

Esterilización de las válvulas aórticas heterólogas por el óxido de etileno y su conservación

Por los Dres. JOSE RAMON MARTIN,* GERALDO VERGINELLI,**
MARCIAL MIGUEL BARBERO,** SEIGO TSUZUKI,**
MAGNUS COELHO DE SOUZA,** DELMONT BITTENCOURT,**
y EURRICLYDES DE JESUS ZERBINI***

Los resultados obtenidos en el implante de homoválvulas en posición subcoronariana, muestran ciertas ventajas sobre las prótesis valvulares artificiales (Ross, 1964; Barrat-Boyes, 1967; Zerbini y col. 1967). Una comprobación semejante, se puede inferir a las válvulas heterólogas (Binet y col. 1965; Durán y Gunning, 1965; O'Brien y col. 1967; Ionescu y col. 1967) por la ausencia del fenómeno inmunológico de rechazo (Durán, 1965) y la duración del tejido implantado (Durán, Gunning y Whitehead, 1967).

En la mayoría de los trabajos publicados, son relatados inconvenientes ligados a los homo y heteroinjertos valvulares tales como: degeneración, perforación de los folletos e insuficiencia aórtica residual, siendo estos considerados dependientes de las técnicas de esterilización y conservación de las válvulas.

La insuficiencia aórtica post-operatoria observada en el implante de válvulas homólogas o heterólogas está vinculada con tres importantes facto-

res: 1) adecuada técnica quirúrgica, 2) infección, 3) resistencia del tejido implantado. El primero de ellos disminuyó de importancia con la adquisición de mayor experiencia (Barrat-Boyes, 1967). Los dos últimos son contemplados, por medio de los diferentes métodos de esterilización y conservación de las válvulas que están siendo utilizados: a) la esterilización con beta-propiolactona al 1% (Lo-Grippo y col., 1955; Rains y col., 1965) y/o posterior liofilización y conservación en soluciones para tales fines. b) óxido de etileno al 1% y liofilización (Flewett y col., 1965). c) irradiación y congelación a -70°C (Malm y col., 1967). d) formaldehído al 4% (O'Brien, 1967). Por lo tanto, no existe actualmente, un método satisfactorio, para la utilización clínica o experimental de los injertos.

El presente trabajo procura detallar, un método de esterilización y conservación de heteroinjertos, estudiando el comportamiento macroscópico de las válvulas, las variaciones del pH de las distintas soluciones utilizadas y los cambios en la resistencia a la tracción del tejido aórtico valvular, producidos a través del tiempo, cuando aquellos son preservados en diferentes medios.

MATERIAL Y METODOS

Técnica de preparación y esterilización de los heteroinjertos

Son utilizadas válvulas aórticas de cerdo, retiradas en el matadero, sin

¹ Comunicación efectuada al XXIV Congreso Brasileño de Cardiología, julio de 1968.

Instituto de Enfermedades Cardiopulmonares del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Pablo.

* Estagiario de la disciplina de Cirugía Torácica.

** Asistente de la disciplina de Cirugía Torácica.

*** Profesor Titular de la Cátedra. 1ª Clínica Quirúrgica. Jefe de la disciplina de Cirugía Torácica.

cuidados de asepsia, inmediatamente después de la muerte de animales jóvenes (1 a 2 años) y lavadas con solución de Ringer o de cloruro de sodio 0,9 g/l. En las horas siguientes es efectuada su disección (hasta 12 horas) de modo tal, que la porción muscular septal, que alcanza a la hojuela coronaria derecha, sea retirada tanto como fuera posible. Resta así, por su fase ventricular, un anillo de 2 a 3 mm de altura y en su cara aórtica es cortada la pared hasta 4 mm de altura y en su cara aórtica es cortada la pared hasta 4 mm sobre las comisuras, dejándose las arterias coronarias con suficiente tejido, para ser

suturado, cuando fuese necesario. Se deja el folleto mitral anterior con 4-5 mm de extensión.

Posteriormente son registrados, la fecha de recolección, su diámetro interno por su fase ventricular, con un medidor cónico similar al descrito por Barrat-Boyes y el externo con un calibre. Los senos de Valsalva son rellenos con algodón para que mantengan sus formas.

Después de su disección, las válvulas fueron introducidas en frascos de vidrio neutro, conteniendo 100 ml cada uno, de las soluciones descritas en el Cuadro I.

CUADRO I.— Soluciones empleadas y sus valores de pH pre-esterilización

Válvulas	Soluciones	Tamponada	pH
12	Biológicas Cl. Na. 0,9 g.l. Ringer Locke	CO ₃ HNa	6,8-7
		CO ₃ HNa	6,8-7
		CO ₃ HNa	6,8-7
20	Alcohol 50 % + Glicerol 5 % Propilenoglicol 5 %	—	5,8
		—	5,6
30	Alcohol 70 % + Glicerol 5 % Propilenoglicol 5 %	—	6,2
		—	6,3

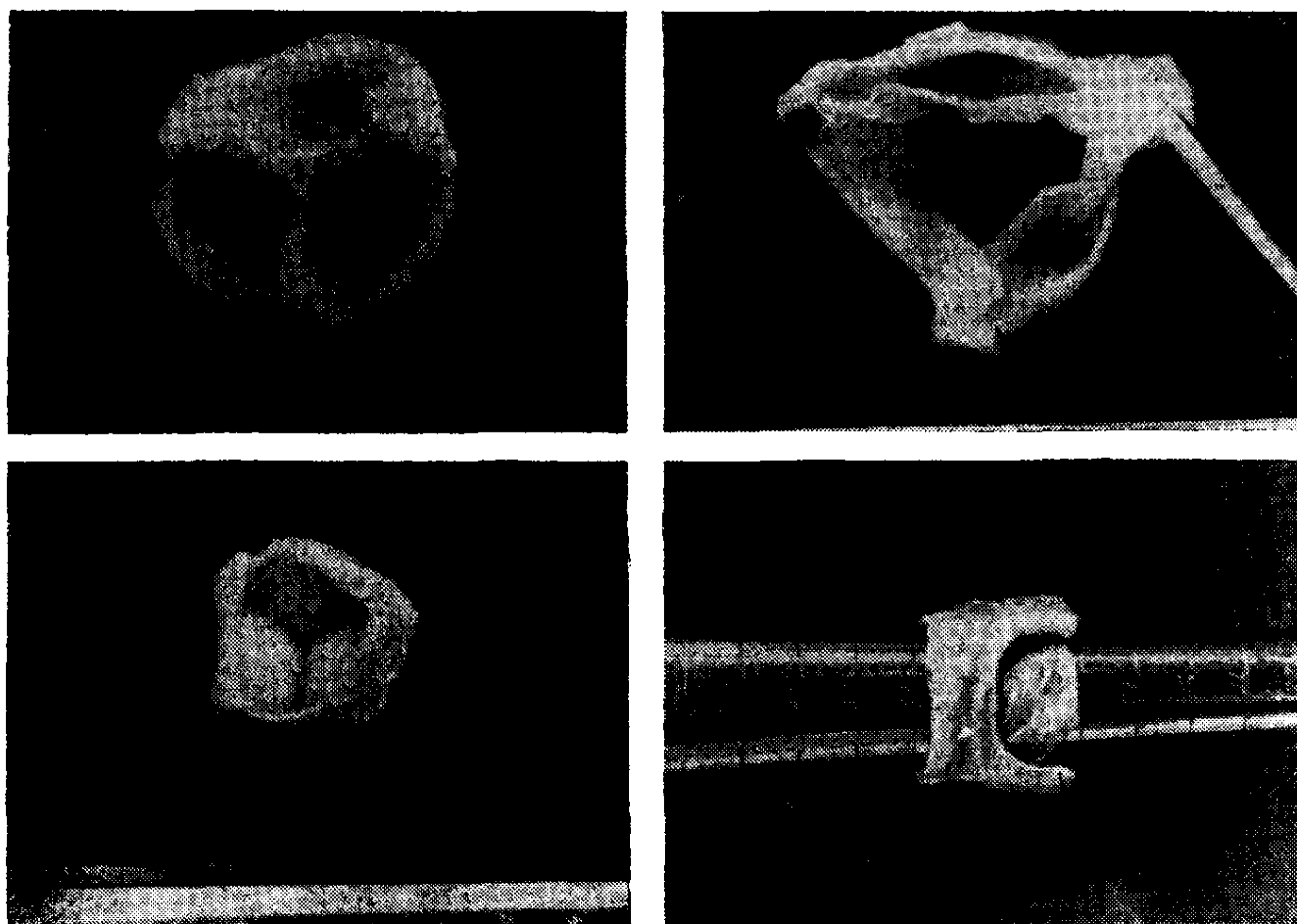


FIGURA 1.— Heteroinjertos.

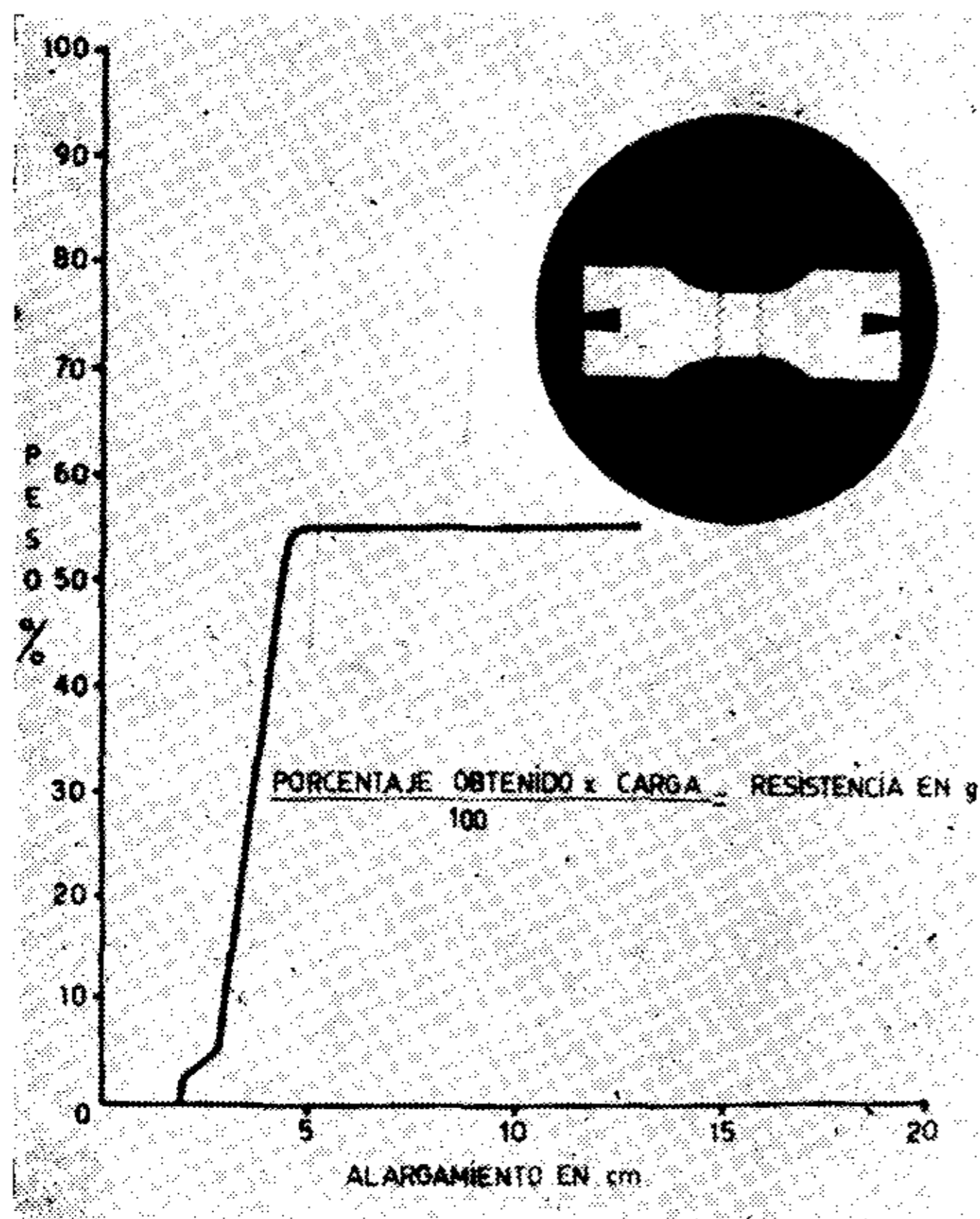


FIGURA 2.— Representación gráfica del test de resistencia a la tracción y fórmula para su obtención.

Se levaron a una temperatura entre 5 y 10° C; se adicionaron con pipeta helada 0,5 ml de óxido de etileno respectivamente y se dejaron a 4° C, durante 60 minutos, para ser retiradas después, a temperatura ambiente durante 18 horas. El óxido de etileno al 0,5 % fue usado como agente esterilizante en todos los casos.

Fueron estudiados tres grupos de válvulas (Cuadro I).

Grupo A: 12 válvulas conservadas en soluciones "biológicas" tamponadas con bicarbonato de sodio.

Grupo B: 20 válvulas conservadas en solución alcohólica al 50 % con glicerol o propilenoglicol al 5 %.

Grupo C: 30 válvulas conservadas en solución alcohólica al 70 % con glicerol o propilenoglicol al 5 %.

Fueron efectuadas las correspondientes pruebas de esterilidad (Cuadro II), extendidos de los medios de cultivo con coloración de Gram y contraprueba de bacteriostasis.

CUADRO II.— Pruebas de esterilidad

Incubación durante 7 días a 37° C en:

- A) Bacto Ergonbroth (aerobios esporulados, tipo bacillus).
- B) Bacto fluid thioglicolate medium (anaerobios esporulados, tipo clostridium).
- C) Bacto sabourad medium (fungus, tipo candida albicans).

Otras:

Extendidos de los medios (coloración de gram).

Contraprueba de bacteriostasis.

El pH de las soluciones antes y después de la esterilización de los injertos y durante su conservación fue determinado por un pH-Meter E --398-- B, Metrohm a 25° C.

El aspecto macroscópico de las válvulas y de las soluciones fue estudiado y clasificado (Cuadro III).

CUADRO III.— Aspecto macroscópico durante su conservación

Soluciones	Válvulas		Tiempo	
	Turbidez	Pliabilidad Hidratación		
Biológicas	Cl. Na. 0,9 g.l.	++	Buena Buena Buena	1 a 4 semanas
	Ringer	+		
	Locke	+++		
Alcohol 50 % +	Gicerol 5 %	—	Regular Hiperh.	1 a 4 semanas
	Propilenoglicol 5 %	—	Regular Hiperh.	
Alcohol 70 % +	Gicerol 5 %	—	Buena Buena	1 a 12 semanas
	Propilenoglicol 5 %	—	Buena Buena	

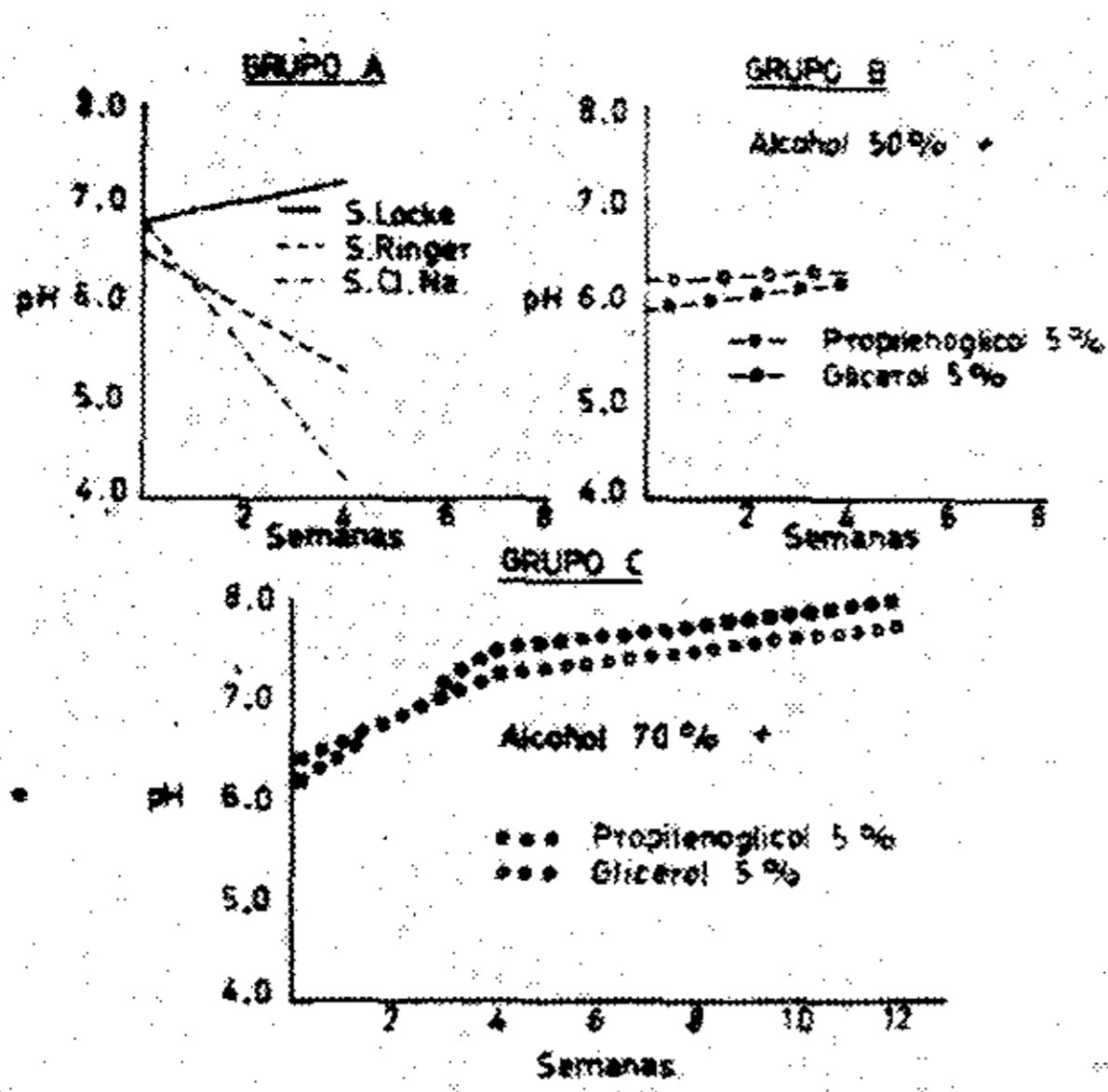


FIGURA 3.— Variaciones promedio de los valores de pH, de las soluciones, durante la conservación de los heteroinjertos.

Fueron llevados a cabo tests de resistencia a la tracción, antes y después de la esterilización, en tiras de tejido aórtico valvular de 5 mm de ancho, en los grupos A y C; en este último las válvulas fueron previamente reconstituidas en solución de CI de Na 0,9 g/l, durante 30 minutos. Durante la conservación de los injertos, se efectuó el referido test a las 4 semanas, en ambos grupos, y sólo el grupo C, fue sometido a dicha prueba al término de 12 semanas. El grupo B, fue excluido al test de la tracción por presentar al estudio macroscópico nítida hiperhidratación y disminución de la pliability.

Simultáneamente fue establecido un valor control de la resistencia a la tracción, obtenido por determinaciones en pared de válvulas aórticas frescas conservadas en solución de Ringer no más de 18 horas a 4° C.

El aparato utilizado para tales mediciones, posee dos brazos que presan ambos extremos de la tira de tejido, y al aplicarse un peso, que en nuestros casos varió entre 4 y 6 kg, en uno de los mismos, se produce una tracción que es registrada por inscripción indirecta en un gráfico (figura 2). La resistencia a la tracción en gramos, fue obtenida por la fórmula presente en el mismo cuadro.

Con el fin de simplificar, los resultados encontrados a través de 200 determinaciones, fueron expresados en por ciento, y comparados al valor fijado en válvulas frescas.

RESULTADOS

Las pruebas de esterilidad efectuadas en los 3 grupos de válvulas,

las cuales fueron incubadas en diferentes medios de cultivo, mostraron ausencia de desarrollo bacteriano y fúngico. También fueron negativos los extendidos con coloración de Gram y la contraprueba de bacteriostasis (Cuadro II).

El cuadro III, muestra que en el grupo A, la observación macroscópica de las válvulas, en un período que varió entre 1 y 4 semanas, fue satisfactoria en lo que se refiere a hidratación tisular y pliability de los folletos, hallándose turbidez de diferentes grados en las soluciones; la solución de Locke la presentó con mayor intensidad y la solución de Ringer en menor cuantía.

En el grupo B, las válvulas conservadas durante 4 semanas, se mostraron con hiperhidratación, y por el contrario sus soluciones fueron claras.

En el grupo B, las válvulas conservadas durante 4 semanas, se mostraron con hiperhidratación, y por el contrario sus soluciones fueron claras.

En el grupo C, las válvulas se observaron con buen aspecto macroscópico y las soluciones fueron transparentes y claras, a las 4 y 12 semanas de conservación.

El pH de las soluciones antes de la esterilización, es mostrado en el cuadro I, y la figura 3, muestra las variaciones promedio del pH, en los diferentes grupos, después de la esterilización y durante su conservación.

En el grupo A, observamos tendencia a la caída de los valores de pH, excepto en la solución de Locke; en el grupo B tiende a elevarse y en el grupo C, alcanza cifras de franca alcalinidad del medio.

La resistencia media a la tracción del tejido aórtico, en las válvulas frescas fue de 2060 g, y se constituyó en nuestro padrón.

El test fue efectuado en las válvulas del grupo A y C, conservadas en sus soluciones, sin agente esterilizante, con el objeto de descartar alguna interferencia de éste, durante las primeras 48 horas. El grupo B, fue desechado en esta fase de la experiencia, por lo dicho anteriormente, las válvulas presentaron hiperhidratación tisular.

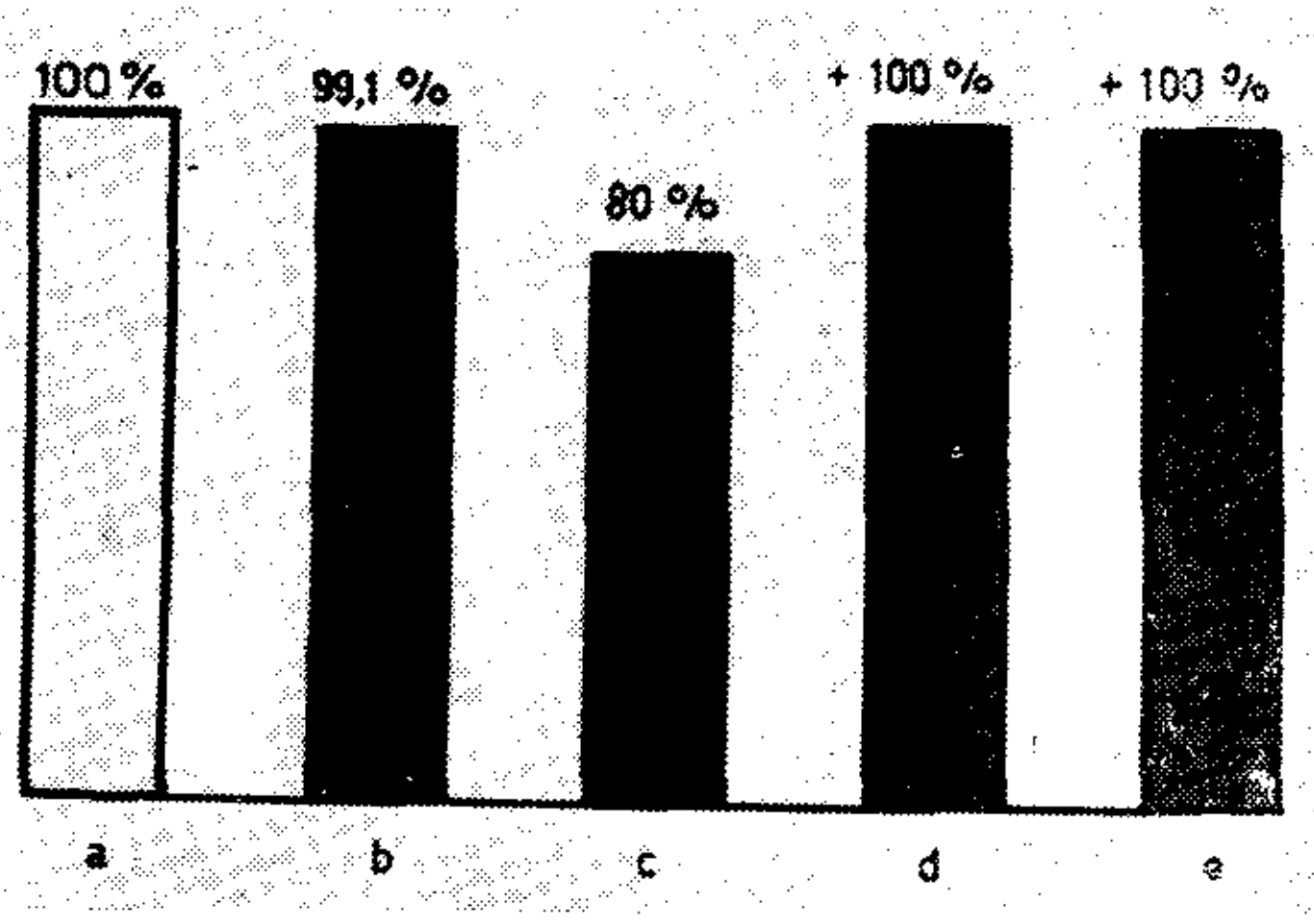
En el grupo A, las válvulas no estériles presentaron una resistencia a la tracción del 80 % (1600 g) y las esterilizadas el 99,1 % (2040 g).

En el grupo C, las válvulas no estériles y esterilizadas, mostraron valores superiores al 100 % (3.062 y 3.300 g) respectivamente (fig. 4).

Después de 4 semanas de preservación en las soluciones del grupo A, la resistencia del tejido a la tracción, cayó para el 60 % (1.200 g).

En el grupo C, las válvulas conservadas durante 4 semanas, en solución alcohólica al 70 % con propilenoglicol al 5 %, presentaron una resistencia del 97,2 % (2.009 g) y las válvulas del mismo grupo conservadas en solución alcohólica al 70 % con glicerol al 5 %, presentaron el 96,5 % (1.988 gramos) (fig. 5).

Cuando las válvulas fueron preservadas en un período de tiempo de 12 semanas (grupo C), mostraron el 85 % (1.750 g) en la solución alcohólica al 70 % con propilenoglicol al 5 %; y el 90 % (1.850 g) en la solución de alcohol al 70 % con glicerol al 5 %, respectivamente, cuando se compararon al valor padrón establecido en el test de resistencia a la tracción (fig. 6). El grupo A, no fue considerado en este período, a causa de los resultados obtenidos a las 4 semanas.



FIGURUA 4. — Conservación de los heteroinjertos; test de resistencia a la tracción en por ciento, a las 48 hs. a) Valor padrón; b) Grupo "A" válvulas estériles; c) Grupo "A" no estériles; d) Grupo "C", válvulas estériles; e) Grupo "C" no estériles.

Es utilizado vastamente en medios industriales y también lo es para esterilizar medios bacteriológicos u otros líquidos. La pequeñez de su molécula lo hace de gran penetración y es denaturante de las proteínas en concentraciones al 5 %. Actúa sobre las bacterias Gram +, Gram —, virus, hongos y esporos (Wilson y Bruno, 1950). Los derivados etilenglicólicos, no son responsables de su acción bactericida y no son tóxicos. En una concentración del 9 %, para esterilizar tubos para uso en circulación extracorpórea, demostró su toxicidad (Barwell y Freenan, 1959). Su aplicación como agente esterilizante de tejidos fue satisfactoria según los estudios de Eade y col. en 1956.

En esta experiencia, el C₂OH₄, se utilizó a una concentración del 0.5 %,

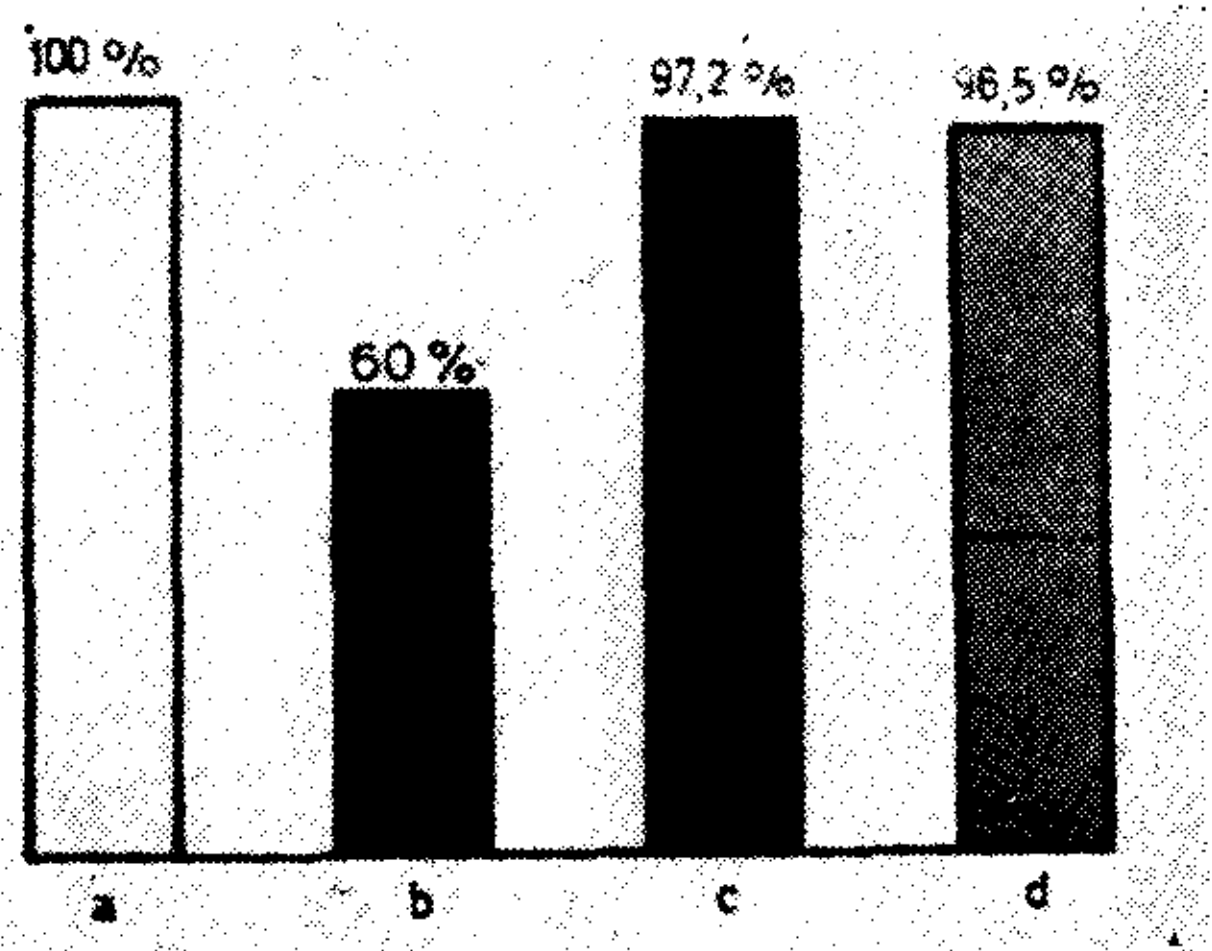


FIGURA 5. — Conservación de los heteroinjertos; test de resistencia a la tracción en por ciento, a las 4 semanas. a) Valor padrón; b) Grupo "A" soluciones biológicas; c) Grupo "C", solución alcohol 70 % con propilenoglicol 5 %; d) Grupo "C", solución alcohol con glicerol 5 %.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las ventajas apuntadas, de los homo y heteroinjertos, sobre las prótesis artificiales (Caudro IV), hacen necesaria la búsqueda de técnicas adecuadas de esterilización y conservación.

La influencia de dichos métodos sobre los injertos, exigen nuevos estudios y esfuerzos destinados a clarar tal evento, con la intención de mejorar su uso clínico o experimental.

El óxido de etileno, molécula simple y pequeña, perteneciente al grupo de los epóxidos, que se encuentra en estado líquido por debajo de los 10,7°C, se hidroliza rápidamente en medio ácido, produciendo derivados etilenglicólicos. Es explosivo cuando alcanza el estado gaseoso, al mezclarse con aire ambiente.

CUADRO IV. — Comparación entre prótesis artificiales y heteroinjertos

	Prótesis	Heteroinjertos
Rigidez	Sí	—
Ruidos	Sí	—
Rechazo	—	—
Tromboembolismo	Sí	—
Anticoagulantes	Sí	—
Gradiente hemodinámico	++	0/+
Inconvenientes mecánicos	+++	+

demostrando ser un agente esterilizante rápido y eficaz.

En el período de 4 semanas, la preservación de las válvulas en el grupo A, mostró su buen aspecto macroscópico y la turbidez presente en las soluciones, se atribuyó a la presencia de precipitados lipoproteicos. No hubo correlación entre las variaciones de los valores de pH y la presencia de dicha anomalía. Al mismo tiempo, la hiperhidratación tisular presente en las válvulas del grupo B, se debería a la concentración alcohólica del 50 %, pues no se manifestó cuando se utilizó una concentración del 70 % (Cuadro III).

El cuadro I, muestra que las soluciones del grupo A, fueron tamponadas con bicarbonato de sodio a un pH 6,8 - 7,0; y el descenso de los valores del mismo, excepto en la solución de Locke, no pudo ser explicado. Quedó expuesta la marcada labilidad, de obtenerse un pH estable para la conservación del tejido (fig. 3). El ascenso en las cifras del pH, en el grupo B y la franca elevación en las soluciones del grupo C, se deberían a que el óxido de etileno, al combinarse con los grupos carboxilos de las cadenas de aminoácidos, dejarían en libertad los grupos básicos (Fraenkel y Conrad, 1944) elevando consecuentemente el pH del medio (fig. 3).

Los tests de resistencia a la tracción efectuados, intentarían demostrar, cambios físicos producidos en el tejido aórtico valvular o también matriz conjuntivo-elástica, durante su conservación. Nuestras determinaciones en válvulas no estériles del grupo A, demuestran una caída en la resistencia al 80 %, posiblemente ligada a debilitación tisular por contaminación bacteriana. En las válvulas esterilizadas de los grupos A y C no se observó descenso del porcentaje de la resistencia a la tracción en las primeras 48 horas, lo que nos permite afirmar que el óxido de etileno no afectó el tejido testado (fig. 4). Las cifras superiores al padrón, se observaron en las válvulas conservadas en las soluciones del grupo C. Malnic y col. (1961), encontraron aumento de la resistencia en tejido de aorta abdominal de canes, conservado en alcohol absoluto.

En el grupo A, después de 4 semanas de preservación, el valor del 60

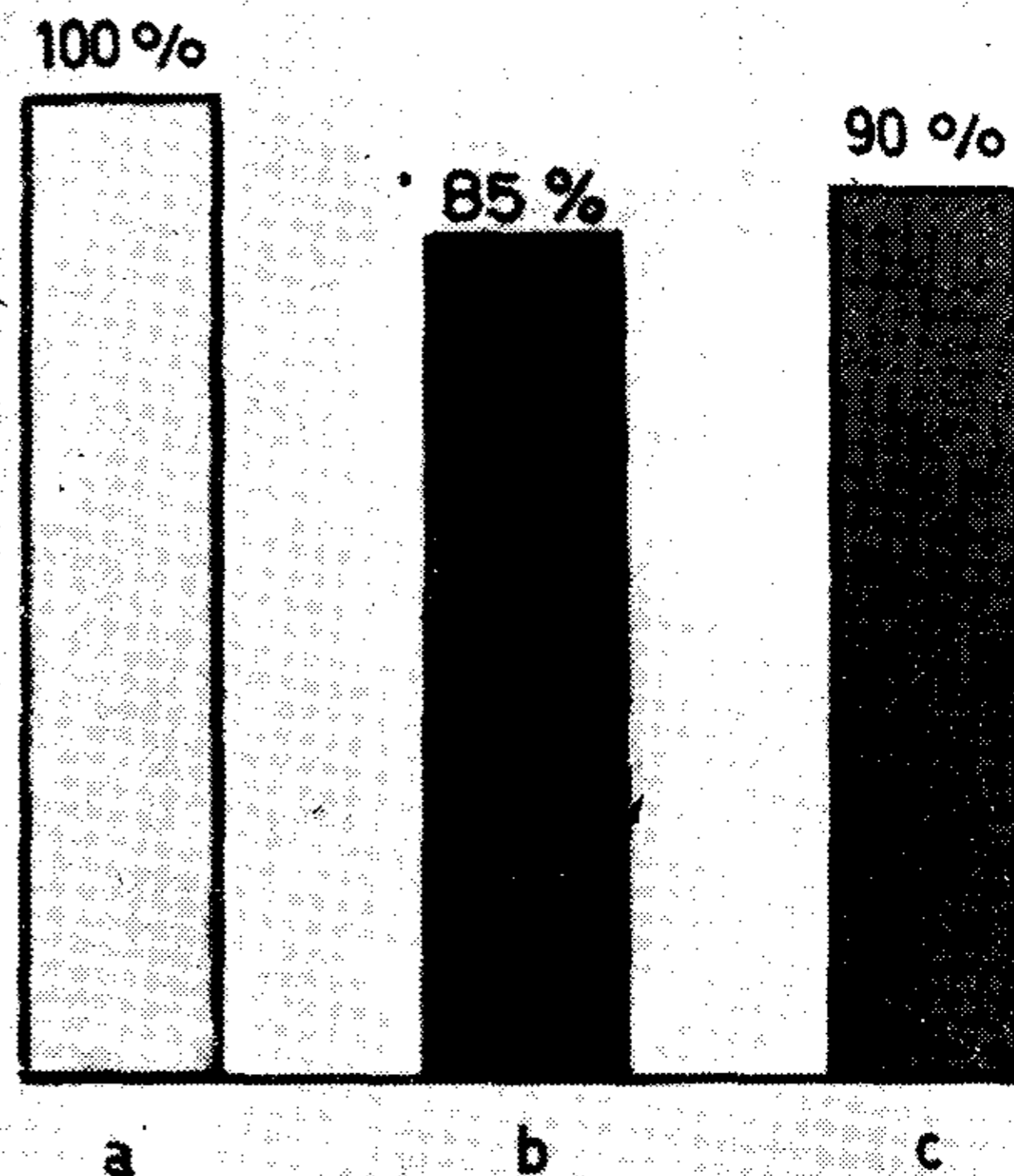


FIGURA 6. — Conservación de los heteroinjertos; test de resistencia a la tracción en por ciento, a las 12 semanas. a) Valor padrón; b) Grupo "C", solución alcohol 70 % con propilenoglicol 5 %; c) Grupo "C", solución alcohol 70 % con glicerol 5 %.

por ciento, en la resistencia a la tracción, nos hace presuponer una alteración importante en la matriz conjuntivo elástica del tejido aórtico; por lo que no fue continuado el estudio de su resistencia por más tiempo. En el grupo C, por el contrario se observó una marcada diferencia (fig. 5).

A las 12 semanas, el test mostró el 85 % en las válvulas preservadas en solución alcohólica al 70 % con propilenoglicol al 5 %, y un valor del 90 %, en válvulas colocadas en la solución de alcohol al 70 % con glicerol al 5 % (fig. 6) lo que indicaría, según los resultados obtenidos, que las soluciones alcohólicas alterarían en menor grado, dicha matriz conjuntivo elástica, frente a los tests de resistencia a la tracción realizados.

El uso de alcohol absoluto como conservante de tejidos (Freitas Neto, 1966), o sus soluciones a diversas concentraciones, se muestra ventajoso comparado a las soluciones "biológicas" aquí utilizadas, en esta experiencia se asociaron las propiedades conservantes del alcohol con la rapidez y eficacia del óxido de etileno, como esterilizante, posibilitando así el uso casi inmediato de los injertos. Sus soluciones no presentaron precipitaciones y el aspecto macroscópico de las válvulas fue satisfactorio.

El pH, de las soluciones alcohólicas al 70 %, se mantuvo en una zona más estable y adecuada para la conservación de los heteroinjertos.

El test de resistencia a la tracción mostró al cabo de 12 semanas, a la solución de alcohol al 70 % con glicerol al 5 %, como la más adecuada para la conservación de las válvulas, desde que las mismas mostraron las menores alteraciones en el test, cuando se lo comparó al padrón establecido.

Las conclusiones y resultados de esta experiencia, hacen factible, la utilización clínica y/o experimental de los heteroinjertos, usando el presente método.

SUMARIO

Es descripta una técnica de preparación y esterilización de válvulas aórticas heterólogas. Se incluyen los resultados de los test bacteriológicos efectuados. Son estudiados: el aspecto macroscópico de las válvulas, las variaciones del pH de las soluciones y los cambios producidos en el test de resistencia a la tracción del tejido aórtico y valvular, cuando las válvulas son conservadas en distintas soluciones "biológicas" e hidroalcohólicas, durante diversos períodos de tiempo.

SUMMARY

A technic of preparation and sterilization of heterologous aortic valves is described. Bacteriological tests performed were included. Were studied: macroscopic aspects of heterografts, solutions pH variations and changes on the traction test of the aortic valvar tissue, while the heterografts were preserved in different hydroalcoholic and "biologic" solutions, during various periods of time.

Los autores desean expresar su agradecimiento, a los laboratorios Johnson & Johnson del Brasil, Div. Ethicon, por el apoyo prestado en la concreción del presente trabajo.

Al Dr. Walter Pohl, su elevado aprecio por la asistencia técnica recibida, para llevar a cabo las pruebas laboratoriales.

Al Sr. Renato Dos Santos, técnico del banco de válvulas y tejidos del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina, Universidad de San Pablo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BaBrrat-Boyes, B. G.: "Homograft replacement for aortic valve disease" *Mod. Conc. Card. Dis.* 26: 1-6, 1967.
2. Barwell, C. F. and Freenan, M. A.: "Sterilization by ethylene oxide" *Lancet* 1: 917, 1959.
3. Binet, J. P.; Duran, C.; Carpenter and Langlois, J.: "Heterologous aortic valve transplantation" *Lancet*, 2: 1275, 1965.
4. Duran, C. and Cuning, A. J.: "Heterologous aortic valve transplantation in the dog". *Lancet*, 2: 144, 1965.
5. Duran, C.; Cuning, A. J.; Whitehead, R.: "Experimental aortic valve heretrotransplantation". *Thorax*, 22: 510, 1967.
6. Eade, G.; Fletcher, L.; Schlocser, J.; Zech, R.; Harkins, H.: "Chemical modification of arterial homograft". *Surgery*, 39: 515, 1956.
7. Flewett, T. H.; Zinnemann, K.; Oldfield, M. N.; Shuchsmith, H. and Dexter, F.: "A single-stage method of freeze-drying arteries for grafting". *Lancet*, 1: 888, 1955.
8. Fraenkel and Conrad: "The action of 1-2 epoxide on proteins". *J. Biol. Chem.* 154: 227, 1944.
9. Freitas Neto, A. G.: "Substitutos de arterias implantes e inclusoes". Tesis de doctorado Univ. San Pablo, Brasil. 1966.
10. Ionescu, M. I.; Wooler, G. H.; Smith, D. R. and Grimshaw, V. A.: "Mitral valve replacement with aortic heterograft in humans". *Thorax*, 22: 305, 1967.
11. Lo Grippo, G. A.; Overhulse, P.; Hartman, F. W.: "Ethylene oxide and artery graft bank". *Lab. Invest.* 4: 217, 1955.
12. Malm, J.; Bowman Jr., F.; Harris, P.; Kowalik, A. T.: "An evaluation of aortic valve homograft sterilized by electron beam-energy". *J. Thor. Card. Surg.* 54: 471, 1967.
13. Malnic, G.; Freitas Neto, A. G.; Goto, M.; Jatene, A. y Zerbini, E. J.: "Estudo da elasticidade dos enxertos arteriais conservados en alcool". *Folia Clin. Biol.* 30: 1-7, 1961.
14. O'Brien, M. F.: "Heterograft valves for human use, valve bank, techniques of measurement and implantation". *J. Thor. Card. Surg.* 53: 392, 1967.
15. O'Brien, M. F.; Clarebrough, J. K.; Mac Donald, I. G.: "Heterograft aortic valve replacement, initial follow-up study". *Thorax*, 22: 387, 1967.
16. Rains, A. S.; Crawford, N.; Sharpe, S. H.; Shrewsbury, S. F., and Barson, G.: "Management of an artery-graft bank with especial reference to sterilization by beta-propiolactona". *Lancet*, 2: 830, 1956.
17. Ross, D. N.: "Homotransplantation of the aortic valve in the subcoronary position". *J. Thor. Card. Surg.* 47: 713, 1964.
18. Wilson, G.; Bruno, J.: "The sterilization of bacteriological media and others fluids with ethylene oxide". *J. Exptl. Med.* 91: 449-458, 1950.
19. Zerbini, E. J.; Almeida de Oliveira, S.; Bittencourt, D.; Verginelli, G.; Pileggi, F.; Macruz, R.; Souza Coelho, M.: "Homograft aortic valve replacement". En publicación: *Disease of the Chest*.