el ajuste de las funciones que establecen la relación entre el estrés aplicado en MPA (y) y la deformación producida en tanto por uno (x). Dicho ajuste fue de la forma:

$Y = ax^2 + bx$. Se obtuvo la curva promedio de cada una de las series ensayadas (figura 2).

Para la comparación de las series se analizaron las medias cuadráticas de las diferencias de las curvas promedio: cuando A, B = G, CM, Gs, CMs

Resultados

Rotura

Los resultados de los ensayos hasta la rotura de las series se expresan en la tabla 2. Para el contraste de las diferencias de los valores medios de las diversas series se utilizó la t de Student. En la comparación de las series no suturadas G y CM se acepta la igualdad de las medias 11.82 y 11.43 MPa ($f=19.4; t=.18 < t_{0.025; 19}=2.53$). De igual manera se acepta la igualdad de las medias entre las series suturada Gs y CMs, 5.53 y 5.93 MPa respectivamente ($f=20; t=.63 < t_{0.025; 20}=2.09$). No se aceptaron la igualdad entre las medias al comparar las series G y Gs ($f=10; t=2.32 > t_{0.025; 10}=2.23$) y las series CM y CMs ($f=12; t=3.85 > t_{0.025; 12}=2.18$).

Análisis matemático de las curvas estrés/deformación

Este análisis puso de manifiesto que en las muestras ensayadas al esfuerzo de tracción, las funcio-

Tabla 2 Valores medios de estrés a rotura en MPa.

Serie	Probetas	Media (MPa)	Desv.T	Des.Tc
G	10	11.824	4.737	4.993
G _s	10	5.530	1.162	1.225
CM	10	11.436	4.005	4.222
CM _s	10	5.932	1.511	1.593

Des.T.: Desviación típica.

Des.Tc: desviación típica centrada.

Tabla 3. Serie de control(G). Ajuste de la función $y= ax^2+bx$.

Probetas	a	b	R ²
1	148.398	16.055	0.992
2	224.478	1.829	0.998
3	166.687	14.631	0.996
4	247.538	7.841	0.998
5	226.560	-0.095	0.999
6	141.944	-5.002	0.998
7	106.443	11.337	0.989
8	24.643	-0.712	0.992
9	65.768	-1.453	0.996
10	82.687	28.542	0.999

y es el estrés en MPa, x la deformación en tanto por uno
R²= coeficiente de determinación

Tabla 4. Serie suturada G_s. Ajuste de la función $y= ax^2+bx$.

Probetas	a	b	R ²
1	103.470	7.293	0.996
2	81.489	-4.340	0.993
3	65.518	14.541	0.996
4	88.589	-10.511	0.977
5	56.070	-2.584	0.995
6	127.213	-10.487	0.986
7	69.910	-5.476	0.995
8	141.692	-6.609	0.995
9	31.524	9.049	0.998
10	60.437	40.307	0.998

G_s, serie tratada con glutaraldehído, tratamiento estándar y suturada; y es el estrés en MPa,
x es la deformación en tanto por uno; R² es el coeficiente de determinación.

Tabla 5. Serie CM. Ajuste de la función $y= ax^2+bx$.

Probetas	a	b	R ²
1	98.553	-13.405	0.990
2	87.854	-7.177	0.996
3	105.883	-4.963	0.997
4	15.802	-0.823	0.978
5	19.966	-5.163	0.958
6	22.242	-4.816	0.967
7	303.981	37.911	0.998
8	214.186	26.201	0.995
9	19.912	0.008	0.977
10	16.195	-0.618	0.988

CM serie tratada con cloroformo/metanol; Y es el estrés en MPa;
X es la deformación en tanto por uno; R² es el coeficiente de determinación.

Tabla 6. Serie CM_s. Ajuste de la función $y= ax^2+bx$.

Probetas	a	b	R ²
1	55.066	23.888	0.998
2	25.363	-1.142	0.990
3	42.351	-0.327	0.997
4	64.266	4.527	0.995
5	83.310	4.763	0.993
6	60.442	1.001	0.998
7	33.186	1.412	0.986
8	130.599	3.033	0.996
9	19.370	6.719	0.997
10	91.816	7.462	0.998

CM_s serie tratada con cloroformo/metanol y suturada; Y es el estrés en MPa;
x es la deformación en tanto por uno; R² es el coeficiente de determinación.

Tabla 7. Media cuadrática de las diferencias entre las curvas promedio ($y=ax^2+bx$).

Series comparadas	$i(y_{ai}-y_{bi})^2/n$
G con CM	0.6848
G con Gs	0.7041
Gs con CM	0.0316
Cm con CMs	0.0338

A,B,= G, CM, Gs, CMs

nes que mejor se ajustaban eran parábolas cuadráticas de la forma $y= ax^2+bx+c$, incidentes en el origen ($c=0$). En las tablas 3,4,5,6. se expresan los valores de los coeficientes a y b así como los valores de los coeficientes de determinación R^2

Los valores promedio de las observaciones para cada serie fueron:

Serie G: $y = 143.5150x^2+7.2974x$

Serie Gs: $y = 82.5916x^2+3.1182x$

Serie CM: $y = 90.4575x^2+2.7153x$

Serie CMs: $y = 60.5772x^2+5.1344x$

Siendo y es el estrés en MPa y x el porcentaje de alargamiento en tanto por uno.

Se estudiaron también los resultados obtenidos de las curvas promedio para valores de $x < .10$, para el análisis de las medias cuadráticas de las diferencias. En la tabla 7 se expresan estos resultados donde se pueden comprobar las escasas diferencias entre los valores medios de las series CM y CMs (.0338) y entre las series G y CMs (.0316).

Discusión

Retrasar o impedir la calcificación de la membrana pericárdica, así como mejorar su diseño y aumentar su resistencia mecánica utilizada en la construcción de bioprótesis valvulares cardiacas es sin duda un logro necesario, aunque quizás no suficiente para garantizar su durabilidad¹⁶⁻¹⁸. Diversos tipo de tratamientos químicos, o procesos para el entrecruzamiento de fibras, han sido estudiados como alternativas al uso de glutaraldehído y han sido probados con resultados discrepantes¹⁹⁻²⁴. En trabajos previos nuestro grupo demostró que el uso de cloroformo/metanol para la extracción de lípidos fue eficaz contra la mineralización del tejido, reduciendo la calcificación^{3,4,12,14} con respecto a lo observado en el tejido cuando se trataba solo con glutaraldehído, pero su éxito puede ser menor en áreas de las bioprótesis están sometidas a un mayor estrés mecánico²⁵.

En este trabajo, comparamos un tratamiento con cloroformo/metanol con una preparación estándar con glutaraldehído, usando probetas de pericardio sin y con sutura de seda, sometiendo a ambas a un

estrés de tracción. De esta forma comparamos el efecto del tratamiento químico en el comportamiento mecánico de las probetas, que está, sin duda, relacionado con la durabilidad de un velo valvular de una bioprótesis¹⁶⁻¹⁸.

Del análisis de los resultados hasta la rotura, el tratamiento químico con glutaraldehído (G) o con cloroformo/metanol (CM) no parece alterar estos valores y si en cambio la sutura (tabla 2). Encontramos una pérdida significativa del orden de 6 MPa en el estrés medio en la rotura, entre las series suturadas y no suturadas independientemente del tipo de tratamiento recibido. Si solo utilizáramos este parámetro como medida de comparación, nuestras conclusiones serian muy sencillas, el nuevo tratamiento químico ensayado no aportaría nada en cuanto a la resistencia del biomaterial. No obstante se sabe que comparar biomateriales sólo con el estrés de rotura puede ser limitado o engañoso²⁶. Por ello realizamos el análisis de las curvas de estrés/deformación de las diferentes series ensayadas, cuyas funciones tuvieron excelentes ajustes (coeficientes de determinación, R^2 superiores a 0.97) y por ello deben ser dignos de confianza. En la figura 2 se expresan gráficamente las curvas promedio de cada serie ensayada para valores de 2.5 MPa para el estrés de tracción, con deformaciones menores del 10%. En las curvas de los grupos control suturadas y no suturadas Gs y G las diferencias se incrementan según se incrementa el estrés al que se someta el pericardio y la deformación es mayor en la serie suturada (Gs) para cualquier estrés cuando se le compara con la serie no suturada (G). En cambio este fenómeno no se manifiesta en la preparación con cloroformo/metanol series CM y CMs donde apenas parecen existir diferencias al observar sus curvas promedio (figura 3).

Cuando utilizamos un método matemático, comparando las medias cuadráticas de las diferencias (tabla 7), no se aprecian apenas diferencias entre las series suturadas Gs y CMs y lo que es mas llamativo entre las series preparadas con cloroformo/metanol sean o no suturadas Cm y CMs, restando importancia al papel de la sutura en ese rango de estrés y para ese tratamiento. Este rango de estrés cubre el estrés de trabajo de un velo pericárdico esférico, estimado en 0.250 MPa^{27,28} por lo que cobra un mayor interés este resultado. El tratamiento químico con cloroformo/metanol permite una mayor deformación del pericardio para igual grado de estrés (figura 2) los módulos de elasticidad o tangentes en cada punto de la curva son siempre menores (mayor elasticidad) que con la preparación

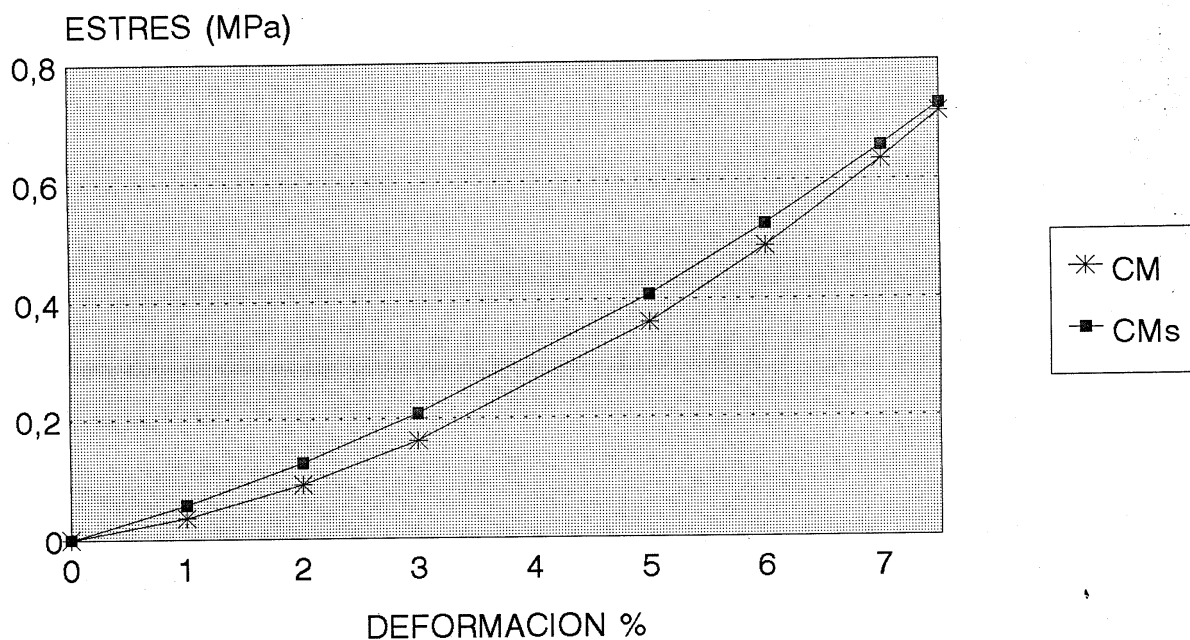


Figura 3. Comparación entre las curvas de estrés/deformación de los valores medios de las series tratadas con cloroformo/metanol, no suturadas y suturadas (CM) (CMs).

con estándar con glutaraldehído. Esto hace que aun se ensanchen mas las diferencias entre los comportamientos elásticos del pericardio y el hilo de sutura²⁹.

Sin embargo las curvas promedio de las muestras tratadas con cloroformo/metanol CM y CMs son muy semejantes cuestionando el papel de la sutura (figura 3).

Nuestra hipótesis sobre el efecto de corte o cizalladura del hilo de sutura sobre el pericardio, como responsable de un estrés adicional que sufrirían las muestras suturadas⁶, produciéndose por lo tanto una mayor deformación, no se manifiesta con este nuevo tratamiento, en los rangos de estrés referidos.

La conclusión de este trabajo, es que el tratamiento con cloroformo/metanol puede ser una alternativa muy útil, pues si además de retrasar los procesos de calcificación del pericardio mejora el comportamiento elástico de las muestras suturadas disminuyendo la interacción con la sutura.

Será necesario comprobar mediante un ensayo de fatiga real¹⁸ si la durabilidad de un velo fabricado con pericardio así tratado es aceptable.

Agradecimientos

A Dolores Patiño por la corrección de este trabajo y al Fondo de Investigaciones Sanitarias: ayudas 0250/96 y 00/0192.

Bibliografía

1. **Levy R.J. Shoen F.J. Howard S.L.** "Mechanism of calcification of porcine bioprosthetic aortic valve coup: role of T-lymphocytes" *Am. J. Cardiol.* 1983; 52:629-631.
2. **Levy R.J., Zenker J.A. Lian J.B.** "Vitamin K dependent calcium binding protein in aortic valve calcification." *J. Clin. Invest* 1980; 65:563-566.
3. **Jorge E. Fernandez P. Gutierrez M. Castillo-Olivares J.L.** "Study of calcification of bovine pericardium: analysis of implication of lipids and proteoglycans." *Biomaterials* 1991; 12:683-689.
4. **Jorge E. Gutierrez M. Castillo-Olivares J.L.** "Calcification of soft tissue employed in the construction of heart valve prostheses: study of different chemical treatments" *Biomaterials* 1991; 12:249-252.
5. **Bortolotti V. Milano A. Thiene G.** "Early mechanical failure of Hancock pericardial xenograft" *J. Thorac Cardiovasc. Surg.* 1987; 94:200-207.
6. **Garcia Paez JM, Carrera A, Garcia Sestafe JV, Millan I, Jorge E, Candela I, Castillo JL.** "Is cutting stress responsible for the limited durability of heart valve bioprostheses?". *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1990; 100:580-586.
7. **Lopez C. Ibarra F. Carreras A. Gutiérrez A Martínez F Alonso F.** "Rotura temprana de prótesis de xenofic. Nuestra experiencia en 26 implantaciones" *Rev. Esp. Cardiol.* 1983; 36:309-312.
8. **Trowbridge E.A. Black M.A. Daniels C.L.** "The mechanical response of glutaraldehyde fixed bovine pericardium to uniaxial load" *J. Mater Sci* 1985; 20 114-140.

9. **Trowbridge E.A.** "Mechanical characteristics of pericardial tissue and their relevance to bioprosthetic design" *CRC Crit.Rev.Biocomp.* 1989; 5:105-172.
10. **Thubrikar M.J. Deck D.J. Aouad J.** "Role of mechanical stress n calcification of aortic bioprosthetic valves" *J.Thorac Cardiovasc. Surg.* 1983; 86:115-125.
11. **Gabbay S. Kadan P. Factor S. Cheung J.K.** "Do heart valve bioprosteses degenerate for metabolic or mechanical reason ? *J. Thorac Cardiovasc. Surg.* 1988; 95:208-215.
12. **Jorge E. Fernandez P, Escudero C. Castillo-Olivares J.L.**"Inhibition of bovine pericardium calcification:a comparative study of Al³⁺and lipid removing treatment" *J. Mater Sci:Mater in Med* 1991; 2:86-88.
13. **Hirsch D. Darder J. Thomas T.J. Shoen F.J. Levy J.T. Levy R.J.** "Inhibition of calcification of glutaraldehyde preteated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate:preincubation and controlled releas" *J.Biomed Mater Res* 1993; 27.1477-1384.
14. **Jorge E. Fernandez P. de la Torre N. Castillo-Olivares J.L.**"Inhibition of calcification of porcine valve tissue by selective lipid removal" *Biomaterials* 1994; 15:815-819.
15. **Khorr E. Wee A. Tan B.L. Chew T.Y.** "The efficacy of dual anticalcification of glutaraldehyde-fixed porcine pericardium" *J.Mater Sci:Mater in Med* 1995; 6:518-522.
16. **Walley VM, Keon WJ,.** "Patterns of failure in Ionescu-Shirley bovine pericardial bioprosthetic valve" *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1987; 93:925-933.
17. **Trowbridge EA, Lanford CE, Crofts CE, Robert KM.** "Pericardial heterograft:Why do these valves fail? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1988; 95:577-589.
18. **Carrera A, Garcia Paez JM, Jorge E, Millan I Navidad R, Candela I and Castillo JL.**"Behavior of bovine pericardium used in cardiac bioprostheses when subjected to real fatigue assay" *Biomaterials* 1993; 14:76-79.
19. **Nimni M.E. Cheung D. Strates B. Kodama M. Sheikh K.** "Chemically modified collagen :a natural biomaterial for tissue replacement" *J.Biomed Mat Res.* 1987; 21:741-771.
20. **Xi T. Liu F.J.** "Effect of pretreatment with epoxy compoundson the mechanical propieties of bovine pericardial bioprosthetic materials" *Biomat. Appli.* 1992; 7:61-75.
21. **Gott J.P. Pan C. Dorsey L.M.** "Calcification of porcine valves: a successful new method of antimineralization" *Ann. Thorac Surg.* 1992; 53:207-215.
22. **Petite H.J. Frei V. Huc A. Herbage D.** "Useof diphenylphosphorylazide for crosslinking collagen based biomaterial." *J.Biomed. Res.* 1994; 28:159-165.
23. **van Wachem P.B.,van Luyn M.J. Olde Damink L.H.Dijkstra P.J. Feijen J. Nieuwenhuis P.** "Biocompatibility and tissue regenerating capacity of crosslinked dermal sheep collagen" *J.Biomed Mater.Res.* 1994; 28:353-363.
24. **Jorge E.Fernandez P. Escudero C. de la Torre N. García Páez J.M. Castillo-Olivares J.L.** "Calcification of pericardial tissue pretreated with different amino acids" *Biomaterials* 1996; 17:571-575.
25. **Jorge E. Fernandez P. Escudero C. de la Torre N García Páez J.M. castillo-Olivares J.L.** "Influence of stresson the calcification of delipidated bovine pericardial tissue employed in the construction of cardiacvalves" *J.Biomed Mater Res* 1996; 30:411-415.
26. **von Fraunhofer J.A. Stirey R.J. Stone I.K. Materson B.J.** "Tensile strength of suture materials" *J.Biomed Mater. Res.* 1985;19:595-600
27. **Dhatt C.G.** "A efficient triangular shell element" *AIAAJ* 1970; 2:2100-2102.
28. **Clark R.E. Butterworth G.A.** "Chacterization of mechanics of human aortic and mitral valve leaflets" *Surg.forum* 1971; 22:134-136.
29. **García Páez J.M. Carrera A. García Sestafe J.V. Castillo-Olivares J.L.** "Comparison of elasticities of componentsof cardiac bioprostheses leaflet " *J. Biomed Res* 1996; 30:47-52.