

Energía gastada en el primer ciclo de histéresis como parámetro de selección de un biomaterial

FJ. Rojo Pérez¹, JM. García Páez², E. Jorge Herrero², JM. Atienza Riera¹, I. Millán², A. Rocha², A. Hoyos², G. Guinea Tortuero¹.

¹ Departamento de Ciencia de Materiales, Escuela de Ingenieros de Caminos, C y P, Univ Politécnica de Madrid, España

² Unidad de Biomateriales, Hospital Universitario Puerta de Hierro - Majadahonda, Madrid, España

³ Servicio de Bioestadística, Hospital Universitario Puerta de Hierro - Majadahonda, Madrid, España

Resumen

Veinticuatro muestras de pericardio de ternera estabilizado, material similar al utilizado en la fabricación de velos de bioprótesis cardíacas, fueron sometidas a una prueba de esfuerzo a fatiga. Tras seis bloques de 100 ciclos a 1 MPa de presión máxima se rompieron 12 muestras, el 50%. La energía media gastada en este primer ciclo, en las muestras que sobrevivieron, fue de 0.16J, un valor inferior a la energía gastada en la muestra que terminaron rompiendo, 0.28J ($p=0.005$). Utilizando el cociente entre la energía disipada en el primer ciclo y el espesor medio de la muestra, con un valor de corte de 0.48J/mm para la selección de las mejores muestras, se obtiene un índice de validez del 87.5%, y un área bajo la curva ROC de 0.917. Este método no destructivo debe ayudar a los métodos ópticos en el reconocimiento y selección de las muestras más resistentes y en la obtención del material biológico más homogéneo.

1. Introducción

Los materiales biológicos cuando son implantados en humanos con fines sanitarios deben cumplir, al menos, tres condiciones: estables, compatibles y resistentes. Si además como sucede con la bioprótesis cardíacas, son sometidos a un número muy elevado de ciclos de fatiga, estas características son ineludibles para ser aceptados [1].

Con el desarrollo de las primeras bioprótesis, en la década de los setenta del siglo XX [2] se fueron estableciendo protocolos de estabilización química y de compatibilidad de los biomateriales utilizados [3]. También se desarrollaron tratamientos anticalcificación, ya que durante algún tiempo, los problemas de la durabilidad de las bioprótesis se atribuyeron al depósito de calcio en los velos valvulares, con el consiguiente aumento de rigidez y fracaso funcional [3]. Posteriormente estos procesos de calcificación se relacionaron con la concentración de tensiones en ciertas zonas (cúspides, etc.) [4]. Este fenómeno también ocurre en las arterias, en las zonas sometidas a mayor tensión, como describió Sir Ross en 1966 [5] en un estudio de los procesos ateroscleróticos.

La aparición de desgarros en velos valvulares de bioprótesis sin calcificación aparente, confirmó esta teoría de daño por tensión mecánica como causa del fracaso valvular [6, 7]. Un ejemplo claro del daño son las tensiones cortantes que producen los hilos de sutura en los velos valvulares. La mayor rigidez de los hilos comparada

con la de los velos valvulares induce microdesgarros en regiones próximas a las suturas, dando lugar al fracaso posterior del velo [8].

Para que las bioprótesis comerciales al uso puedan ser empleadas en todos los implantes (aórtico, mitral), independientemente de la edad del paciente, debemos mejorar en dos aspectos: un diseño que minimice los esfuerzos y reduzca la concentración de tensiones [9](18), y una mejor selección del biomaterial para obtener mayor resistencia y homogeneidad [10].

La aparición de bioprótesis tubulares colocadas por cateterismo, sin cirugía, aumentará la demanda de válvulas biológicas [11] por lo que deberíamos ser capaces de solucionar estos problemas. La alternativa sería intensificar la investigación en nuevos materiales o en bioprótesis sintéticas [12].

El objeto de este trabajo es comprobar un método de selección y homogenización de pericardio de ternera, similar al utilizado en velos valvulares bioprótesis cardíacas, las bioprótesis de uso más frecuente en España [13], utilizando como parámetro el gasto de energía del material sometido a fatiga.

Este método utiliza el primer ciclo de histéresis, característico de cada muestra, como un marcador de comportamiento mecánico y de resistencia. En este ensayo, planteado como una prueba de esfuerzo, se pretende comparar las muestras que "sobreviven" sin romper, en relación con el gasto de energía del primer ciclo del primer bloque. El punto final del ensayo será cuando fracase el 50% de las muestras ensayadas.

Los resultados que se esperan obtener, permitirán seleccionar muestras homogéneas en cuanto a su comportamiento mecánico y también las más resistentes, pudiendo ser utilizadas posteriormente en la fabricación de velos valvulares de bioprótesis cardíacas. Podremos incluir los parámetros usados en un pliego de condiciones de calidad, solucionando al menos uno de los problemas antes enunciados[10].

2. Materiales

2.1. Obtención del material

Se utilizó pericardio de novillo obtenido directamente de un matadero local, de animales sacrificados entre los doce

y los quince meses de vida. El tejido fue transportado en solución salina isotónica (0.9% cloruro sódico) a 4°C al laboratorio donde fue limpiado manualmente de tejido graso.

Todos los especímenes de pericardio obtenidos presentaban, por la forma de obtención, similar morfología y cubrían el corazón en su parte anterior entre el ventrículo derecho y el izquierdo. Cada membrana tenía cerca de 15 cm de alto, en dirección ápico-caudal, por 10 cm de ancho aproximadamente.

Para su orientación y posterior corte de las muestras, se abrieron los sacos pericárdicos dejando el ligamento diafragmático en el centro y los ligamentos esternopericárdicos en su circunferencia según el esquema descrito por Purinya [14].

2.2. Preparación de muestras

Se cortaron 24 muestras circulares de 20mm de diámetro, cuyo espesor se midió en 10 puntos con un micrómetro Mitutoyo (Elecount E/A33/8 digital, precisión $\pm 3\mu\text{m}$). Se controlaron los espesores mínimos, desechando aquellas muestras que tuvieran espesores mínimos menores de 0.25mm o mayores de 0.50mm. El espesor medio de cada muestra se calculó como la media aritmética de todas las medidas en cada muestra.

Se trató el tejido con una solución al 0.625% de glutaraldehído, preparada con solución comercial al 25% (Merck) a razón de 1/50 (paso/volumen), en una solución tampón 0.1M de fosfato de sodio (pH= 7.4) durante 24 horas. Tras el tratamiento, las muestras fueron conservadas en solución salina a 4°C hasta el momento del ensayo.

3. Métodos

3.1. Ensayos mecánicos

Las muestras, inmersas en suero fisiológico, se sujetaron por su perímetro mediante mordazas anulares cerrando un conducto de suero fisiológico. Mediante un actuador hidráulico se impone una presión cíclica en el interior del conducto, que debe ser soportada por la lámina de pericardio. En [15] se puede encontrar una explicación más detallada del equipo.

La muestra, plana antes de comenzar el ensayo, adquiere forma de casquete esférico al aplicar la presión. A partir de los valores de presión y volumen registrados por el actuador hidráulico se obtiene la energía disipada por la muestra en cada ciclo.

El trabajo se ha realizado como un “test de esfuerzo”, en el que cada muestra fue sometida a bloques de 100 ciclos alternativamente, oscilando la presión entre 0 y 1MPa a una velocidad de 150mbar/s, hasta que la mitad de las muestras rompieron. Las muestras que rompen se consideran “enfermas” y las que sobreviven “sanas”. La rotura de la muestra se detecta mediante una caída brusca de la presión registrada.

3.2. Análisis estadístico y prueba diagnóstica

Se realizó la comparación de los valores medios de la energía consumida en el primer ciclo del primer esfuerzo, E_1 , entre las muestras que rompen y las que resisten todo el ensayo. Se usó un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico de Kruskal-Wallis y se analizaron los valores medios, así como su desviación típica y el error típico de la media. El nivel de significación aceptado fue de $p < 0.05$.

La asunción de normalidad de ambas distribuciones fue evaluada usando el test de Kolmogorov Smirnov, y la homogeneidad de la Varianza usando el test de Levene.

Para la prueba diagnóstica se consideraron ensayos “positivos” los de las muestras que rompieron antes del fin del ensayo, y “negativos” los que sobrevivieron al mismo.

Como parámetro predictivo se empleó la energía gastada por cada membrana en el primer ciclo de carga dividida entre su espesor medio (E_1/e). Así se pudo discriminar entre las muestras cuyo gasto de energía fue bajo por tener las propiedades mecánicas adecuadas y aquellas que por ser muy delgadas, y por lo tanto tener poco volumen, disipan poca energía. De esta forma se consigue que el volumen de material, directamente proporcional al espesor por tener todas las muestras la misma geometría circular, no influya en las predicciones.

Para evaluar la capacidad de predicción se emplearon conceptos de epidemiología tales como:

- Sensibilidad: porcentaje de los que teniendo el test positivo, estaban “enfermas, es decir” rompen tras el esfuerzo (las verdaderamente enfermas).
- Especificidad: porcentaje de las que teniendo el test negativo, están “sanas”, es decir no rompen tras el esfuerzo (las verdaderamente sanas).
- Índice de Validez: es el porcentaje de aciertos
- Índice de Youden: se define como uno menos la suma del ratio de falsos positivos más el ratio de falsos negativos.

Se obtuvo la curva ROC (Receiver Operating Characteristics) que es una metodología desarrollada en el seno de la Teoría de la Decisión en los años 50 del siglo XX. La ordenada es la sensibilidad y la abscisa es (1-especificidad). La exactitud de la prueba aumenta a medida que la curva se desplaza desde la diagonal al vértice superior izquierdo. Si la discriminación fuera perfecta (100% de sensibilidad y 100% de especificidad) el valor del área bajo la curva sería la unidad.

4. Resultados

4.1. Roturas

La rotura del 50% de las muestras (12 muestras) tuvo lugar tras seis bloques de 100 ciclos cada uno. En el primer bloque rompieron 3 muestras, al igual que en el segundo. Ninguna en el tercer bloque y 2, 1 y 3 en los

siguientes. En la figura 1 se expresan gráficamente estos resultados así como las roturas acumuladas.

El valor medio de la energía disipada en el primer ciclo por las muestras que sobrevivieron al ensayo (sanas) fue de 0.156J, mientras que el de las muestras que rompieron fue de 0.276J, significativamente superior ($p=0.005$). Se comprueba por lo tanto que las muestras que sobreviven el ensayo disipan menos energía por unidad de volumen en el primer ciclo de presión.

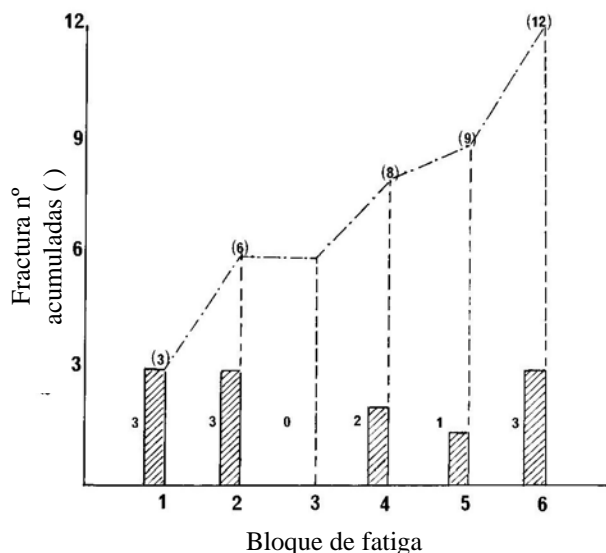


Figura 1. Número de roturas producidas en cada bloque de 100 ciclos y número de roturas acumuladas

4.2. Capacidad de predicción de E_1/e .

La figura 2 muestra la curva ROC correspondiente a emplear la energía disipada en el primer ciclo dividida por el espesor como predictor de la supervivencia de la muestra. El área bajo la curva es 0.917 y su error estándar 0.058.

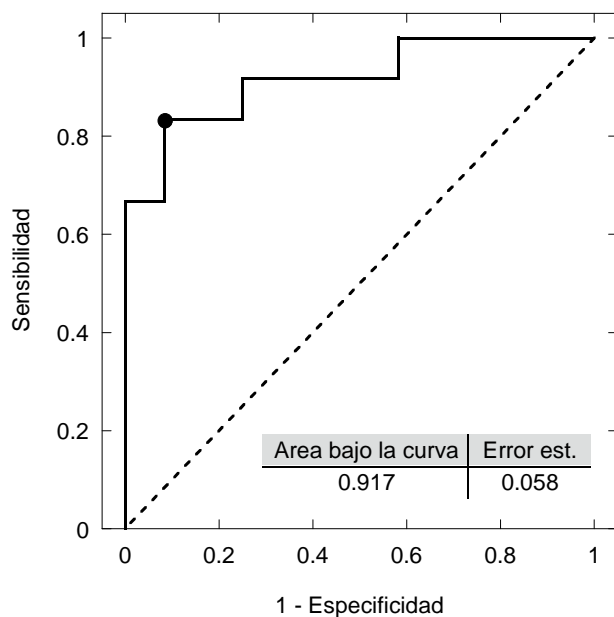


Figura 2. Curva ROC del cociente de la energía disipada en el primer ciclo entre el espesor medio, E_1/e .

Empleando un valor umbral de 0.48 J/mm, que corresponde al punto resaltado en la curva ROC, diremos que el test es positivo, y por lo tanto se predice la rotura de la muestra, cuando E_1/e supere dicho valor umbral y negativo cuando sea inferior.

La tabla de contingencias de correspondiente a dicho valor umbral se muestra en la tabla 1. Los parámetros estadísticos que miden la bondad de la predicción resultan: la sensibilidad del 83.3%, la especificidad del 91.7%, el índice de validez del 87.5% y el índice de Youden igual a 0.75.

| Prueba | Rompen | Sobreviven | Total |
|---|--------|------------|-------|
| Positiva $E_1/e > 0.48 \text{ J/mm}$ | 10 | 1 | 11 |
| Negativa $E_1/e < 0.48 \text{ J/mm}$ | 2 | 11 | 13 |
| Total | 12 | 12 | 24 |

Tabla 1. Tabla de contingencias de la prueba diagnóstica con el valor umbral $E_1/e = 0.48 \text{ J/mm}$.

5. Discusión

Una de las mayores dificultades cuando se utilizan materiales biológicos con fines sanitarios es garantizar su estabilidad y resistencia [1, 16]. Un primer paso es obtener un tejido que se comporte de forma homogénea, siendo éste un objetivo irrenunciable para fabricar bioprótesis seguras.

Mediante ensayos destructivos se puede medir la resistencia de una muestra pero la hacen inservible para su posterior uso y no garantizan que otra similar tenga igual comportamiento mecánico.

Las propiedades mecánicas son la clave en la resistencia del pericardio de ternera usado en la fabricación de velos valvulares para bioprótesis, dependiendo ésta de las fibras de colágeno que contenga y su orientación [10]. Sin embargo, los métodos de selección basados solo en criterios morfológicos no siempre garantizan la calidad de las muestras [17]. Aunque la introducción de un método óptico de difracción de bajo ángulo [18] (SALS: small angle light scattering) ayuda a cartografiar las laminas de pericardio y comprobar el número y dirección de las fibras de colágeno, aún no se ha podido establecer una clara correlación con la resistencia de las muestras elegidas [17].

La propuesta planteada en este trabajo, sin renunciar a los métodos de selección tradicionales que deben ser referentes de comprobación, es usar el gasto de energía del primer ciclo de histéresis como un parámetro sencillo y no destructivo para predecir la resistencia mecánica de una muestra de pericardio estabilizado.

En trabajos anteriores observamos lo característico y diferente del comportamiento mecánico en cuanto a deformación y disipación de energía en el primer ciclo en las muestras de tejido biológico estabilizadas químicamente [19]. Sellaro [10] sugiere que el primer ciclo del primer esfuerzo es diferente de los demás al producir el alineamiento de las fibras de colágeno según las direcciones de las principales tensión, jugando un papel crítico en la respuesta mecánica.

En este trabajo también se pudo observar este comportamiento diferente del primer ciclo. Dividiendo la energía gastada en el primer ciclo entre el espesor medio de la muestra y empleando un valor de corte de 0.48 J/mm, obtuvimos valores de sensibilidad y especificidad superiores al 80 y al 90%. Empleando además un método de decisión como la curva ROC (Receiver Operating Characteristics) donde el área bajo la curva muestra la exactitud de la prueba (figura 2), nuestros resultados dieron lugar a un área de 0.917, muy superior al azar al ser el valor máximo la unidad.

6. Conclusiones

Se ha realizado una prueba diagnóstica mediante 24 ensayos cíclicos sobre láminas circulares de pericardio de ternera estabilizado químicamente. La energía disipada por unidad de volumen en el primer ciclo de carga permite predecir la resistencia de la muestra.

Combinando el método de selección propuesto con otros métodos no destructivos como son los morfológicos (medir espesores, difracción de luz de bajo ángulo, etc.) permitirá la fabricación de prótesis biológicas con materiales más resistentes y homogéneos, mejorando así la durabilidad a largo plazo.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Comunidad de Madrid a través del programa MADR.IB-CM/S-SAL/0312/2006, por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través del proyecto MAT2009-10258 y por la Fundación “Marcelino Botín”.

Referencias

[1] Vesely I, The evolution of bioprosthetic heart valve design and its impact on durability. *Cardiovascular Pathology*, 12 (5), 2003, pp. 277-286.

[2] Butany J and Leask R, The failure modes of biological prosthetic heart valves. *J Long Term Eff Med Implants*, 11 (3-4), 2001, pp. 115-35.

[3] Jorge E, García Páez J, and Castillo-Olivares J, Tissue heart valve mineralization: review of the mechanism of calcification and strategies for its prevention. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 3 (2), 2005, pp. 67-82.

[4] Lau L, et al., What Prosthesis Should Be Used at Valve Re-Replacement After Structural Valve Deterioration of a Bioprosthesis? *The Annals of Thoracic Surgery*, 82 (6), 2006, pp. 2123-2132.

[5] Ross R, The Pathogenesis of Atherosclerosis - an Update. *New England Journal of Medicine*, 314 (8), 1986, pp. 488-500.

[6] Haziza F, et al., Tears in bioprosthetic heart valve leaflets without calcific degeneration. *Journal of Heart Valve Disease*, 5 (1), 1996, pp. 35-39.

[7] Sacks MS and Schoen FJ, Collagen fiber disruption occurs independent of calcification in clinically explanted bioprosthetic heart valves. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62 (3), 2002, pp. 359-371.

[8] Paez JMG, et al., Effect of the suture on the durability of bovine pericardium used in cardiac bioprostheses. *Biomaterials*, 15 (3), 1994, pp. 172-176.

[9] Talman EA and Boughner DR, Internal shear properties of fresh porcine aortic valve cusps: Implications for normal valve function. *Journal of Heart Valve Disease*, 5 (2), 1996, pp. 152-159.

[10] Sellaro TL, et al., Effects of collagen fiber orientation on the response of biologically derived soft tissue biomaterials to cyclic loading. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80A (1), 2007, pp. 194-205.

[11] Flecher EM, et al., In vitro study of percutaneous aortic valve replacement: Selection of a tissue valve. *Journal of Cardiac Surgery*, 23 (3), 2008, pp. 234-238.

[12] Rabkin E and Schoen FJ, Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovascular Pathology*, 11 (6), 2002, pp. 305-317.

[13] Igual A and Saura E, Cardiovascular Surgery in Spain during 2004. The registry of the Spanish Society of Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Cirugía Cardiovascular*, 13 (3), 2006, pp. 171-184.

[14] Purinya B, et al., Biomechanical and structural properties of the explanted bioprosthetic valve leaflets. *Journal of Biomechanics*, 27 (1), 1994, pp. 1-11.

[15] García Paez JM, et al., Mechanical effects of increases in the load applied in uniaxial and biaxial tensile testing: Part I. Calf pericardium. *J Mater Sci Mater Med*, 13 (4), 2002, pp. 381-8.

[16] Sun W, et al., Response of heterograft heart valve biomaterials to moderate cyclic loading. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 69A (4), 2004, pp. 658-669.

[17] Hiester ED and Sacks MS, Optimal bovine pericardial tissue selection sites. II. Cartographic analysis. *Journal of Biomedical Materials Research*, 39 (2), 1998, pp. 215-221.

[18] Sacks MS, Smith DB, and Hiester ED, A small angle light scattering device for planar connective tissue microstructural analysis. *Annals of Biomedical Engineering*, 25 (4), 1997, pp. 678-689.

[19] Paez JMG, et al., Hysteresis of a biomaterial: Influence of sutures and biological adhesives. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 18 (5), 2007, pp. 715-724.