

**Artigo Original**

recebido: 18/02/98 e aceito em 29/07/99

**Performance hidrodinâmica de  
biopróteses valvulares cardíacas  
de pericárdio bovino tratado com  
acetais de glutaraldeído**

*Hydrodynamic performance of  
bioprosthetic heart valves of bovine  
pericardium crosslinked with  
glutaraldehyde acetals*

**S.A. Yoshioka**

Aluno de Doutorado  
Programa de Ciência e Engenharia dos Materiais  
Universidade de São Paulo  
Cx. Postal 780 - CEP 13560-970, São Carlos, SP.  
E-mail: sergiyoy@iqsc.sc.usp.br

**G. Goissis**

Professor Associado  
Instituto de Química de São Carlos  
Universidade de São Paulo.

**R.B. Araujo**

Biólogo  
Braile Biomédica Indústria, Com. e Represent. S.A.

**V.D.A. Ramirez**

Biomédico  
Braile Biomédica Indústria, Com. e Represent. S.A.

**M.F. Godoy**

Professor Adjunto  
Faculdade de Medicina de S.J. Rio Preto  
Universidade do Estado de São Paulo.

**D.M. Braile**

Professor Associado  
Faculdade de Ciências Médicas  
Universidade de Campinas.

**Resumo**

Este trabalho descreve os resultados preliminares de performance hidrodinâmica de válvulas cardíacas de pericárdio bovino (PB) reticulado com acetais de glutaraldeído (GA), uma forma protegida de glutaraldeído, e comparadas com aquelas de PB e valvas aórticas porcinas tratadas convencionalmente com GA e comercialmente disponíveis. Os parâmetros analisados em função de frequências variáveis foram gradiente pressórico médio, área efetiva média do orifício, fração de regurgitação, índice de eficiência e índice de performance. Os resultados mostraram que o comportamento das biopróteses valvulares de PB tratado com acetais de glutaraldeído foi similar aquele de válvulas tratadas convencionalmente com GA, exceto pelas fração de regurgitação e índice de eficiência que foram maior e menor, respectivamente. Estes resultados mostram que a técnica de tratamento de PB com acetais de GA, pode se constituir em um processo alternativo para obtenção de materiais empregados na manufatura de biopróteses valvulares cardíacas.

**Palavras-chave:** glutaraldeído, reticulação, acetais, bioprótese, performance hidrodinâmica.

**Abstract**

*Bovine pericardium bioprosthetic heart valve crosslinked with glutaraldehyde acetals was evaluated in respect to its hydrodynamic performance at frequencies between 60 and 100 beats per minute in comparison with commercially available bovine pericardium and porcine aortic valves crosslinked with conventional glutaraldehyde procedures. The assessed parameters in function of variable frequencies were mean pressure gradient, mean effective area of orifice, regurgitant fraction, and performance and efficient indexes. The results showed that, except for the regurgitant fraction and the index of efficiency that were larger and smaller respectively, all other parameters were comparable indicating that the crosslinking of bovine pericardium with glutaraldehyde acetals may be a new efficient procedure for the manufacture of bioprosthetic heart valves compared to conventional process.*

**Keywords:** glutaraldehyde, acetals, crosslinking, bioprostheses, hydrodynamic performance.

## Introdução

A falha mecânica é um dos principais fatores da substituição de biopróteses valvulares cardíacas. Geralmente é causada por falhas estruturais das matrizes colagênicas, em função da reticulação não-homogênea do glutaraldeído (GA) de tecidos ricos em colágeno (Nimni, 1988; Woodrof, 1978) e tem como resultante principal a sua calcificação (Bernacca *et alii*, 1992; Tomazic *et alii*, 1994). As complicações relatadas pela incerteza quanto a função e durabilidade das biopróteses valvulares reticuladas com GA preocupam os cirurgiões e cardiologistas na recomendação da troca valvar, visto que as biopróteses valvulares cardíacas manufaturadas com pericárdio bovino (PB) ou valvas porcinas tratadas convencionalmente têm mostrado uma taxa de falhas relativamente alta depois de 5 a 7 anos de uso (Tomazic *et alii*, 1994; Lee, 1993).

A reticulação de tecidos ricos em colágeno com GA é largamente utilizada na área cardiovascular (Carpentier *et alii*, 1984; Ionescu *et alii*, 1974), principalmente do PB ou valvas aórticas porcinas utilizadas na manufatura de biopróteses valvulares. Este tratamento tem como finalidade aumentar a estabilidade mecânica e biológica. Contudo, dois fatores impõem importantes restrições à qualidade dos materiais obtidos com o uso do GA: a) a natureza complexa do GA na forma de solução aquosa (Ruijgrok *et alii*, 1994), e b) a reticulação com GA induz ainda uma impermeabilização superficial nos tecidos colagênicos, impedindo reação mais homogênea do reagente com os tecidos (Woodrof, 1978).

Com base no exposto acima, o objetivo deste trabalho foi o estudo de performance hidrodinâmica da bioprótese valvular cardíaca manufaturada com PB tratado com o novo processo químico de reticulação com acetais do GA (Goissis *et alii*, 1998), comparando com as biopróteses existentes comercialmente, as de PB ou de valvas porcinas tratadas pelo método convencional (meio tamponado com GA) (Braile, 1990).

O GA na forma de seus acetais (GAA) correspondem estruturalmente a uma forma quimicamente protegida da função aldeídica, que pode ser ativada pela adição de base e de modo rápido. Nesta forma protegida, a reatividade do GA pode ser facilmente controlada, permitindo ao reagente uma difusão mais homogênea no interior da matriz, introduzindo portanto ligações de reticulação mais bem definidas quimicamente e com uma distribuição mais homogênea no interior da matriz. Com este procedimento, efeitos de impermeabilização observados em matrizes colagênicas tratadas com GA pelo método conven-

cional seriam minimizados, e provavelmente associados também a uma redução dos efeitos citotóxicos observados em função da diminuição da densidade de reticulações poliméricas, responsáveis pela liberação gradual do GA pós-implante. Resultados frente a colagenase mostraram que materiais derivados de PB obtidos por este processo foram biologicamente mais estáveis em comparação aqueles obtidos pelo método convencional (Goissis *et alii*, 1998).

## Materiais e Métodos

Todos os reagentes e solventes empregados neste trabalho foram de grau P.A. (para análise) e utilizados como tal, excetuando-se o GA (Union Carbide, Charleston, WV, USA) que foi purificado por tratamento com carvão ativado.

O PB e as valvas cardíacas porcinas foram coletadas de acordo com procedimentos e técnicas descritas para a manufatura de biopróteses valvulares cardíacas (Braile, 1990). As biopróteses estudadas foram aquelas manufaturadas com PB tratados com diacetais do glutaraldeído (GAA) (Goissis *et alii*, 1998) e com GA pelo método convencional (Braile, 1990). Para o caso do PB, o tratamento químico foi realizado sobre peças inteiras montadas sobre bastidores circulares de PVC (policloreto de vinila) com diâmetro de 16,0 cm:

a) Tratamento com acetais do glutaraldeído (GAA): 6 peças de PB foram transferidas para uma solução de etanol acidificado pela adição de ácido clorídrico concentrado até que a concentração final do ácido fosse de  $3,0 \times 10^{-3}$  Mol/L. A seguir foram tratadas com uma solução de etanol contendo HCl a concentração de  $3,0 \times 10^{-3}$  Mol/L e GA em uma concentração final de 1,0% por um período de 48 horas (h). Em seguida, as peças de PB foram removidas da solução e expostas a vapores de trietilamina por um período de tempo de 24 h. Os materiais obtidos foram novamente submetidos ao procedimento descrito acima, nas mesmas condições de tempo e concentração. Em seguida as peças de PB foram submetidas ao tratamento subsequente com solução de GA a 0,05% em tampão fosfato pH 7,40, 0,13 Mol/L (TF) por um período de 9 h (Goissis *et alii*, 1998).

b) Tratamento com solução de GA (0,5 %) em tampão fosfato: 3 peças de PB e de valvas porcinas foram submetidas ao tratamento com solução de GA a 0,5% em TF por um período de 18 dias, conforme descrito nos procedimentos convencionais obtidos pela empresa Braile Biomédica Indústria, Comércio e Representações S.A. (Braile, 1990).

### Manufatura das Biopróteses Valvulares

Todas as biopróteses valvulares foram montadas sobre o suporte circular de Delrin® (E. I. du Pont de Nemours & Co., Inc., Wilmington, DE, USA), com espessura de 0,6 mm e altura de 2 mm, contendo um anel de liga especial de aço inoxidável inserido externamente ao suporte para reforçar a consistência e determinar a posição da bioprótese por exame radiológico. Este suporte foi recoberto com PB reticulado e fixado em suas bases com uma aba de Dacron® (E I du Pont de Nemours & Co., Inc., USCI 1642, Billerica, MA, USA), permitindo a perfeita fixação e integração da bioprótese no paciente. A característica valvular mais importante é que as válvulas são manufaturadas com uma única peça de pericárdio ao invés de retalhos de diversas peças, como no caso da biopróteses de valvas porcinas. Neste último tipo de bioprótese, elas são montadas internamente ao suporte de Delrin® e fixado em suas bases com uma aba de Dacron®. As biopróteses valvulares manufaturadas foram armazenadas em formaldeído a 4% até o seu uso, de acordo como descrito na literatura (Braile, 1990).

### Testes de performance hidrodinâmica

Os testes foram realizados no Laboratório de Testes "In Vitro" da Divisão de Pesquisas e Publicações da Braile Biomédica Industria, Comércio e Representações S.A. (S. J. Rio Preto, SP), sendo testadas três biopróteses valvulares cardíacas de 31 mm de diâmetro externo, sendo duas (uma de PB e outra porcina) tratadas de forma convencional com GA em meio tamponado e uma de PB submetida a tratamento com acetais de GA.

As biopróteses valvulares foram estudadas em sistema duplicador de pulsos da Shelhigh, Inc., modelo V. 4.0, sendo testadas em solução aquosa de álcool benzílico a 1% e pH 6,5 a temperatura ambiente (25°C), que possui uma viscosidade de 4 centpoise e densidade de 1 g/mL (GABBAY, S., et alii, 1989). Esse sistema gera um fluxo fisiológico pelo movimento controlado de um pistão e tem uma placa de aqui-

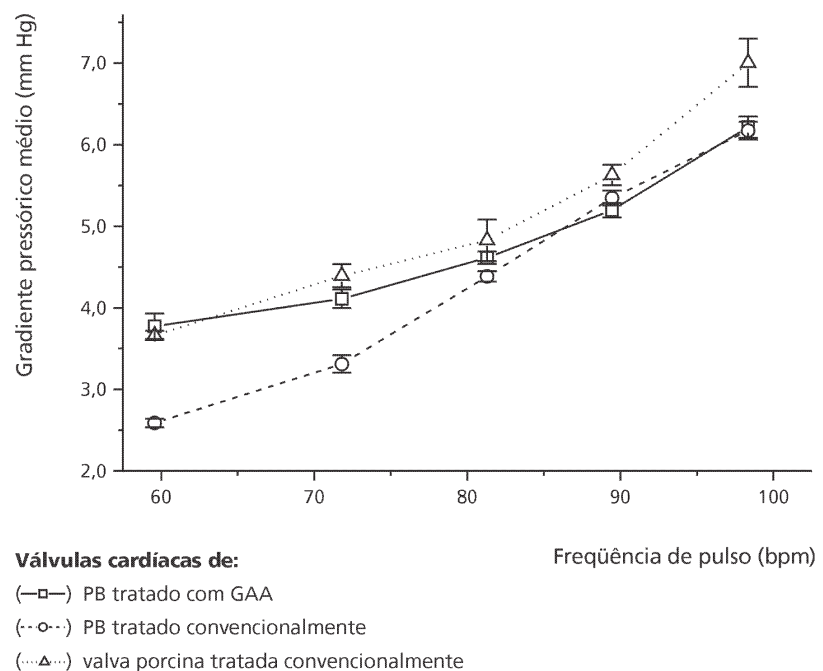
sição de dados, instalada em um computador PCAT286, o qual recebe os sinais de um medidor de vazão eletromagnético e de um transdutor de pressão diferencial, que os utilizam para o processamento do teste.

Foram empregados volume de ejeção de 90 mL e frequências de pulso de 60, 70, 80, 90 e 100 batimentos por minuto (bpm). Isto possibilitou fluxos entre 5 e 9 litros por minuto (L/min), correspondente a 8 e 18 L/min na fase de ejeção (Gabbay *et alius*, 1978). Foram realizados cinco testes para cada frequência, perfazendo um total de 25 para cada bioprótese valvular, sendo todas as biopróteses na posição correspondente a valva mitral.

Dos parâmetros avaliados pelo duplicador de pulsos, apenas foram analisados aqueles clinicamente mais importantes, tais como, gradiente pressórico médio transvalvular, área efetiva média do orifício, fração de regurgitação e seus equivalentes hidrodinâmicas.

### Resultados e Discussão

Os valores do gradiente pressórico da válvula porcina foram maiores do que aqueles de PB tratado com GAA e de forma convencional como mostrado na Figura 1, provavelmente devido a sua menor área efetiva útil

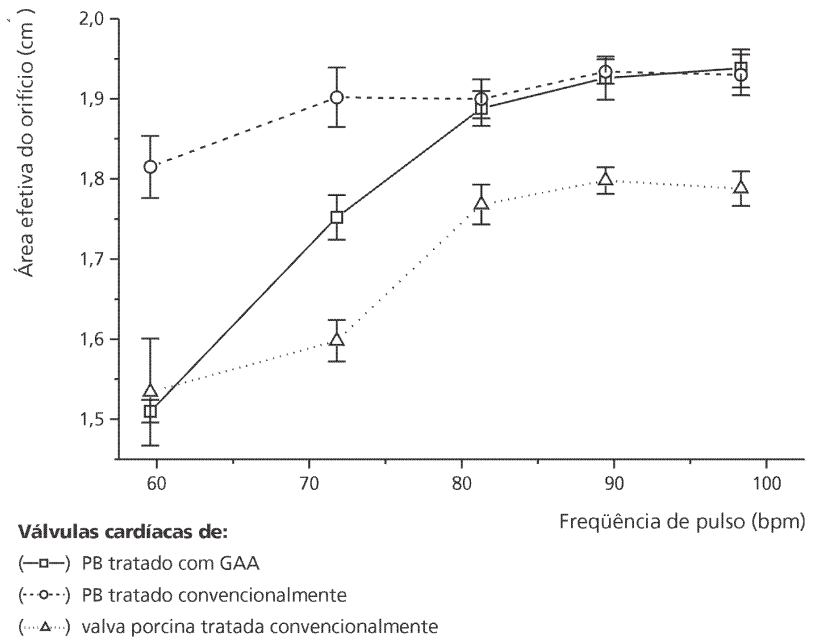


**Figura 1.** Comportamento do gradiente pressórico médio em função da frequência de válvulas cardíacas de 31 mm submetidas a testes em duplicador de pulsos.

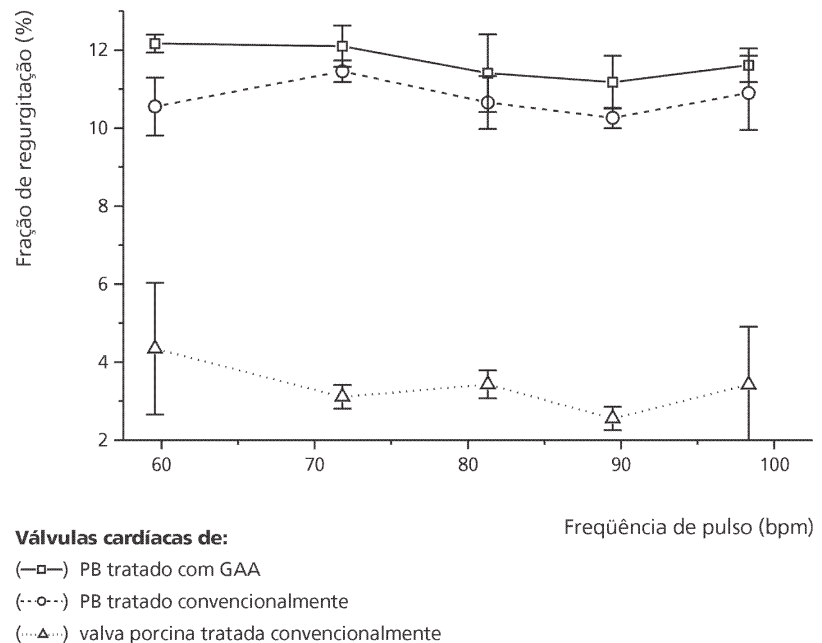
de fluxo, portanto a pressão para abrir os folhetos será maior, sendo que a válvula de PB tratado com GAA nas frequências 60, 70 e 80 bpm apresentou comportamento similar ao da válvula porcina, enquanto que com 90 e 100 bpm, foi similar ao da válvula de PB tratado convencionalmente.

Comparativamente para frequência de 60 bpm na Figura 2, a válvula de PB tratado com GAA apresentou valores de área efetiva média do orifício próximos àqueles da válvula porcina; e para frequência de 80 a 100 bpm, esta válvula apresentou valores similares àqueles de PB tratado convencionalmente, demonstrando que para frequência baixa, a válvula de PB tratado com GAA apresenta um comportamento estenótico em relação a outra, isto é, ocorre uma redução da área efetiva de fluxo, o que pode ser observado na válvula porcina em todas as frequências (Gabbay *et alius*, 1992).

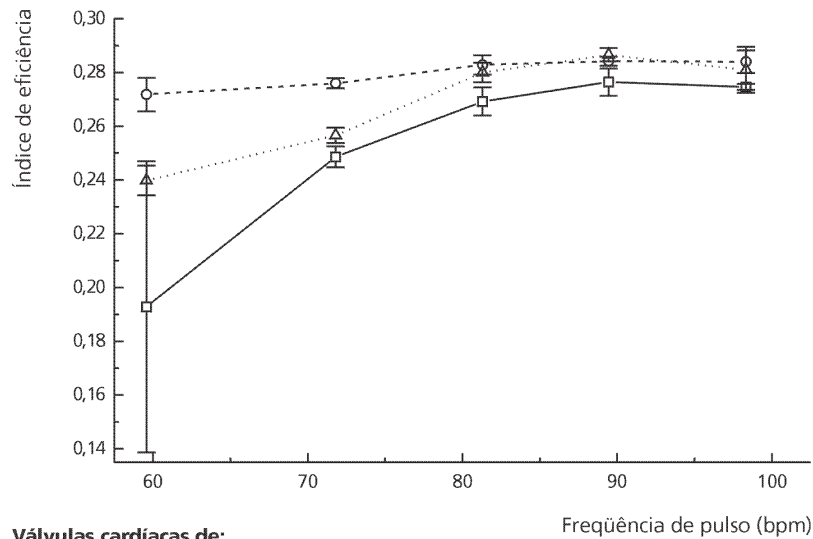
Os valores da fração de regurgitação em todas as frequências na bioprótese de PB tratado com GAA foram maiores do que na válvula de PB tratado convencionalmente e superiores que àquele da porcina, como mostra a Figura 3. Estes resultados já eram esperados, pois o material para manufatura da válvula de PB tratado com GAA apresentava-se ligeiramente menos elástico (Goissis *et alii*, 1998), impedindo uma oclusão total dos folhetos da bioprótese. Isto não ocorreu nas válvulas porcinas tratadas convencionalmente, onde os valores da fração de regurgitação são menores, visto que o formato da válvula é mantido



**Figura 2.** Comportamento de área efetiva média do orifício valvular em função da frequência de válvulas cardíacas de 31 mm submetidas a testes em duplicador de pulsos



**Figura 3.** Comportamento de fração de regurgitação em função da frequência de válvulas cardíacas de 31 mm, submetidas a testes em duplicador de pulsos.

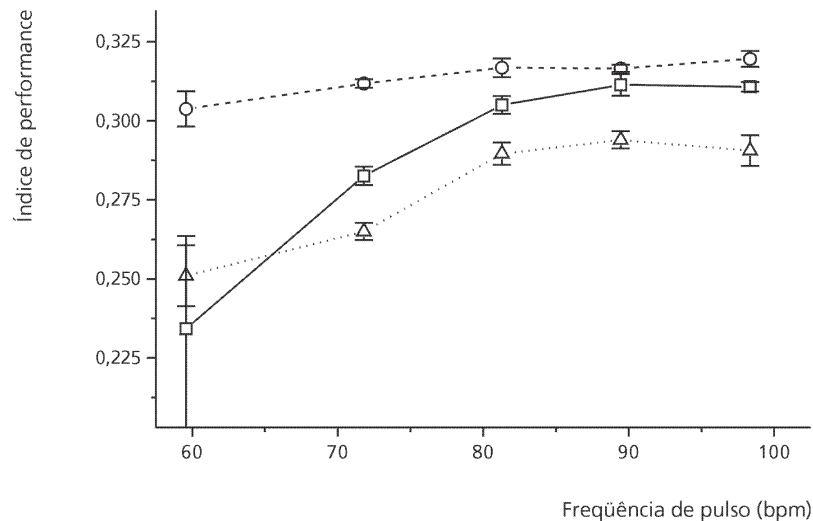
**Válvulas cardíacas de:**

(—○—) PB tratado com GAA

(---○---) PB tratado convencionalmente

(---△---) valva porcina tratada convencionalmente

**Figura 4.** Comportamento de índice de eficiência em função da frequência de válvulas cardíacas de 31 mm, submetidas a testes em duplicador de pulsos.

**Válvulas cardíacas de:**

(—○—) PB tratado com GAA

(---○---) PB tratado convencionalmente

(---△---) valva porcina tratada convencionalmente

**Figura 5.** Comportamento de índice de performance em função da frequência de válvulas cardíacas de 31 mm, submetidas a testes em duplicador de pulsos.

semelhante àqueles da valva porcina natural.

Os valores de índice de eficiência na bioprótese de PB tratado com GAA foram menores em todas as frequências em relação àqueles tratados convencionalmente, como pode ser visto na Figura 4, sendo mais expressivo na frequência de 60 bpm. No caso da porcina, os valores constantes em diversas frequências se devem principalmente à manutenção do seu formato natural, como comentado anteriormente.

O índice de performance das válvulas de PB tratado com GAA mostraram valores menores que aqueles das válvulas tratadas convencionalmente, principalmente com 60 bpm como pode ser visto na Figura 5, sendo que nas frequências superiores a 70 bpm, tornam-se próximos àqueles da porcina, pois esta válvula é montada dentro do suporte, que diminui drasticamente a área disponível de fluxo (Gabbay *et alius*, 1992). Isto já não ocorre com a válvula de PB tratado com GAA, provavelmente devido a uma maior rigidez do material obtido pelo tratamento com GA na forma de GAA, que pode estar associada a um efeito de desidratação da matriz colagênica induzida pelo próprio solvente, neste caso o etanol.

### Conclusões

Os resultados obtidos mostram portanto, que a performance hidrodinâmica, tais como gradiente pressórico, índice de performance e área média efetiva, da bioprótese de PBGAA foi próxima ou similar àquela de PBGA, exceto pelos

valores maiores das frações de regurgitação e menores nos índices de eficiência.

Estes resultados preliminares de performance hidrodinâmica mostram também que o tratamento alternativo com GA na forma de acetais de matrizes ricas em colágeno para manufatura de biopróteses valvulares cardíacas, pode ser potencialmente interessante para a obtenção desses tipos de válvulas, principalmente levando-se em consideração a maior homogeneidade da reação de reticulação como demonstrado por resultados anteriores relativos à estabilidade biológica determinada pela ação da colagenase (Goissis *et alii*, 1998), assim como os resultados preliminares de teste de durabilidade acelerada das válvulas cardíacas de PB tratado com GAA, que apresentaram valores similares àqueles de válvulas de PB tratado de forma convencional, com aproximadamente 310 milhões de ciclos, correspondendo a 7,5 anos *In Vivo* (Gabbay *et alius*, 1992).

### Agradecimentos

Os autores agradecem a Ezer Biazin e Glauco D. Broch pela assistência técnica prestada. Este trabalho foi financiado pelos programas: PADCT/CNPq (processo nº 620001/96.8/FNM), FAPESP (processo nº 96/02455-8) e RHA/E/CNPq (processo nº 610.048/96-1).

### Referências Bibliográficas

- Bernacca, G.M., Fisher, A.C.; Mackay, T.G.; Wheatley, D.J. (1992). "Calcification and stress distribution in bovine pericardial heart valves". *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 26, p. 959-66.
- Braile, D.M. (1990). *Prótese valvular de pericárdio bovino. Desenvolvimento e aplicação clínica na posição mitral*. São Paulo, Tese de Doutorado, Programa de Cirurgia Cardiovascular, Escola Paulista de Medicina - SP, p. 14-22.
- Carpentier, A., Nashef, A., Carpentier, A., Ahmed, A., Goussef, N. (1984). "Techniques for prevention of calcification of valvular bioprostheses". *Circulation*, v. 70, p. 1165-68.
- Gabbay, S., Iosif, M.C. (1978). "In Vitro hydrodynamic comparison of mitral valve prostheses at high flow rate". *Jour. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 76(6), p. 771-87.
- Gabbay, S., Iosif, M.C. (1992). "System In vitro characterization heart valve bioprostheses under accelerated fatigue conditions and under physiologic conditions". *Biomed. Instrum. & Tech.*, v. 26, p. 408-13.
- Gabbay, S., Iosif, M., Andrews, J. (1989). "Reproducibility of accelerated fatigue testing conditions for meaningful comparative studies and clinical predictions". In: *Clinical predictive value of in-vitro accelerated fatigue testing of heart valve bioprostheses*. Eds. S. Gabbay and E. Mueller. Presented at the 24<sup>th</sup> Annual Meeting of

- American Association for the Advancement of Medical Instrumentation, St. Louis, Missouri, p. 30-45.
- Goissis, G., Yoshioka, S.A., Braile, M.D., Ramires, V.D.A. (1998). "The chemical protecting group concept applied in crosslinking of natural tissues with glutaraldehyde acetals." *Artificial Organs*, v. 22(3), p. 210-14.
- Ionescu, M.I., Pahrashi, B.C., Mary, D.A.S., Bartek, I.T., Wooler, G.H. (1974). "Long-term evaluation of tissue valves". *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 68, p. 361-79.
- Lee, Y.S. (1993) "Morphogenesis of calcification in porcine bioprosthesis: insight from high-resolution electron microscopic investigation at molecular and atomic resolution". *J. Electron Microsc.*, v. 42, p. 156-65.
- Nimni, M.E. (1988). "Collagen: Biochemistry and Biomechanics", v.III, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Ruijgrok, J.M., De Wign, J.R., Boon, M.E. (1994). "Optimizing of glutaraldehyde crosslinking of collagen: effects of time, temperature and concentration as measured by shrinkage temperature". *J. Mat. Sc. Mat. Med.*, v. 5, p. 80-7.
- Tomazic, B.B., Brown, W.E., Shoen, F.J. (1994). "Physicochemical properties of calcific deposits isolated from porcine bioprosthetic heart valves removed from patients following 2-13 years function". *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 28, p. 35-47.
- Woodrof, E.A. (1978). "Use of glutaraldehyde and formaldehyde to process tissue to valves". *J. Bioeng.*, v. 2, p. 1-9.