



FACTORES QUE LIMITAN LA DURABILIDAD DE LOS INJERTOS EN CIRUGÍA CARDIACA Y VASCULAR.

Rafael Villalba, Jose Luis Gómez Villagrán.

Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco Sectorial de Tejidos de Córdoba.

En el año 1956 Gordon Murray publicó el uso de un homoinjerto valvulado fresco, implantado en la aorta torácica para el tratamiento de una insuficiencia valvular (1). Este trabajo dio paso con posterioridad a las publicaciones en 1962 de Donald Ross en Inglaterra y Barrat Boyes en Nueva Zelanda sobre el uso clínico al empleo de homoinjertos aórticos, lo que abrió un enorme campo dentro de la Cirugía Cardiovascular (2).

Como consecuencia de la limitación en la disponibilidad de donantes y por tanto en la disponibilidad de tejido para trasplante, las investigaciones se orientaron al incremento en los tiempos de almacenamiento mediante diferentes técnicas. El resultado final ha sido la creación de manera efectiva de los Bancos de Válvulas, estructuras que perduran hasta la actualidad.

Si bien gran número de procedimientos de preservación se han evaluado hasta la fecha, la criopreservación se mantiene como el más adecuado (3) ofreciendo los mejores resultados sobre durabilidad del tejido una vez implantado.

A pesar de una meticulosa técnica en la manipulación de los injertos, con frecuencia concurre un deterioro estructural; manifestado como la calcificación y degeneración de la válvula, lo que con frecuencia ocasiona la alteración funcional y obliga a la reintervención (4). A nivel de componentes celulares, los primeros cambios parecen observarse tras uno o dos días de implante, mediante una marcada pérdida de estos elementos, observación puesta de manifiesto mediante tinciones de hematoxilina-eosina así como inmunohistoquímica.

Hacia los dos meses tras implante, la gran mayoría de componentes celulares parecen corresponder a células mononucleares de carácter inflamatorio (macrófagos y linfocitos T) que con toda probabilidad derivan del receptor.

Entre los 6 meses y el año la estructura trilaminar aparece hialinizada. (4).

La evidencia científica en este campo es numerosa y hoy en día tenemos un conocimiento más profundo sobre la biología de los injertos cardiovasculares, su comportamiento tras implante así como de los factores que parecen pueden contribuir a su durabilidad.

En primer lugar el *periodo de isquemia caliente* ha sido considerado uno de los primeros parámetros críticos. Mediante estudios de microscopía electrónica y análisis morfométricos, tras un tiempo de 2 horas de isquemia caliente el daño celular se aprecia ya en el 37% de las células, porcentaje que aumenta a un 73% tras un periodo de 6 horas (5).

A estas observaciones se añadieron los trabajos en los que se puso de manifiesto mediante cromatografía de alta afinidad la existencia de una depleción de los nucleótidos de adenina como consecuencia de la manipulación de las estructuras, quedando los componentes celulares en una situación de teórico "agotamiento" haciéndolas más susceptibles a un ulterior daño de isquemia-repercusión (6).

El grupo de Hilbert (7) observa el desarrollo de cambios acontecidos hacia los 2 días de implante, con un pico máximo hacia los 14 días, consistiendo pérdida de la capacidad mitótica de las células y daño por apoptosis, sugiriendo por tanto que el control de factores que minimicen estos fenómenos podría contribuir a mitigar sus efectos.

Otros autores han sugerido la necesidad de *revitalización* del tejido una vez descongelado. En este sentido se ha observado que la incubación de las válvulas una vez descongeladas en cultivo a 37°C en medio con 15% de suero durante 8 días restaura en la población celular normal las reservas de energía y la composición de la matriz (8).



No obstante nuestro grupo ha podido observar, que aún con un estricto control de las variables de criopreservación y evitando el periodo de isquemia caliente existe 23,5% de muerte celular por apoptosis (9), daño irreversiblemente cuantificado independiente de las alteraciones bioquímicas.

Lu (10) pudo caracterizar de manera mas precisa ciertas *alteraciones bioquímicas* mediante la reducción de las sales de tetrazolio, apreciando un marcado descenso de la actividad metabólica, aún mas significativo si añadimos la criopreservación, sugiriendo por tanto que la cadena respiratoria queda severamente dañada (10)

Se vuelve de nuevo a enfatizar sobre *la preservación celular*, como elemento en el mantenimiento de la homeostasis del injerto, al menos durante un tiempo tras implante, hasta quedar consolidado el quimerismo celular con los componentes celulares del receptor (11)

El conocimiento existente en la actualidad sobre *la matriz extracelular* es importante, circunstancia que parece contribuir a una mejor preservación de la viabilidad celular y por tanto a la durabilidad de los injertos. La evidencia acumulada parece mostrar que el daño que se induce tras criopreservación, depende en gran medida de la formación de hielo extracelular sugiriéndose que técnicas de vitrificación podrían minimizar estos fenómenos (12).

No obstante la discusión sobre el objetivo de mantener la viabilidad celular al máximo existe, sobre la base de conferir un mayor grado de *inmunogenicidad* y por tanto posibilidad de degeneración (13, 14, 15). La implantación de injertos valvulares se realiza rutinariamente sin tener en cuenta una compatibilidad HLA además de no usar agentes inmunosupresores. Los homoinjertos viables han demostrado que son capaces de poner en marcha una respuesta inmunológica, tanto celular como humoral frente a determinante HLA del donante (16). En este sentido aquellas variables que dan lugar a injertos de mayor viabilidad: donantes jóvenes o corto periodo de almacenamiento, parecen ocasionar estenosis pulmonar en la técnica de Ross (17).

Esta circunstancia ha llevado a barajar la posibilidad de trabajar sobre injertos descelularizados los cuales y a pesar de prometedores estudios iniciales (18), comienzan a mostrar significativas limitaciones (19).

En estudios inmunohistoquímicos se ha demostrado que el principal grupo de células que expresan antígenos de histocompatibilidad clase II son probablemente las células dendríticas situadas por debajo del endotelio y en la matriz de la válvula. Taylor (20) ha publicado que este grupo de células muestran una óptima supervivencia tras someterse a *velocidades de enfriamiento* entre 0,3 y 1,5°C pero reduciéndose marcadamente su supervivencia si aceleramos esta velocidad.

Ketheesan (21) observa que criopreservando válvulas a una velocidad de enfriamiento de 1°C/min se conserva su potencial inmunógeno, por el contrario elevando esta velocidad a 10°C/min se reduce significativamente su inmunogenicidad.

Schenke-Leyland (22) ha descrito una técnica de *vitrificación* a la que junto al empleo de una mezcla de crioprotectores, incrementa la velocidad de enfriamiento, alcanzándose buena preservación tanto de las células como de la matriz extracelular, sugiriendo la vitrificación como un método adecuado de conservación.

De ser operativo en la práctica clínica las técnicas de vitrificación, podríamos encontrarnos ante una modalidad de conservación que, paralelamente a la conservación de stocks de injertos durante periodos prolongados de tiempo, conservaríamos satisfactoriamente la matriz extracelular, así como el componente celular, pero que paralelamente y por el comportamiento criobiológico dañaríamos las células presentadoras de antígeno y por tanto su potencial inmunógeno.

En base al conocimiento existente minimizar el estrés oxidativo durante el procesamiento así como tras implante podría ser otro factor añadido al mantenimiento de estructuras de larga duración.



Referencias.

1. Murray G. Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology* 1956; 7:466-471.
2. Hopkins R. From cadaver harvest homograft valves to tissue-engineered valve conduits. *Progress in Pediatric Cardiology* 2006; 21:137-152.
3. O'Brien MF, et al. The homograft aortic valve: a 29 year, 99.3% follow up of 1,022 valve replacements. *J Heart Valve Disease* 2001; 10: 334-344.
4. Mitchell RN, et al. Structure function correlations in cryopreserved allograft cardiac valves. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:5108-5113.
5. Crescenzo DG, et al. Donor heart valves: electron microscopic and morphometric assessment of cellular injury induced by warm ischemia. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1992; 103: 253-258.
6. Messier Jr RH, et al. High-energy phosphate depletion in leaflet matrix cells during processing of cryopreserved cardiac valves. *Journal Surgery Research* 1992; 52: 483-488.
7. Hilbert SL, et al. Allograft heart valves: the role of apoptosis-mediated cell loss. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117: 454-462.
8. Messier R, et al. Interstitial cellular matrix restoration of cardiac valves following cryopreserved. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 118: 36-49.
9. Villalba R, et al. Characterization of ultrastructural damage of valves cryopreserved under standard conditions. *Cryobiology* 2001, 43: 81-84.
10. Lu JH, et al. Metabolic detriment in donor heart valves induced by ischemia and cryopreservation. *Ann Thorac Surg* 1998; 65:24-27.
11. Koolbergen DR, et al. Tissue chimerism in human cryopreserved homograft valve explants demonstrated by in situ hybridization. *Ann Thorac Surg* 1998; 66:S225-232.
12. Schenke-Layland K, et al. Impact of cryopreservation on extracellular matrix structures of heart valve leaflets. *Ann Thorac Surg* 2006; 81:918-927.
13. Hoekstra F, et al. Stimulation of immune competent cells in vitro by human cardiac valve derived endothelial cells. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S131-134.
14. Armiger L. Postimplantation leaflet cellularity of valve allografts: are donor cells beneficial or detrimental? *Ann Thorac Surg* 1998; 66:S233-235.
15. Khatib H, et al. Antigenicity of fresh and cryopreserved rat valve allografts. *Transplantation* 1990; 49: 765-767.
16. Oei FB, et al. The presence of immune stimulatory cells in fresh and cryopreserved donor aortic and pulmonary allografts. *J Heart Valve Dis* 2002; 11: 315-324.
17. Raanani E, et al. Risk factors for late pulmonary homograft stenosis after the Ross procedure. *Ann Thorac Surg* 2000; 70:1953-1957.
18. Elkins RC, et al. Decellularized human valve allografts. *Ann Thorac Surg* 2001; 71:S428-432.
19. Simon P, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2003; 23; 1002-1006.
20. Taylor MJ, et al. The cryobiology of rat and human dendritic cells: preservation and destruction of membrane integrity by freezing. *Cryobiology* 1990; 27: 269-278.



21. Ketheesan N, et al. The effect of cryopreservation on the immunogenicity of allogenic cardiac valves. *Cryobiology* 1996; 33, 41-53.
22. Schenke-Layland K, et al. Optimized preservation of extracellular matrix in cardiac tissues: implications for long term graft durability. *Ann Thorac Surg* 2007; 83: 1641-1650.