

## Expectativa Funcional de Biopróteses Valvulares. I. Testes Físicos e Histopatológicos para Aproveitamento de Regiões de Pericárdio Bovino

Domingo Marcolino Braile, Marcelo José Ferreira Soares, Dorotéia Rossi Silva Souza, Vladimir Aparecido Ramires, Sueli Suzigan, Marcelo Ferreira Lourenço.  
São José do Rio Preto, SP

**Objetivo** - A heterogeneidade do saco pericárdico bovino quanto à elasticidade, extensibilidade e espessura motivou o trabalho, visando o estudo de diferentes áreas do pericárdio, mapeadas de acordo com sua posição sobre o coração.

**Método** - Foram utilizados 10 sacos pericárdicos bovinos, previamente selecionados e obtidos em frigoríficos logo após o abate dos animais. Os pericárdios foram seccionados sagitalmente da porção anterior até a posterior, obtendo-se duas partes, direita e esquerda. Para cada uma delas foram demarcadas duas áreas, totalizando quatro regiões: A, B, C e D. Cada uma das quatro regiões foi subdividida em duas regiões: 1 e 1', totalizando 80 amostras. Foram aplicados testes físicos (encolhimento e resistência mecânica) e foram feitos estudo histopatológico e análise estatística.

**Resultados** - A área correspondente ao ventrículo direito (região D) teve o melhor índice de aproveitamento (21,3%), seguida da região do ventrículo esquerdo (região B - 16,2%). Os testes físicos registraram para as amostras aproveitadas valores mínimos e máximos de 0,20 e 0,40 mm para espessura, 2,0 e 7,0 kgf para força, 1,6 e 4,2 kgf/mm<sup>2</sup> para ruptura, 18 e 36% para alongação, 15 e 65 para índice de tenacidade e 85 e 87 °C para encolhimento. A região D revelou-se histologicamente mais preservada tanto para as fibras colágenas como para as elásticas.

**Conclusão** - Os resultados da análise estatística evidenciam a necessidade de se aumentar o tamanho da amostra para a certificação da existência de uma secção do pericárdio e de uma posição mais adequada do corpo de prova (longitudinal, transversal e oblíqua) na retirada do retalho de pericárdio para a confecção de bio-

## Functional Expectation of Valve Bioprosthesis. I. Bovine Pericardium Mapping for Use of Sections According to Physical and Histopathological Tests

**Purpose** - The heterogeneity of the bovine pericardium sac regarding its elasticity, extensibility and thickness encouraged the work with the purpose to study the different areas of pericardium, mapped according to its position on the heart.

**Method** - Ten bovine pericardium sacs previously selected and obtained at the slaughter-house immediately after the animal slaughter were utilized. The pericardia were sectioned sagittally from the anterior to the posterior portion, thus obtaining two parts, right and left. Two areas were demarcated for each one of them amounting to four regions: A, B, C and D. Each of the four regions was divided into two regions: 1 and 1', amounting to 80 samples. There have been physical tests (shrinkage and mechanical resistance), histopathological studies and statistical analysis were done.

**Results** - The right ventricle area (region D) had the best utilization (21.3%), and then the left ventricle area (region B, 16.2%). The physical tests on the utilized samples showed minimum and maximum values of 0.20 and 0.40 mm for the thickness, 2.0 and 7.0 kgf for force, 1.6 and 4.2 kgf/mm for rupture, 18 and 36% for stretching, 15 and 65 for tenacity index and 85 and 87°C for shrinkage. The region D presented histologically and more preserved, either for the collagen fibers or the elastic ones.

**Conclusion** - The results of the statistical analysis proved the need to increase the sample size to certify the existence of a sectioning of the pericardium and a more adequate position of the proof body (longitudinal, transversal and oblique) when obtaining the pericardium flap to make the valve bioprosthesis.

próteses valvulares.

*Palavras-chave:* pericárdio bovino, controle de qualidade, válvulas biológicas

*Key-words:* bovine pericardium, quality control, bioprosthesis.

### Arq Bras Cardiol, volume 59, nº 3, 169-175, 1992

Existe um consenso mundialmente reconhecido de que as válvulas mecânicas apresentam diminuta frequência em sua falência intrínseca, embora exijam um tratamento contínuo do paciente pelo elevado risco de tromboembolismo<sup>1-6</sup>. As válvulas biológicas, por outro lado, apresentam menor risco de tromboembolismo, mesmo sem o uso de anticoagulantes, proporcionando melhor qualidade de vida ao paciente, todavia a sua durabilidade ainda é imprevisível<sup>7-9</sup>.

No Brasil, a etiologia mais comum para as lesões valvares é a doença reumática, com um grande número de pacientes necessitando de prótese para substituição da valva lesada. O Instituto de Moléstias Cardiovasculares (IMC), diante de facilidades e resultados satisfatórios, tem desenvolvido e empregado preferencialmente próteses de pericárdio bovino em posição atrioventricular, principalmente pelo fato desse tecido apresentar características mecânicas adequadas, além da sua abundância na região de São José do Rio Preto. Entretanto, o saco pericárdico bovino apresenta grandes variações nas suas propriedades como, por exemplo, diferentes graus de extensibilidade e elasticidade, áreas de espessura variada, presença de vasos sanguíneos, tecido de transição e conteúdo de colágeno ora denso, ora quase transparente<sup>10</sup>. Esta variação explica a importância de um controle de qualidade rigoroso na seleção de material destinado à confecção de biopróteses, o que certamente influenciará na sua durabilidade. A heterogeneidade do saco pericárdico bovino motivou o presente trabalho, na tentativa de mapeamento das regiões pericárdicas através do estudo de cada área, considerando-se as variáveis analisadas no controle de qualidade.

#### Método

Foram utilizados 10 sacos pericárdicos bovinos previamente selecionados, obtidos em frigoríficos logo após o abate de animais. A idade média dos animais variou de 18 a 36 meses, sendo todos machos castrados, sem distinção de raça, peso, alimentação ou qualquer parâmetro diferencial.

O esterno foi aberto imediatamente após o abate e o pericárdio retirado através de incisões na sua parte

superior e posterior. Os pericárdios foram mergulhados e transportados em solução hipertônica de NaCl 1,2% com solução de MgSO<sub>4</sub> 8 mOsmóis, balanceada a pH 7,4 com tampão fosfato a 4 °C. No laboratório, os pericárdios foram lavados na referida solução, e o processo de limpeza deu-se com a retirada de gorduras e aderências. A seleção foi feita através de foco luminoso polarizado, inspecionando-se a textura e a transparência, visando o aproveitamento de regiões homogêneas quanto à orientação e à concentração das fibras. Os pericárdios foram seccionados sagitalmente da porção anterior até a posterior, obtendo-se duas partes, direita e esquerda. Para cada uma delas foram demarcadas duas áreas, totalizando 4 regiões: A, B, C e D (fig. 1): região A - área proximal dos grandes vasos da base, compreendendo a porção atrial direita e uma pequena parte do ventrículo direito; região B - compreende todo o ventrículo esquerdo (apex); região C - átrio esquerdo e pequena parte do ventrículo esquerdo; região D ventrículo direito.

Os pericárdios foram fixados em bastidores de plástico de 16 cm de diâmetro, com tensão controlada para evitar dobras ou estiramento excessivo do tecido como mostra a figura 2.

O tratamento do pericárdio foi feito em três etapas com solução glutaraldeído (GA) purificado a 0,5% e balanceada a pH 7,4 com tampão fosfato a 0,13M. Inicialmente os pericárdios permaneceram nesta solução em temperatura ambiente por 3 h.

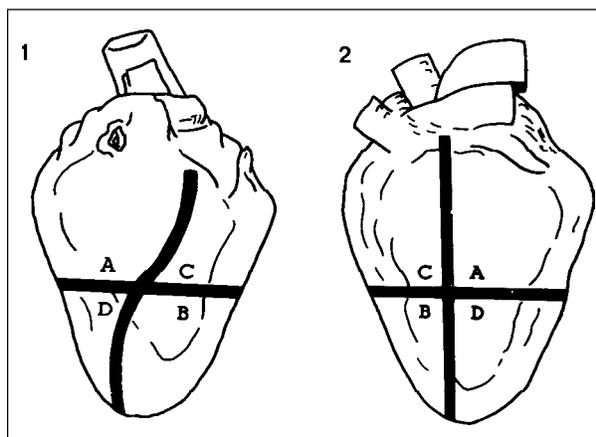


Fig. 1 - Regiões anterior (1) e posterior (2) do coração com demarcação do saco pericárdico bovino em quatro áreas A, B, C e D.

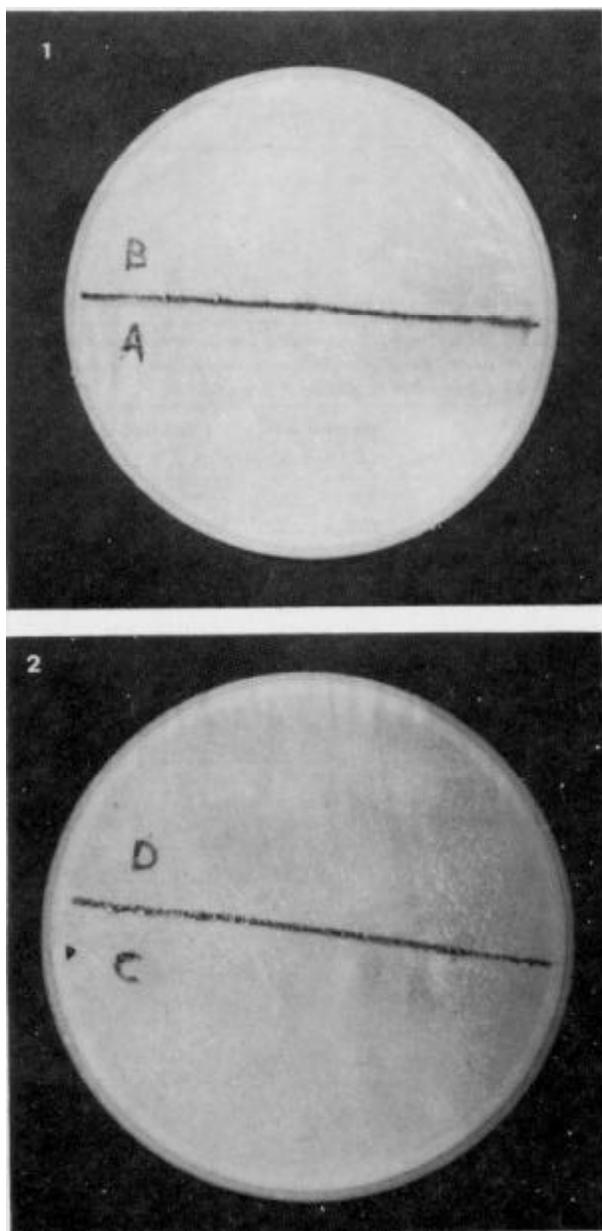


Fig. 2 - Fixação das regiões A e B (1) e C e D (2) do pericárdio em bastidores de plástico para tratamento com glutaraldeído.

Após este período, os pericárdios foram conservados em nova solução de GA em temperatura de 4 a 6°C durante três dias. A solução de GA foi novamente trocada e nela os pericárdios permaneceram mais 12 dias na mesma temperatura. Posteriormente, os pericárdios foram colocados individualmente em cubas com 300 ml de GA por 3 dias a 23 °C. Em seguida, cada amostra foi mantida em 300 ml de solução de formaldeído a 4% balanceada com tampão acetato 0,2M a pH 5,4. Cada pericárdio foi tratado com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 volume, visando a retirada de substâncias antigênicas, restos celulares, além de aumentar a resistência do tecido. No final do pro-

cesso, cada uma das quatro regiões do pericárdio foi subdividida aleatoriamente em 2 regiões: 1 e 1', totalizando, portanto, 80 amostras.

Os testes físicos consistiram em testes de encolhimento e de resistência mecânica (ruptura, alongação e índice de tenacidade)<sup>11,12</sup>. Utilizou-se corpo de prova de 8 cm x 2,5 cm.

**Teste de encolhimento:** permitiu avaliar a ação do GA sobre as fibras colágenas no processo de preservação do pericárdio. O encurtamento padrão considerado foi de 20% diante da variação de temperatura de 1 °C por minuto. Neste momento foi determinada a temperatura de encolhimento que representa o ponto em que a proteína é desnaturada pelo calor. Considerou-se 83 °C a temperatura mínima para garantia de fixação adequada das fibras colágenas pelo GA.

**Tensão de ruptura (R):** expressa em kgf/mm<sup>2</sup>, representou o ponto máximo de tensão que o corpo de prova pode suportar no momento de sua ruptura, obtido através de:  $R = F/(E \times K)$ , onde F = força em kgf, E = espessura do corpo de prova em mm e K = largura do corpo de prova (constante - 6 mm - ASTM - D 638 da American Society for Testing and Materials).

**Elongação (E)** - deformação longitudinal elástica da amostra até a ruptura, mínimo de aproveitamento de 17,5%. Este índice foi obtido por:  $E = (L_{(final)} - L_{(inicial)} \times 100)/C$ , onde L<sub>final</sub> = comprimento final do corpo de prova no momento da ruptura, L<sub>inicial</sub> = comprimento inicial do corpo de prova e C = comprimento do corpo de prova (constante - 80 mm - ASTM - D - 638 da American Society for Testing and materials).

**Índice de tenacidade (IT)** - representou a energia necessária para romper o material, com limite mínimo de aproveitamento de 11,5. Este índice foi dado por:  $T = R \times E/2$ , onde R = tensão de ruptura em kgf/mm<sup>2</sup> e E = alongação em %.

Os testes físicos foram padronizados através de estudos feitos pelo IMC com grupos de amostras de pericárdios frescos e tratados, determinando-se os valores limites para cada tipo de teste com base nas médias obtidas para ambos os tipos de pericárdios.

Foram avaliadas fundamentalmente as fibras colágenas e elásticas em seções coradas pelo tricrômico de Gomori, pela hematoxilina e eosina, pelo PAS e pelo método de Verhoeff. Avaliaram-se padrões histopatológicos como infiltrados inflamatórios, tumorais ou alterações degenerativas. O maior motivo para descarte foi a degeneração basofílica, correspondente a menor elasticidade do tecido susceptível à ruptura.

Para avaliação dos resultados dos testes físicos, foram utilizados procedimentos estatísticos descritti-

vos, teste "t" de Student para variâncias ponderadas e análise de correlação<sup>13</sup>. Os níveis de significância foram fixados em 5 e 1%.

## Resultados

Foram analisados 10 sacos pericárdicos divididos em 4 áreas (A, B, C e D), subdivididos em duas partes (A-A', B-B', C-C' e D-D'), totalizando 80 amostras, sendo que 54 destas (67,0%) foram aproveitadas e, o restante, descartadas considerando-se os parâmetros pré-estabelecidos. A análise de cada uma das quatro áreas mostrou uma freqüência maior de aproveitamento da região D (21,3%), seguida da região B (16,2%) (tab. I). Entretanto não houve diferença significativa entre as freqüências observadas e esperadas de aproveitamento e descarte para as quatro regiões ( $X^2$  de homogeneidade = 2,05;  $p > 0,05$ ).

Foram registrados para as variáveis consideradas valores mínimos e máximos, assim encontrados entre as amostras aproveitadas: para espessura 0,20 e 0,40 mm, para força 2,0 e 7,0 kgf, para ruptura 1,6 e 4,2 kgf/mm<sup>2</sup>, alongação 18 e 36%, índice de tenacidade 15 e 65, e para encolhimento 85 e 87 °C. Para as amostras descartadas, os valores variaram de: 0,20 a 0,36 mm (espessura), 1,0 a 7,0 kgf (força), 0,5 a 5,0 kgf/mm<sup>2</sup> (ruptura), 10,0 a 32% (alongação), 5,0 a 40,0 (índice de tenacidade) e 85 a 88 °C (encolhimento). Observou-se que as amostras descartadas apresentaram, para a maioria das variáveis (força, ruptura, alongação e índice de tenacidade), valores mínimos fora da normalidade aceitável, justificando, portanto, sua rejeição (fig. 3). As médias e os desvios-padrão para cada variável encontram-se na tabela II. Os valores dos testes "t" para diferença entre as médias das variáveis, para as amostras aproveitadas e descartadas, foram todos significativos ( $p < 0,01$ ), exceto para a variável espessura ( $p > 0,05$ ).

Considerando-se as diversas variáveis foram calculados coeficientes de correlação de 10 combinações entre as 6 variáveis para as 80 amostras (tab. III). O grupo das amostras aproveitadas mostrou associação significativa ( $p < 0,01$ ) somente entre as variáveis espessura e força, e entre alongação e índice de tenacidade. No grupo das descartadas, apenas houve associação significativa entre espessura e alongação ( $p < 0,01$ ) e ruptura e alongação ( $p < 0,05$ ).

Foram analisadas para cada pericárdio duas amostras de cada região, totalizando 8 amostras por pericárdio (AA', BB', CC' e DD'). O exame histopatológico resultou da análise de fibras colágenas e elásticas descrita a seguir:

**Fibras colágenas** (fig. 4): região A- fibras ex-

Tabela I - Número de amostras aproveitadas para cada uma das quatro regiões mapeadas A, B, C e D.

Regiões	Aproveitadas	
	Nº	%
A	12	15,0
B	13	16,2
C	12	15,0
D	17	21,3
Total	54	67,5

Tabela II - Médias e desvios-padrão das variáveis consideradas nos testes físicos para as amostras aproveitadas e descartadas (t para diferença entre as médias; \*\*:  $p < 0,01$ ).

Variáveis	Aproveitadas	Descartadas	t <sub>(78)</sub>
	X ± S	X ± S	
Espessura (mm)	0,25 ± 0,05	0,25 ± 0,05	zero
Força (kgf)	4,10 ± 1,22	2,79 ± 1,77	3,42 **
Ruptura (kgf/mm <sup>2</sup> )	2,73 ± 0,65	1,95 ± 1,31	2,86 **
Elongação (%)	25,02 ± 4,55	18,13 ± 5,74	5,37 **
Índice de tenacidade	35,00 ± 12,10	16,35 ± 9,01	7,74 **
Encolhimento (0 °C)	85,91 ± 0,45	86,23 ± 0,59	2,48 **

\* Valores normais: Espessura = 0,20 - 0,40; força = 2,5 - 7,0 kgf; ruptura = acima de 1,5 kgf/mm<sup>2</sup>; alongação = acima de 17,5%; índice de tenacidade = acima de 11,5; encolhimento = acima de 83°C.

Tabela III - Valores de "r" para as análises de correlação entre as variáveis dos testes físicos para as amostras aproveitadas e descartadas (t para significância de r; \* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ).

Combinações das variáveis	Aproveitadas		Descartadas	
	r	t <sub>(52)</sub>	r	t <sub>(24)</sub>
1 X 2	0,619	5,68**	- 0,430	0,21
1 X 4	0,182	1,34	0,625	3,92**
1 X 6	- 0,170	1,24	- 0,090	0,44
2 X 4	0,252	1,88	- 0,348	1,82
2 X 6	- 0,179	1,31	- 0,187	0,93
3 X 4	- 0,208	1,53	- 0,447	2,45*
3 X 6	- 0,105	0,76	- 0,134	0,66
4 X 5	0,614	5,60**	- 0,117	0,58
4 X 6	- 0,220	0,16	zero	zero
5 X 6	- 0,103	0,74	- 0,194	0,97

1 = espessura; 2 = força; 3 = ruptura; 4 = alongação; 5 = índice de tenacidade; 6 = encolhimento.

tremamente estiradas com contorno pouco nítido, destacando-se das demais regiões e presença de alteração tintorial moderada; região B - fibras moderadamente estiradas com contorno pouco nítido e discreta alteração tintorial; região C - fibras discretamente estiradas com ondeamento acentuado e moderada alteração tintorial; região D - fibras moderadamente estiradas com fibras distintas entre si e discreta alteração tintorial.

**Fibras elásticas** (fig. 5): região A - fibras presentes em pouca quantidade, fragmentadas na periferia e estiradas na região central com variação acentuada da espessura; região B - fibras em quantidade moderada, com acentuada fragmentação e discreta variação da espessura; região C - fibras em quantidade moderada, evidência discreta de fragmentação e variação discreta

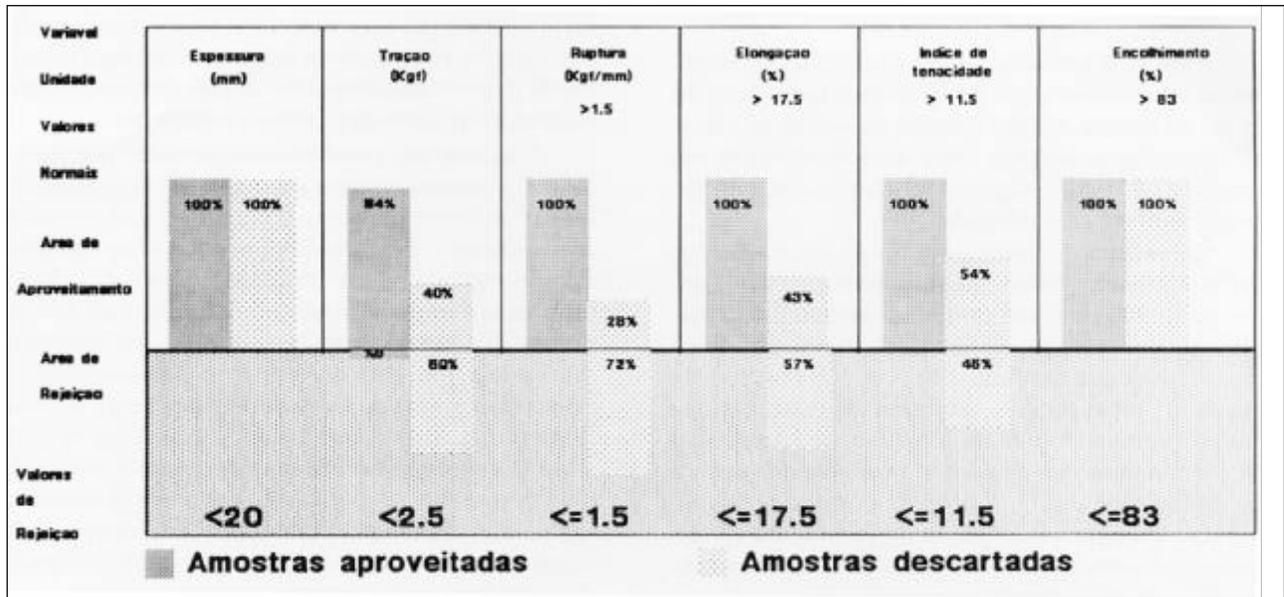


Fig. 3 - Identificação das frequências de aproveitamento e rejeição entre as amostras aproveitadas e rejeitadas, considerando os valores normais das variáveis e os valores mínimos fora da normalidade aceitável.

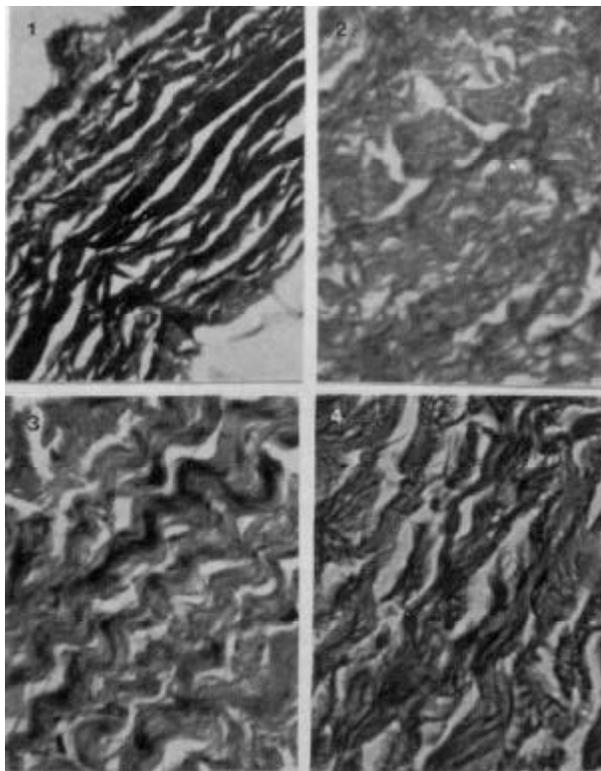


Fig. 4 - Cortes histológicos do pericárdio bovino focalizando fibras colágenas das regiões mapeadas. Coloração por tricrômico de Gomori. 1) fibras estiradas com alteração tintorial; 2) fibras com limites pouco nítidos; 3 e 4) fibras com ondamento normal.

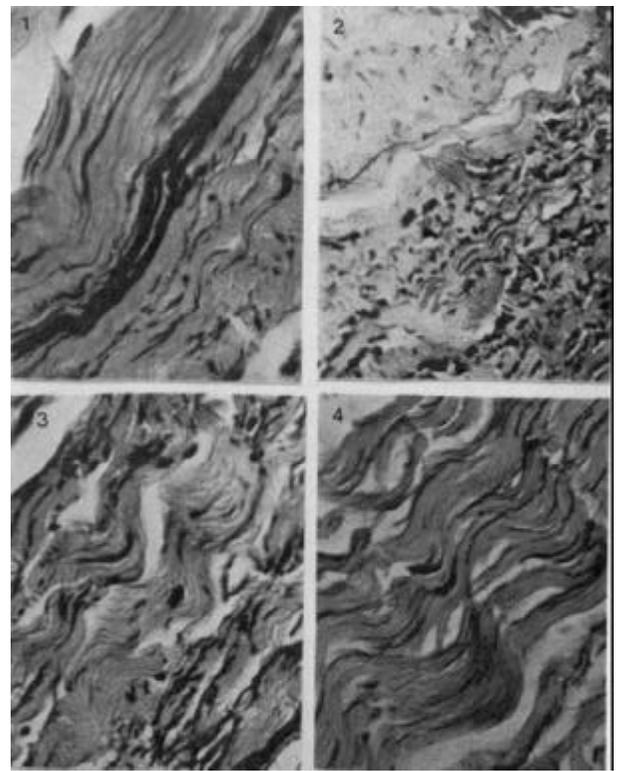


Fig. 5 - Cortes histológicos de pericárdio bovino focalizando fibras elásticas das regiões mapeadas. Coloração por orceína. 1) fibras elásticas de diferentes espessuras e fragmentadas na periferia; 2 e 3) fibras com discreta variação de espessura e acentuada fragmentação das fibras em 2 e discreta fragmentação em 3; 4) fibras elásticas de espessura uniforme e sem fragmentação significativa.

de espessura; região D - fibras com distribuição uniforme multidirecional em quantidade discretamente aumentada quando comparada às outras regiões, onduladas, raramente fragmentadas com espessura média e uniforme.

A região D revelou-se histologicamente a mais preservada, tanto para as fibras colágenas como para as elásticas.

## Discussão

A falência primária tecidual tem sido a complicação mais importante das próteses biológicas ao longo do tempo. A deterioração da estrutura valvular tem influenciado sua durabilidade refletindo em estenose e regurgitação decorrentes de calcificação, ruptura e/ou desgaste<sup>5,8,9,11</sup>.

Entretanto, existe uma ampla variação no período de durabilidade das biopróteses valvulares. Em sistemas de teste de fadiga registrou-se disfunção dessas próteses já em 2 a 3 milhões de ciclos e, até mais tardiamente, em 100 milhões de ciclos<sup>7</sup>. Certas regiões são mais expostas ao desgaste, em decorrência da movimentação anormal de fechamento das cúspides, provocando ruptura do tecido valvular<sup>14</sup>. A própria posição atrioventricular gera grande estresse mecânico em consequência da alta pressão intraventricular, causando calcificação e ruptura<sup>15</sup>.

É evidente que a durabilidade das biopróteses valvulares é controlada por diversos fatores, entre eles idade<sup>16,17</sup>, fatores metabólicos<sup>9,18,20</sup> tempo e posição do implante<sup>16,21</sup>, estresse mecânico<sup>15,22,23</sup>, tratamento e preparação do tecido<sup>9,11,18,19</sup>, técnica de manufatura<sup>10,11</sup>, controle de qualidade<sup>11,24</sup>, fatores cirúrgicos<sup>10</sup> e, certamente, pela heterogeneidade do tecido<sup>10,11,25,26</sup>. A variação na distribuição das fibras elásticas e colágenas pelo tecido pericárdico interfere na consistência do material que, em consequência, apresenta áreas pouco espessas, quase transparentes, e regiões mais resistentes<sup>10,25,26</sup>.

Este trabalho sustenta os achados relatados quanto à heterogeneidade do pericárdio bovino<sup>10,24,26</sup>, e sugere que, embora haja nítida variação na quantidade de fibras colágenas e elásticas entre as quatro regiões mapeadas, a região D, ou seja, a área correspondente ao ventrículo direito, foi a menos descartada pelos testes físicos, com índice de aproveitamento de 21,3%.

Esta região parece reunir maior número de variáveis satisfatórias e importantes para o pericárdio destinado à confecção de biopróteses. Isto advém, provavelmente, de sua localização, correspondendo a área do ventrículo direito, que ao contrário do lado esquerdo do coração, trabalha mais com volume e não sob pressão, o que possivelmente conferiria um maior poder de distensibilidade do saco pericárdico, determinando assim ao longo do tempo uma melhor organização adaptativa da citoarquitetura desta região. Com o exame histopatológico evidenciou-se melhor preservação das fibras colágenas e elásticas da região D, mantendo-se principalmente sua onduação natural e ausência de fragmentação. No entan-

to, para uma confirmação decisiva proveniente do estudo das diferentes regiões do pericárdio, julga-se necessário o aumento da amostragem, desde que estatisticamente não há diferença significativa entre as quatro regiões estudadas.

A análise das variáveis consideradas nos testes físicos mostrou valores de t (tab. II) significativamente diferentes entre as médias das secções aproveitadas e descartadas, para todas as variáveis exceto espessura. De um modo geral, as médias para as amostras aproveitadas foram maiores do que as descartadas, sugerindo ser este material mais adequado para a confecção das biopróteses como era esperado. As variáveis espessura e encolhimento apresentaram valores semelhantes para os dois grupos, significando rigor técnico na medida da espessura do pericárdio e eficiência do método de tratamento pelo glutaraldeído, preservando adequadamente as fibras, independente da qualidade do material. No entanto, as demais variáveis apresentaram índices elevados de valores mínimos como o de 72% das amostras rejeitadas com índice de ruptura inferior a 1,5 kgf/mm<sup>2</sup>. Merecem destaque também a força (60%), a alongação (57%) e o índice de tenacidade (46%), contra 100% das amostras aproveitadas com valores normais de aceitação para as variáveis, exceto a força, com apenas 6% das amostras dentro da área de rejeição (fig. 3)

Na tentativa de se procurar possíveis associações entre a seis variáveis, foram detectadas entre as secções aproveitadas apenas duas associações significativas, ou seja, entre espessura e força, e alongação e índice de tenacidade. No primeiro, caso como era esperado, a tensão exercida sobre o pericárdio variou proporcionalmente conforme a sua espessura. O índice de alongação é calculado usando-se o valor de alongação na razão direta, o que torna esperada a associação significativa entre as duas variáveis. Por outro lado, essa mesma associação não foi significativa para as amostras descartadas, o que possivelmente pode ser explicado pela má qualidade das fibras reduzindo a proporcionalidade entre as variáveis. Desse mesmo modo, podem ser explicadas também as diferenças nas demais associações significativas e não significativas entre as mesmas combinações para as amostras aproveitadas e descartadas.

Concluindo, os resultados da análise estatística evidenciam que o pericárdio bovino não apresenta diferenças regionais suficientes para indicar escolha de determinada região para a confecção de biopróteses. Entretanto, o exame histológico revelou melhor preservação das fibras colágenas e elásticas, sugerindo que a região D seja mais adequada para a confecção de biopróteses. Contudo, há necessida-

de de um aumento no tamanho da amostra para esclarecer a existência ou não de diferenças regionais no pericárdio bovino, além de investigação da posição mais adequada do corpo de prova (longitudinal, transversal e oblíquo) na retirada da amostra de pericárdio, que nesse trabalho foi aleatória.

### Agradecimento

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Rossi (Departamento de Patologia - USP - Ribeirão Preto), pela revisão final e sugestões importantes na conclusão deste trabalho, e à Divisão de Pesquisas e Publicações (DPP) (Braile-Biomédica São José do Rio Preto, SP), pela colaboração na montagem do trabalho.

### Referências

1. Cobanoglu A, Fessler CL, Guvendik L, Grunkmeier G, Starr A - Aortic valve replacement with the Starr-Edwards prosthesis: a comparison of the first and second decades of follow-up. *Ann Thorac Surg*, 1988; 45:248-52.
2. Edmunds LH Jr. - Thromboembolic complications of current cardiac valvular prosthesis. *Ann Thorac Surg*, 1982; 34: 96-106.
3. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro J - Prevention of thromboembolism induced by prosthetic heart valves. *Semin Thromb Hemost*, 1988;14: 50-8.
4. Schoen FJ - Cardiac valve prosthesis: review of clinical status and contemporary biomaterials issues. *J Biomed Mater Res*, 1987; 21: 91-117.
5. Starr A, Grunkemeier GL - Prosthetic heart valves. *Cur Opin Cardiol*, 1987; 2: 822-8.
6. Stein PD, Kantrowitz A - Antithrombotic therapy in mechanical and biological prosthetic heart valves and saphenous vein bypass grafts. *Chest*, 1989; 95:107-17.
7. Gabbay S, Mueller E - Clinical predictive value of in vitro accelerate fatigue testing of heart valve bioprosthesis. In: *Annual of the American Association for the Advancement of Medical Instrumentation*. St. Louis, International Association for Cardiac Biological Implants, 1989.
8. Schoen FJ - Cardiac valve prosthesis: pathological and bioengineering considerations. *J Cardiac Surg*, 1987; 2: 65-102.
9. Schoen FJ, Kujovich JL, Levy RJ, Sutton M -St. Jude bioprosthetic valve failure. *Cardiovasc Surg*, 1988; 18: 289-317.
10. Gabbay S, Welch H - Reducing the variability in durability of heart valve bioprosthesis. *Trans AM Soc Artif Intern Organs*, 1988; 34: 1022-6.
11. Braile DM - IMC valve percardial valve 11 years. *J Cardiac Surg* (in press).
12. Carvalho G - Influência de ligações cruzadas nas propriedades mecânicas de biopolímeros utilizados em próteses cardíacas (Tese mestrado). São Carlos, Universidade de São Paulo, 1980: 95.
13. Zar JH - *Bioestatistical Analysis*. 10 ed. Englewood Cliffs, N.J. Prentice-Hall, 1974. p. 620.
14. Wheatley DJ, Fisher J, Reece IJ, Spyt T, Breeze P - Primary tissue failure in pericardial heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1987; 94: 367-74.
15. Bortolotti U, Milano A, Mazzucco A et al - The Hancock pericardial xenograft: incidence of early mechanical failures at a medium-term follow-up. *Eur J Cardio-thorac Surg*, 1988; 2: 458-64.
16. Jamieson WRE, Rosado LJ, Munro Al et al - Carpentier-Edwards standard porcine bioprosthesis: primary tissue failure (structural valve deterioration) by age groups. *Ann Thorac Surg*, 1988; 46: 155-162.
17. Reul GJ Jr., Cooley DA, Duncan JM et al - Valve failure with the Ionescu-Shiley bovine pericardial bioprosthesis: analysis of 2680 patients. *J Vasc Surg*, 1985; 2: 192-204.
18. Levy RJ, Schoen FJ, Howard SL - Mechanism of calcification of porcine bioprosthetic aortic valve cusps: role of T-lymphocytes. *Am J Cardiol*, 1983; 52: 629-31.
19. Levy RJ, Hawley MA, Schoen FJ, Lund SA, Liu PY - Inhibition of diphosphonate compounds of calcification of porcine bioprosthetic heart valve cusps implanted subcutaneous in rats. *Circulation*, 1985; 71: 349-56.
20. Rocchini AP, Weesner KM, Heidelberger K, Keren D, Berendt D, Rosenthal A - Porcine xenograft valve failure in children: an immunologic response. *Circulation*, 1981; 64:III162-71.
21. Magilligan DJ, Lewis JW, Heizerling RH, Smith D - Fate of a second porcine bioprosthetic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1983; 85: 362-70.
22. Fiddler GI, Gerlis LM, Walker DR, Scott O, Williams GJ - Calcification of glutaraldehyde preserved porcine and bovine xenograft valves in young children. *Ann Thorac Surg*, 1983; 35: 257-61.
23. Odell JA - Calcification of porcine bioprosthesis in children. In: Cohn LH, Gallucci V, eds - *Cardiac Bioprosthesis*. New York, Yorke Medical, 1982: 231-7. (Proceedings of the International Symposium on Cardiac Bioprosthesis, 2, Rome, 17-19 May, 1982).
24. Braile DM - Prótese valvular de pericardio bovino: desenvolvimento e aplicação clínica em posição mitral (Tese Doutorado). São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1990: 110.
25. Barbenal JC, Zioupos P, Fisher J - The mechanical properties of bovine pericardium. *Heart Valve Engineering*, 1986; 99: 201-4.
26. Trowbridge EA, Crofts CE - A method of quality control for the mechanical properties of pericardial bioprosthetic leaflets. In: *Eight Annual Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society*: 202-205.