



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA Y ANATOMÍA

TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO Y ANALISIS DE UN MODELO EXPERIMENTAL
PARA EL ESTUDIO DE HOMOIJERTOS PULMONARES
DESCELULARIZADOS**

JESUS GÓMEZ-PLANA USERO

ALICANTE 2015



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA Y ANATOMÍA

**DESARROLLO Y ANALISIS DE UN MODELO
EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE
HOMOINJERTOS PULMONARES DESCELULARIZADOS**

Tesis doctoral dirigida por:

Dr. Juan Caturla Such

Dr. Francisco Sánchez del Campo

JESÚS GÓMEZ-PLANA USERO

ALICANTE 2015

El Prof. Dr. D. Eduardo Fernández Jover, Catedrático de Biología Celular y Director del Departamento de Histología y Anatomía de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA:

Que la memoria presentada con el título “Desarrollo y Análisis de un Modelo Experimental para el Estudio de Hominjertos Pulmonares Descelularizados”, realizado por D. Jesus Gómez-Planas Usero, reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral.

Lo que certifico a los efectos oportunos, en San Juan de Alicante, Julio de dos mil quince.



El Prof. Dr. D. Juan Caturla Such, Profesor Emérito del Departamento de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández y el Prof. Dr. D. Francisco Sánchez del Campo, Catedrático de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Histología y Anatomía de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN:

Que la memoria presentada con el título "Desarrollo y Análisis de un Modelo Experimental para el Estudio de Hominjertos Pulmonares Descelularizados", realizado por D. Jesus Gómez-Planas Usero, reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral.

Lo que certificamos a los efectos oportunos, en San Juan de Alicante, Julio de dos mil quince.



Fdo. Dr. D. Juan Caturla Such



Dr. D. Francisco Sánchez del Campo



El viaje no termina jamás.
Solo los viajeros terminan.
Y también ellos pueden subsistir
en memoria, en recuerdos,
en narración...
El objetivo de un viaje es solo
el inicio de otro viaje.



José Saramago

AGRADECIMIENTOS

Como cualquier trabajo que intenta ser científico el desarrollo de esta investigación ha sido posible gracias a la ayuda de muchas personas e instituciones. La duración del proyecto ha sido tan larga que ha dado tiempo a que todos cambiemos nuestras impresiones y relaciones no siempre a mejor, no obstante sería injusto ahora, hacia el final del trabajo, dar las gracias en el cómodo sillón del presente. En el momento en el que nos implicamos todos dimos lo mejor de nosotros, sabiendo que la recompensa iba a ser poca, y es necesario y casi terapéutico para todos sentirse reconocidos.

Siguiendo el orden cronológico les agradezco enormemente su ayuda y apoyo a los miembros del Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital de León, en particular a Mario Castaño. Buena parte de lo que sé y todo lo que se ha podido hacer en esta línea de investigación ha sido gracias a él. Todos los cirujanos que han pasado por el Servicio en los últimos años, Javier Gualis, Carlos Martín, José Manuel Martínez Comendador, y los últimamente incorporados Elio Martín y José Otero han ayudado o se han mostrado colaboradores en los procedimientos quirúrgicos, y siempre nos han cubierto a aquellos que tuvimos más dedicación mientras estábamos en la Facultad de Veterinaria.

Gracias a la Gerencia Regional de Salud de Castilla y León por la concesión de un Proyecto de Investigación en Biomedicina, Biotecnología y Ciencias de la Salud.

Gracias a los miembros de la Fundación Investigación Sanitaria en León, Felipe Fernández y Armando Pérez, por

la ayuda en la gestión de los recursos y acogernos dentro de su fundación para el desarrollo de los procedimientos.

Gracias a los Veterinarios de la Universidad de León, José Manuel Gonzalo, Marta Regueiro, Ana Isabel Cortina, José Manuel Ajenjo, Manuel García, David Viñuela, Noelia Sánchez y Sara Vielba que nos hicieron sentir dentro de la Facultad como en casa, y a pesar de la complejidad de lo que le pedimos siempre lo hicieron poniendo una cara amable. Hemos tenido mucha suerte profesionalmente al encontrarlos, y habéis sido unos excelentes compañeros de aventuras.

Gracias a la industria, a Palex, en particular a Javier Pardo y a Jorge López, que consiguieron la cesión de la bomba de CEC y nos la trasladaron literalmente hasta la puerta de casa, también a Nicolás Quiles por la cesión gratuita de sets de oxigenación.

Gracias a los responsables del Matadero de Pola de Gordón, por la cesión de las piezas para el estudio y su implante posterior. Gracias también por las clases gratuitas de anatomía ovina.

Gracias al Hospital de León, al Supervisor de Esterilización por la donación del material quirúrgico obsoleto, a las Instrumentistas de Cirugía Cardíaca por recoger todo el material desechable y reutilizable. Tampoco puedo olvidar la ayuda altruista de los Perfusionistas Raquel Alonso y Miguel Parada en las técnicas de perfusión, como en tantos casos aprovechándome de su amistad.

Una mención especial a las Anatomopatólogas del Hospital de León Nieves Alonso y del Hospital General de Alicante Paqui Peiró por su ayuda, que siempre fue de calidad y por las sesiones de formación, haciendo sencillo un trabajo que estaba fuera de nuestro alcance. Eran por su dotación el eslabón más débil de la cadena, pero al final ha sido posiblemente el más sólido.

Gracias al Banco de Tejidos de León como institución y a los que inicialmente trabajaban allí. No ha habido un momento en el que su labor no haya sido determinante, para conseguir financiación, para el desarrollo de los protocolos y procesamiento de los tejidos, y finalmente para su análisis. A Javier Iglesias como director inicial de la Institución, ha sido corresponsable esencial del trabajo, siempre con ganas de continuar y hacerlo cada vez mejor.

Gracias a Jennifer Carro, de todos los que hemos intervenido la que más ha crecido profesional y personalmente. Científicamente nos dejó atrás casi desde el principio, sin embargo se ha mantenido siempre fiel y entusiasta en sus compromisos. Tu ayuda no solo ha sido educativa para mí, trabajar contigo siempre fue divertido.

A mis correctores de Tesis, el Dr Juan Caturla al que con los años tengo en más aprecio, y el Dr Francisco Sánchez del Campo, que dentro de su apretada agenda me hicieron un hueco para leer y corregir todos los errores del documento.

Finalmente gracias a mi familia, a mis padres que es con mucho a los que les hacía más ilusión llegar hasta aquí, a Alberto por su ayuda con la electrónica de los dispositivos

de perfusión, y a Toñi por facilitar siempre una coartada para dedicarle unas horas a la tesis. Por último gracias a María, la única, incluyéndome a mí, que pensó que podía terminarla a tiempo, eres la mejor compañera de viaje que uno pueda tener.



FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo económico de la Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, a través de la concesión de un Proyecto de Investigación en Biomedicina, Biotecnología y Ciencias de la Salud. Título del Proyecto: *Evaluación in vivo de la funcionalidad de nuevas bioprótesis valvulares basadas en la combinación de andamiajes biológicos y células de origen autólogo*. Año de concesión: 2011. Código del proyecto: GRS/697/A/11.



I RESUMEN.....	19
II INTRODUCCIÓN.....	23
1- EL SISTEMA CIRCULATORIO.....	25
1.1. ANATOMÍA DEL CORAZÓN.....	25
2- HISTOLOGÍA VALVULAR.....	30
2.1. ELEMENTOS CELULARES.....	30
2.2. ELEMENTOS EXTRACELULARES O SUSTANCIA INTERSTICIAL.....	32
2.3. DISPOSICIÓN HISTOLÓGICA DE LAS VÁLVULAS SEMILUNARES.....	33
3- FISIOLOGÍA VALVULAR.....	36
4- PATOLOGÍA VALVULAR.....	38
4.1. CIRUGÍA CARDIACA VALVULAR.....	39
4.2. SUSTITUTO VALVULAR IDEAL.....	41
5- ANÁLISIS DE LOS SUSTITUTOS VALVULARES ACTUALES.....	42
6- INJERTOS VALVULARES.....	53
6.1. HOMOINJERTOS VALVULARES HUMANOS.....	55
6.2. CAUSAS DE DEGENERACIÓN DE LOS HOMOINJERTOS.....	58
6.3. MÉTODOS DE DESCELULARIZACIÓN VALVULAR.....	60
III JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	73
1- JUSTIFICACIÓN.....	75
2- HIPÓTESIS.....	78
3- OBJETIVOS.....	79
IV MATERIAL Y MÉTODO.....	81
1- PROCESAMIENTO VALVULAR.....	83
1.1. PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN.....	86
1.2. PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN.....	89
2- CUIDADO ANIMAL Y PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.....	89

2.1. <i>PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO</i>	91
2.1.1. Manejo médico y anestésico durante la Intervención.....	91
2.1.2. Técnica quirúrgica.....	95
2.1.3. Control postquirúrgico.....	99
3- RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR CARDIACA.....	101
4- EUTANASIA.....	102
5- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS.....	103
6- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	106
V RESULTADOS.....	109
1- RESULTADOS CLÍNICOS.....	112
1.1. <i>PARÁMETROS ANALIZADOS DURANTE LOS PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS</i>	113
2- RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	118
2.1. <i>RESULTADOS EN EL VELO VALVULAR</i>	121
2.2. <i>RESULTADOS EN LA PARED ARTERIAL</i>	123
2.3. <i>RESULTADOS EN EL FALDÓN MUSCULAR</i>	126
2.4. <i>RESULTADOS EN EL ENDOTELIO</i>	128
2.5. <i>OTROS HALLAZGOS</i>	129
3- RESULTADOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	135
4- RESULTADOS DE ENSAYOS BIOQUÍMICOS.....	139
4.1. <i>DETECCIÓN DE COLÁGENO</i>	139
4.2. <i>DETECCIÓN DE ELASTINA</i>	141
4.3. <i>DETECCIÓN DE GAG</i>	143
VI DISCUSIÓN.....	145
1- DISCUSIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.....	147
1.1. DISCUSIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS EN EL MODELO EXPERIMENTAL.....	162
1.1.1. Variables hemodinámicas.....	162
1.1.2. Complicaciones respiratorias.....	166

1.1.3. Parámetros analíticos.....	167
1.1.4. Mortalidad.....	167
2- DISCUSIÓN DEL SUSTITUTO VALVULAR.....	169
2.1. PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN PROPIO.....	177
3- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRAS EXPLANTADAS.....	180
3.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA MICROSCOPIA ÓPTICA.....	183
3.1.1. Análisis de la celularidad.....	183
3.1.2. Análisis de la matriz.....	186
3.1.3. Análisis del endotelio.....	188
VII CONCLUSIONES.....	193
VIII PERSPECTIVAS FUTURAS.....	197
IX BIBLIOGRAFÍA.....	201
X ÍNDICE DE FIGURAS.....	231
XI ÍNDICE DE TABLAS.....	241
XII ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	245
XIII ANEXOS.....	255

I RESUMEN



La investigación en nuevos sustitutos valvulares es uno de los campos más activos de la Cirugía Cardíaca. La ingeniería tisular empieza a representar una porción significativa en su desarrollo. En particular los procesos de descelularización de homoinjertos valvulares como método para disminuir su carga antigénica y mejorar su durabilidad, apuntan resultados prometedores.

Para evaluar los resultados de un nuevo proceso de descelularización, que combina choques osmóticos con cambios de PH evitando el uso de detergentes, se realizó un ensayo prospectivo sobre un modelo experimental ovino a lo largo de 6 meses, comparando homoinjertos pulmonares con homoinjertos criopreservados estándares, implantados en posición ortotópica.

El modelo experimental ovino se mostró reproducible, seguro y asimilable a las condiciones peroperatorias de un recambio valvular humano. Las muestras finales obtenidas fueron analizadas cuantitativa y cualitativamente, valorando su recelularización, el estado de la matriz extracelular y el crecimiento del endotelio.

Los resultados mostraron el adecuado estado y composición de la matriz extracelular, y un grado de recelularización variable por segmentos, siendo prácticamente normal en el tejido muscular y casi nulo en el velo valvular. Los cortes histológicos no mostraron infiltración inflamatoria significativa compatible con fenómenos de rechazo.

II INTRODUCCIÓN



1- EL SISTEMA CIRCULATORIO

Desde un punto de vista funcional el sistema circulatorio humano está integrado por el corazón y los vasos sanguíneos que transporta y distribuyen la sangre por nuestro organismo. Su finalidad fundamental es suministrar los nutrientes necesarios para el mantenimiento tisular y eliminar las sustancias de desecho.

1.1 ANATOMÍA DEL CORAZÓN

Mediante los movimientos de sístole y diástole, el corazón transmite un flujo pulsátil de sangre a los grandes vasos. Para que el flujo sanguíneo siga siempre el mismo sentido, es necesario implantar dentro del sistema mecanismos valvulares que impidan el retroceso del contenido vascular. En nuestro organismo, las válvulas están presentes en territorio periférico en el sistema venoso de los miembros inferiores, y en posición central, consideradas como válvulas cardíacas, dentro del corazón o en su conexión a los grandes vasos.

Las válvulas cardíacas son de dos tipos: semilunares y aurículo-ventriculares. En el ventrículo venoso o derecho la válvula semilunar se denomina pulmonar y la aurículo-ventricular tricúspide, en el ventrículo sistémico o izquierdo se denominan aórtica y mitral respectivamente. Las válvulas semilunares separan los ventrículos de las grandes arterias, aorta y pulmonar, y permiten solo el flujo sanguíneo centrífugo desde los ventrículos.

Las válvulas aurículo-ventriculares que como su propio nombre indica separan aurículas de ventrículos, permiten sólo de forma natural el flujo centrípeto hacia los dos ventrículos. La figura 1 muestra la morfología y disposición de las válvulas cardiacas en un corte transversal y superior al eje longitudinal de ambos ventrículos.

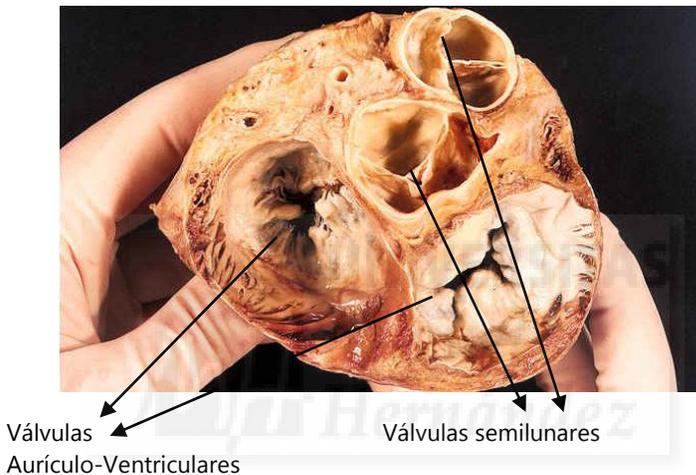


Figura 1. Vista craneal de un corte transversal cardíaco, seccionando ambas aurículas por encima del plano anular y por encima de las comisuras valvulares pulmonar y aórtica.

Anatómica y funcionalmente la estructura de las válvulas semilunares y de las aurículo-ventriculares no es la misma:

Las válvulas aurículo-ventriculares, están formadas por dos, la mitral, o tres, la tricúspide, velos asimétricos, que se anclan a las estructuras cardiacas en un anillo fibroso identificable histológicamente. Su forma es a efectos prácticos prácticamente circular y plana. La excursión de los

velos se ve limitada en su cierre por una red arborescente de fibras denominadas cuerdas tendinosas que caudalmente se fijan a la cara interna miocárdica en unas digitaciones llamadas músculos papilares, o en el caso de la tricúspide, a la pared libre del propio ventrículo. La figura 2 muestra el aspecto auricular de la válvula mitral.

Funcional y anatómicamente son estructuras complejas, pero presentan tres diferencias importantes con las válvulas semilunares:

- Su apertura y cierre es activo (funcionalmente son parte del ventrículo, si éste falla la válvula también lo hará).
- Las presiones de apertura son bajas, por lo que para el mismo flujo necesitan áreas de apertura mayores que las válvulas semilunares.
- Las presiones de cierre son sistólicas, es decir altas (mayores que las diastólicas de sus opuestas), por lo que para su funcionamiento adecuado es muy importante que la tensión del cierre de los velos se distribuya rápidamente hacia el anillo y el ventrículo a través del cuerpo de los velos.



Figura 2. Vista craneal de la válvula mitral seccionando la aurícula izquierda a nivel de la orejuela.

Las válvulas semilunares están formadas por tres velos simétricos con forma de nido de golondrina, unidos a la pared de las arterias por un anillo poco definido histológicamente. La estructura anular tiene forma de corona de tres picos.



Figura 3. Vista caudal de la válvula aórtica cerrada desde su aspecto ventricular

La arteria pulmonar y aórtica en las zonas de inserción de los velos se abomba formando tres senos conocidos como senos de Valsalva (aórtica) y Morgani (pulmonar) (figura 3). Sólo en $2/3$ aproximadamente de la longitud del anillo aórtico este se asienta sobre el miocardio que forma el tracto de salida del ventrículo izquierdo, el resto del anillo corresponde al esqueleto fibroso del corazón y pared arterial. La actividad mecánica del anillo valvular a lo largo del ciclo cardiaco sólo es posible en las porciones del anillo muscular. Funcionalmente al igual que en el caso anterior diferenciaremos tres características:

- Su apertura y cierre son casi pasivos. La excursión de los velos depende en buena medida del gradiente de presiones a uno y otro lado del anillo, aunque éste es uno de los conceptos que en la actualidad está en revisión.
- Las presiones de apertura y durante toda la sístole son altas por lo que su diseño está basado en velos muy finos y móviles que permitan un flujo laminar y sin resistencia a su través. Las áreas de apertura son menores que en el caso de las válvulas aurículo-ventriculares.
- Por último sus presiones de cierre son diastólicas y éstas al igual que sus contrarias deben ser rápidamente transmitidas al anillo y los vasos que alojan los velos valvulares, esto permite disminuir el estrés

sobre el velo y reducir la fatiga sobre sus componentes.

Este trabajo centra su estudio en la patología y el tratamiento de las válvulas semilunares, por lo que en adelante nos referiremos casi de forma exclusiva a ellas, nombrando sólo las aurículo-ventriculares cuando sea necesario para la explicación de algo relacionado con las primeras.

2- HISTOLOGÍA VALVULAR

En el mundo en el que vivimos, muchas de las máquinas y electrodomésticos que utilizamos funcionan gracias a las válvulas, si su tecnología está tan ampliamente desarrollada en gran variedad de condiciones de trabajo ¿Por qué es difícil construir una válvula con las características de las válvulas cardíacas nativas?

Para comprender mejor el reto que esto supone, veamos cuál es la estructura histológica, anatómica y fisiológica de las válvulas semilunares.

La estructura histológica de las válvulas semilunares es compleja, está constituida por elementos celulares y extracelulares.

2.1 ELEMENTOS CELULARES:

Dentro de los componentes celulares encontramos dos estirpes distintas, las células endoteliales y las células intersticiales.

Las células endoteliales forman un epitelio que tapiza ambas caras de los velos nativos, su desarrollo no es exclusivo de la superficie de los tejidos biológicos, se puede encontrar sobre la superficie de sustitutos arteriales artificiales y de modo poco uniforme sobre determinados sustitutos valvulares¹⁻¹².

Su primera actividad estudiada fue la de inhibir la trombogénesis originada entre los elementos sanguíneos y la superficie de su continente, vasos o cámaras cardiacas. Hoy en día se reconoce como un tejido metabólicamente muy activo y reactivo, con propiedades mucho más complejas que afectan no sólo al órgano en el que están situados^{4,12}. El endotelio valvular regula fenómenos inflamatorios e inmunes y modula la permeabilidad de macro y micromoléculas desde el torrente sanguíneo hasta el intersticio celular². Mediante un proceso denominado "activación endotelial" sus células son capaces de cambiar su fenotipo o proteoma en función de distintas demandas extracelulares, como por ejemplo en el estudio que nos preocupa los cambios en las fuerzas hemodinámicas de tracción o presión sobre los componentes valvulares.

Las células intersticiales se encuentran en el interior de los velos, en las paredes de la aorta y en menor medida en el tejido muscular ventricular formando una red conectada mediante sus apéndices. Confieren solidez a la estructura de soporte celular, y son las encargadas de la degradación y síntesis de los componentes no celulares siguiendo un

ciclo continuo. Todas presentan características similares a los miofibroblastos, fibroblastos y células musculares lisas, pero se pueden encontrar en cinco estados diferentes¹³⁻¹⁵: embrionarias, progenitoras, quiescentes, activadas y osteoblásticas. Cada una de ellas puede cambiar de un estado a otro dependiendo de los estímulos externos a los que se vean sometidas, ya sean mecánicos, humorales, celulares o como respuesta a un daño.^{14,15}

Los continuos movimientos de apertura y cierre valvular ocasionan un deterioro a los componentes celulares y acelulares de los velos, activando mecanismos celulares de degradación del tejido dañado y aposición de nuevos componentes.

Otros dos componentes celulares pueden estar presentes en los velos: terminaciones nerviosas de significado desconocido, y vasos sanguíneos, que en el caso de los velos son siempre indicativos de patología valvular, ya que los velos sanos son tan finos que se nutren exclusivamente a través de la sangre que circula a su través.

2.2 ELEMENTOS EXTRACELULARES O SUSTANCIA INTERSTICIAL

La sustancia intersticial está formada por un componente fibrilar que supone el 80% de su peso en seco y por glucosaminoglicanos (ácido hialurónico, dermatán y condroitín sulfato).

En cuanto al componente fibrilar del tejido conectivo tradicionalmente se consideraba que estaba formado por dos tipos de fibras: el colágeno y la elastina. Hoy en día sabemos que hay más de 40 proteínas distintas^{16,17}, que no sólo confieren al tejido sus propiedades mecánicas^{18,19}, sino que también modulan la proporción y disposición de los distintos componentes y su respuesta frente a estímulos.

Proporcionalmente las fibras son mayoritariamente de colágeno (entre el 43-60% del peso en seco total), correspondiendo a tipo I (74%) y tipo III (24%) y en menor medida al tipo V (2%); entre el 10 y el 13% restante corresponde a fibras de elastina. Todas las fibras se distribuyen de un modo especial para mejorar la eficacia energética durante el ciclo valvular.

2.3 DISPOSICIÓN HISTOLÓGICA DE LAS VÁLVULAS SEMILUNARES.

La distribución histológica de sus componentes es distinta según el segmento valvular^{20,21}. En esquema se diferencian tres partes distintas: El faldón muscular, la pared arterial y los velos valvulares. (figura 4) (esquema 1)

El faldón muscular presente en todo el anillo inferior de la válvula pulmonar y en 2/3 de la aórtica, está constituido por tejido miocárdico prácticamente similar al ventricular.

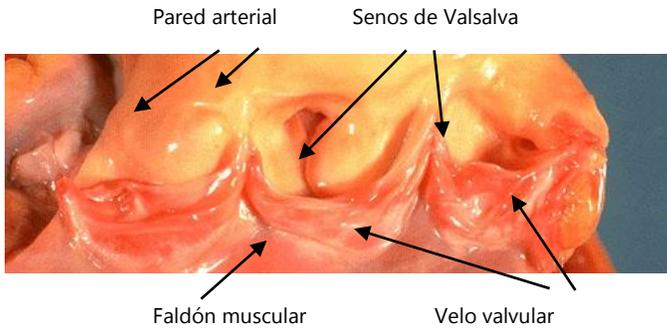
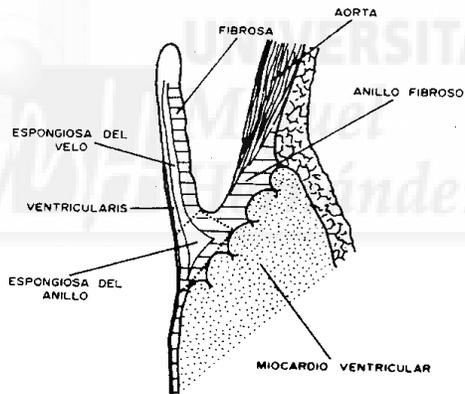


Figura 4. Sección de la válvula aórtica en la comisura anterior entre el velo no coronario y el derecho.



Esquema 1. Sección transversal de la raíz aórtica mostrando sus componentes histológicos.

Los componentes de la **pared de la raíz aórtica y pulmonar** están organizados de forma similares a los del resto de la aorta. Es interesante señalar que la proporción y distribución de fibras de elastina y colágena varía a lo largo de la longitud de la aorta, esto explica que

determinadas enfermedades que afectan al tejido conectivo mayoritariamente aórtico tengan “predilección” por segmentos muy determinados. Un ejemplo sería el de la enfermedad de Marfan que afecta sobre todo a la raíz de la aorta, si bien es cierto que su grado de penetrancia y la velocidad de progresión de las manifestaciones vasculares y extravasculares cambian en distintos e incluso el mismo individuo.

Los velos valvulares, presentan una estructura específica distinta a la del resto de los tejidos conectivos del organismo. Sus componentes se organizan en tres capas con propiedades diferentes:

- **Capa fibrosa** (C en la figura 5): Es la más cercana a la aorta en la posición de cierre valvular y está recubierta de endotelio. Su componente fundamental son *fibras de colágeno* de distribución radial y ondulada, manteniendo esta ondulación gracias a la tensión de las fibras de elastina de la capa ventricular. Es la capa más resistente.
- **Capa esponjosa** (B en la figura 5): Se encuentra en medio de las otras dos, está formada en su mayoría por *glucosaminoglicanos*. Es la capa más hidratada y se comporta como un semifluido, que conecta dos capas con propiedades mecánicas diferentes.
- **Capa ventricular** (A en la figura 5): Está también recubierta de endotelio y es la más cercana al ventrículo. Su componente fundamental son *fibras de elastina* dirigidas longitudinalmente al flujo a través de la válvula.

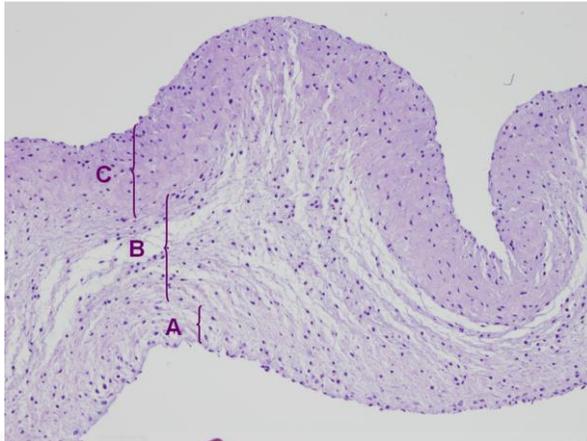


Figura 5. Corte histológico de velo aórtico teñido con Hematoxilina-Eosina visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro. Se aprecian las tres capas diferenciadas: C. Capa fibrosa, B Capa esponjosa, C Capa ventricularis.

3. FISIOLÓGÍA VALVULAR

Durante el cierre valvular, siguiendo el curso de las corrientes de Bell originadas en los senos de Valsalva, los velos aumentan su longitud y superficie gracias a la morfología ondulada de las bandas de colágeno de la capa fibrosa. Esta distensión paulatina disminuye el estrés sobre los velos (mejora su complianza) hasta que en su excursión chocan contra los velos contralaterales en al menos la mitad de su superficie, y transfirieren a través del cuerpo de los velos la tensión del cierre valvular a la pared de la arteria.

Durante la apertura valvular los velos se abren por el flujo de sangre procedente del tracto de salida ventricular, pierden tensión y las fibras de elastina de la capa ventricular recuperan su longitud plegando las fibras de colágeno, esto hace al velo más corto en longitud y más gordo en espesor (el espesor de los velos varía durante los ciclos entre 300 y 700 micras). Los cambios morfológicos favorecen la apertura valvular rápida y reducen el gradiente de presión durante el tiempo de eyección.

Las diferentes propiedades físicas de las dos capas externas (rigidez y elasticidad) ocasionarían excesiva tensión por cizallamiento entre ellas, tensión que se ve amortiguada por la capa intermedia que las separa: la capa esponjosa.

Su compleja anatomía macro y microscópica confiere a los velos y la pared de la raíz aórtica una de sus propiedades más importantes: la anisotropía o propiedad de comportarse de forma distinta desde el punto de vista mecánico según la orientación del tejido¹⁸. Por el momento ningún sustituto valvular "no vivo", incluyendo las bioprótesis, ha conseguido imitar esta característica del tejido vivo autólogo de forma apreciable.

Aunque estemos considerando las dos válvulas semilunares similares, es importante destacar que ni en su estructura ni en su composición la válvula pulmonar es similar a la aórtica. Es lógico pensar que si la válvula pulmonar va a estar sometida a presiones menores, por la ley biológica del ahorro en sus componentes, su estructura

debería ser, y de hecho es, más “fina” “débil” y “frágil” que la aórtica; no obstante, como prueba de la capacidad de los tejidos valvulares de adaptarse a nuevas circunstancias, se ha demostrado que las válvulas pulmonares implantadas en posición aórtica son capaces de modificar su estructura para asemejarse a una válvula aórtica nativa normal.

4- PATOLOGÍA VALVULAR

La patología funcional valvular es sencilla de resumir conceptualmente:

- Disfunción en la apertura de la válvula o estenosis.
- Disfunción en el cierre valvular o insuficiencia.
- Disfunción en su apertura y cierre o doble lesión valvular.

Para definir adecuadamente la patología valvular y abordar su mejor tratamiento es necesario seguir la nomenclatura habitual:

1. Válvulas afectadas: Aórtica, pulmonar, mitral o tricúspide.
2. Etiología de la patología valvular: Fiebre reumática, endocarditis, degenerativa, farmacológica, etc.
3. Disfunción: Estenosis, insuficiencia o doble lesión.
4. Clasificación funcional: Por fenestración de los velos, dilatación del anillo y/o reducción o aumento de la excursión de los velos.
5. Severidad de la lesión.

Con la finalidad de tratar mayoritariamente este grupo de enfermedades surgió la Cirugía Cardíaca.

4.1 CIRUGÍA CARDIACA VALVULAR

La patología cardiovascular es la causa de muerte más frecuente en los países civilizados. Hoy en día y sólo por el momento, el grueso de su morbimortalidad se le atribuye a la patología coronaria, no obstante, la rápida universalización de la atención en países con problemas sanitarios no tan "convencionales", y los cambios en las características de nuestra población, están variando mucho y muy rápidamente el perfil del enfermo cardiovascular, y con ello los requerimientos de su atención.

La cirugía cardiovascular nació como especialidad por la demanda ocasionada por la alta prevalencia de la cardiopatía reumática y las cardiopatías congénitas. Ya en esos primeros años de andadura el reto al que se enfrentaba era la corrección de la patología valvular.

Entre los años 70 y 80 se definió el concepto de "sustituto valvular ideal". En este periodo muchos investigadores de la mano de la industria farmacéutica, pugnaron por conseguir la prótesis biológica o mecánica ideal.

En las dos últimas décadas del siglo XX ocurrieron tres hechos que modificaron significativamente nuestro interés científico: El uso extensivo de tratamiento antibiótico hizo casi desaparecer en nuestro medio la cardiopatía reumática, la estandarización de los procedimientos de

cirugía reparadora mitral impulsados por el Dr. Carpentier sin necesidad del recambio valvular, y el auge de la cirugía coronaria. Estas circunstancias hicieron dejar de lado el desarrollo de nuevos sustitutos valvulares en favor de nuevas líneas de investigación, inercia que se continúa arrastrando en la actualidad.

Características de la Cirugía Valvular actual

- La cardiopatía reumática prácticamente ha desaparecido en nuestro medio y comienza a ser un problema quirúrgicamente "tratable" en países en vía de desarrollo en los que es una enfermedad prevalente.
- La cirugía valvular mitral, está centrada en la reparación valvular que se ha universalizado y que paulatinamente trata cada vez un mayor número de enfermos. Es importante señalar que en los registros actuales, un porcentaje nada desdeñable de mitrales, en algunos casos cercano al 50 %, continúan siendo cambiadas por prótesis, en su mayoría mecánicas^{22,23}.
- La patología congénita, que no deja de traducirse en muchas ocasiones en disfunciones valvulares, está disminuyendo en número y complejidad debido al mejor diagnóstico prenatal. La posibilidad en países de nuestro entorno de interrumpir el embarazo en caso de anomalías complejas ha disminuido la demanda de atención quirúrgica pediátrica.

- La valvulopatía degenerativa aórtica ha recuperado importancia cuantitativa. Con la mejoría de los cuidados críticos y el empleo de técnicas menos invasivas, es posible ahora el acceso a la cirugía valvular a poblaciones con alta comorbilidad o añosa, antes desestimada por alto riesgo quirúrgico. A efectos prácticos, para este subgrupo de pacientes, las bioprótesis actuales o quizás las prótesis transcater o TAVIs parecen sustitutos valvulares idóneos.

¿Ha perdido la cirugía valvular la importancia previa?

Claramente NO. Sólo en Estados Unidos las cardiopatías valvulares ocasionan más de 10.000 muertes anuales, y se implantan más de 60.000 sustitutos valvulares²². A día de hoy, en los registros actuales de cirugía valvular, las intervenciones valvulares suponen más del 50 % de la actividad en los Servicios de Cirugía Cardíaca de nuestro país. Toda esta demanda está movilizando de nuevo la investigación y desarrollo de nuevos sustitutos valvulares.

4.2 SUSTITUTO VALVULAR IDEAL

El sustituto valvular ideal tal como la definió Harken, ha dejado de tener sentido. Con los conocimientos actuales, y según el perfil del enfermo que tengamos que tratar, empleamos distintos sustitutos, que en ocasiones, ofrecen soluciones ajustadas a sus necesidades. Con el fin de mantener el hilo de nuestra exposición recordaremos las características ideales que debería tener la válvula artificial perfecta:

1. Gradientes bajos, esto es en el caso de las válvulas aórticas poca pérdida energética en sístole.
2. Cierre precoz y completo, o siguiendo el punto anterior, poca pérdida energética en diástole.
3. Riesgo tromboembólico bajo sin necesidad de asociar tratamiento antitrombótico.
4. Resistencia frente a la endocarditis.
5. Biocompatibilidad con los elementos formes de la sangre y nuestro sistema inmune, no generando ni hemólisis ni activación de fenómenos inflamatorios o de rechazo.
6. Ausencia de deterioro estructural o "fatiga del material".
7. Generar poco ruido durante el ciclo cardiaco.
8. Facilidad de implantación y recambio o explante en caso de disfunción.

Ninguno de los sustitutos que están en nuestro arsenal terapéutico tradicional, cumple todos los requisitos, y según el perfil característico de cada uno lo hacen mejor solución para subgrupos diferentes de pacientes.

5- ANALISIS DE LOS SUSTITUTOS VALVULARES ACTUALES

Prótesis mecánicas

Están formadas por componentes mecánicos de origen no biológico: Titanio, acero, carbón pirolítico, todos ellos

tienen gran resistencia a la fatiga del material y “aceptable” biocompatibilidad.

Están constituidas por un anillo suturable redondo, plano y flexible que se endoteliza, unido a una carcasa sobre la que pivotan uno o dos velos rígidos apoyadas en “bisagras”. El conjunto es fácil de implantar y explantar.

La compatibilidad del material no impide que en las partes de la válvula que menos movilidad tienen (las zonas adyacentes a la bisagra) y donde hay más flujo turbulento se tiendan a producir trombos, por lo que en su diseño se dejan “fugas” en el cierre que lavan estas zonas, ocasionando pérdida de energía en diástole, pérdidas más evidentes cuando la presión de cierre es mayor y por lo tanto en las prótesis en posición mitral.

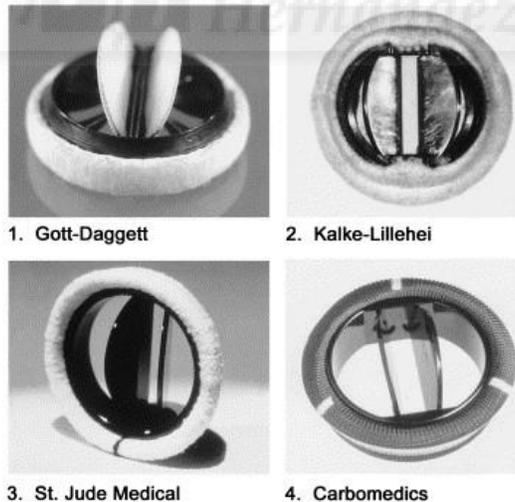


Figura 6. Diferentes tipos de Válvulas Cardíacas Mecánicas.

Su diseño debe cumplir una serie de requisitos básicos:

- Gradientes mínimos en sístole, lo que se ve favorecido si su ángulo de apertura es cercano a los 90°
- Pérdidas energéticas mínimas una vez cerradas: lavados mínimos.
- Cierre rápido lo que disminuye la sangre que regurgita durante la diástole: para lo que el peso (y por tanto la inercia) de las partes móviles debe ser pequeño.
- Baja trombogenicidad del material.
- Poco atrapamiento de los elementos formes de la sangre durante el ciclo, lo que se traduce en baja hemólisis.
- Flujos poco turbulentos, lo que disminuye el riesgo teórico de endocarditis y trombosis.
- Cierre y apertura silenciosos. Para algunos enfermos su cierre "ruidoso", transmitido en su mayor parte por vía ósea, resulta tan molesto que condicionaría en el futuro su recambio por otro tipo de sustituto.

Los diseños actuales de las prótesis mecánicas parecen con escaso margen de mejora a la espera de un nuevo avance: un nuevo material, o algún recubrimiento o diseño innovador, de hecho su aspecto desde hace años tiende a ser convergente (figura 6).

Las estrategias comerciales actuales se basan en mejorar el perfil hemodinámico y trombogénico con el fin de bajar el rango de anticoagulación necesario con antivitaminas K u otros antitrombóticos. Desgraciadamente las novedades se

resisten a demostrar evidencia de mejora respecto a lo obtenido a finales del siglo pasado.

Las ventajas indudables de las prótesis mecánicas son su excelente durabilidad y facilidad de implante. Están consideradas en la actualidad como el sustituto ideal en pacientes jóvenes que han concluido su fase de crecimiento. A pesar de que las tasas de efectos adversos con las prótesis mecánicas son cada vez más ajustadas, no dejan de ser un problema grave a tener en cuenta en enfermos con una esperanza de vida larga^{22,24-26}.

Prótesis biológicas:

Los modelos más empleados (prótesis soportadas o Stented frente a los no soportados o Stentless) constan de un anillo de sutura similar al de la prótesis mecánica, aunque en algunos modelos discretamente festoneados para adaptarse a la forma tridimensional del anillo nativo, un soporte con tres postes sobre los que se anclan tres velos de origen biológico. Su aspecto es también muy convergente en las nuevas generaciones valvulares (figura 7).

El tejido biológico procede de raíces aórticas porcinas o de pericardio, en su mayoría de origen bovino. El tejido es fijado con glutaraldehído o alcohol en distintas concentraciones produciendo desecación y desnaturalización del componente proteico, conservando en parte su estructura fibrilar y por lo tanto resistencia a la

tracción. En términos coloquiales podríamos decir que son como prótesis mecánicas hechas con cuero.

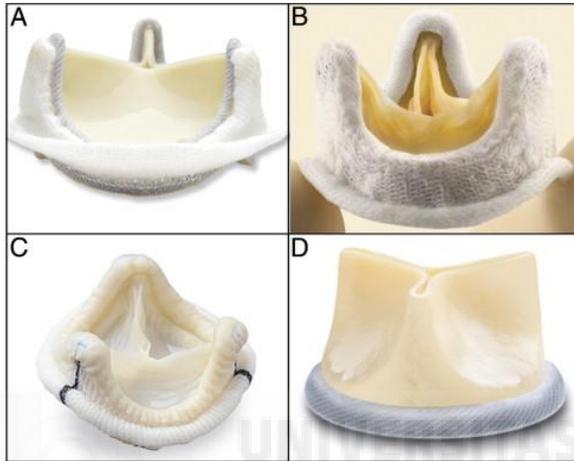


Figura 7. Vista lateral de distintas bioprótesis aórtica, respectivamente A Carpentier Edwards Perimount, B Medtronic Mosaic, C St. Jude Medical EPIC y D Sorin Medical Mitroflow. En los modelos B y C se aprecian los anillos de sutura festoneados

Los procesos de fijación de los velos ocasionan varios fenómenos asociados:

- Los velos no se endotelizan, quedando expuesto sus componentes superficiales a los componentes del torrente circulatorio.
- Los restos de los grupos aldehídos tienden a fijar el Calcio y crear focos de calcificación heterotópicas lo que aumenta la rigidez de los velos y el riesgo de ruptura sobre todo en las interfases de distinta flexibilidad.

- Disminuye drásticamente su capacidad antigénica no induciendo fenómenos inflamatorios o de rechazo.

Como características positivas destacan por tener tasas bajas de tromboembolismo, aunque tras el implante los enfermos toman antiagregantes de por vida, son además silenciosas, no producen hemólisis y son, y serán, cada vez más fáciles de implantar con el desarrollo de los nuevos dispositivos transcater o percutáneos.

Como datos negativos su resistencia a la infección es similar al de las prótesis mecánicas, y como característica fundamental presentan una alta tasa de deterioro estructural, que es inversamente proporcional a la edad de implantación, por ello son poco recomendables por debajo de los 65 años en posición aórtica y de los 70 en posición mitral.

En la práctica clínica son excelentes por su facilidad de implantación y resistencia a la trombogénesis como sustitutos valvulares en pacientes en los que su supervivencia sea menor que la durabilidad media de la válvula, esto es personas en edad avanzada, y en nuestro caso estenosis aórtica degenerativa del anciano^{22,25,27-32}.

Las líneas de investigación actuales en bioprótesis siguen dos caminos: por un lado aumentar la durabilidad de la válvula cambiando el tipo de velo, o modificándolo con tratamientos anticalcificantes^{28,33}, y por otro lado

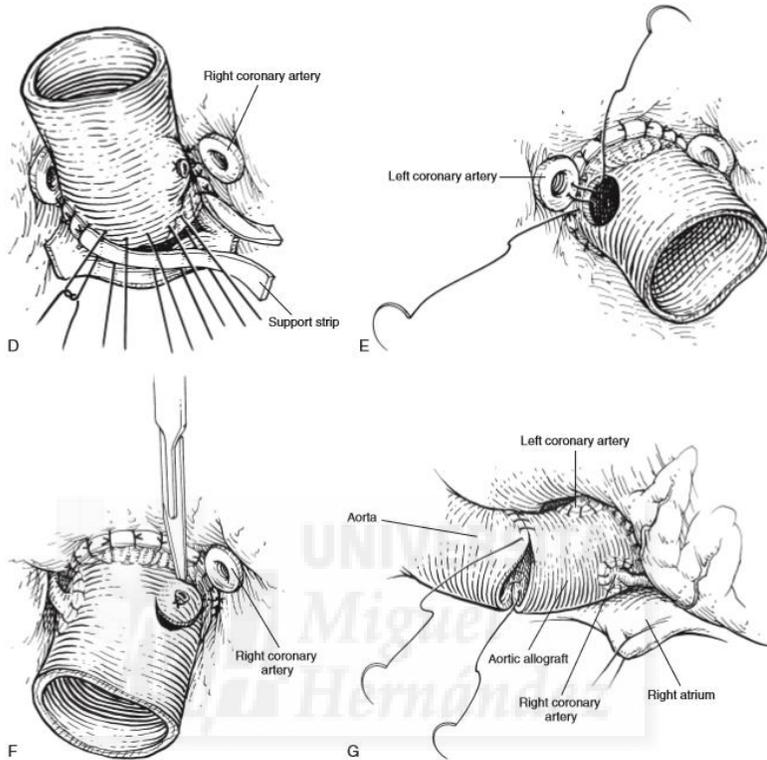
simplificar su despliegue evitando incluso el uso de cirugía abierta como en el caso de las prótesis aórticas transcater (TAVIs), o las bioprótesis sin sutura.

Simplificando de forma exagerada podríamos decir que los sustitutos valvulares mencionados hasta el momento, que por otra parte son con diferencia los más empleados, adolecen de la principal característica de nuestras válvulas naturales: no están constituidas por tejido vivo en donde los fenómenos de lisis y reposición tisular funcionan de forma coordinada para reparar los daños ocasionados por su funcionamiento y adaptarse a los cambios del resto del organismo en general y del entorno en particular.

Homoinjertos criopreservados de cadáver:

Están en desuso. Por tratarse de un tejido vivo sería potencialmente más resistente a la infección, lo que les haría particularmente interesante en el caso de las endocarditis. Aun así, nadie por el momento ha demostrado esta ventaja en estudios prospectivos o en registros contrastados.

Su durabilidad, que se esperaba fuese mayor a la de las bioprótesis estándares, no ha superado las expectativas, además sus técnicas de implante (esquema 2) son complejas. La utilidad actual se circunscribe a los mencionados casos de endocarditis con gran destrucción tisular y la corrección de muchas cardiopatías congénitas como sustituto valvular en posición venosa.



Esquema 2. Técnica quirúrgica en la implantación de un homoinjerto aórtico en posición ortotópica, donde se aprecia en D la sutura al anillo receptor del faldón del homoinjerto, en E y F la preparación y sutura de los ostia coronarios y en G la sutura de la anastomosis distal.

Una población de especial sensibilidad en patología valvular es la pediátrica con características específicas que requiere especial atención:

- Necesitan en muchas ocasiones no sólo un sustituto estrictamente valvular, sino que en ocasiones hay que

reconstruir el tracto de salida ventricular y/o el tronco de la pulmonar o la aorta.

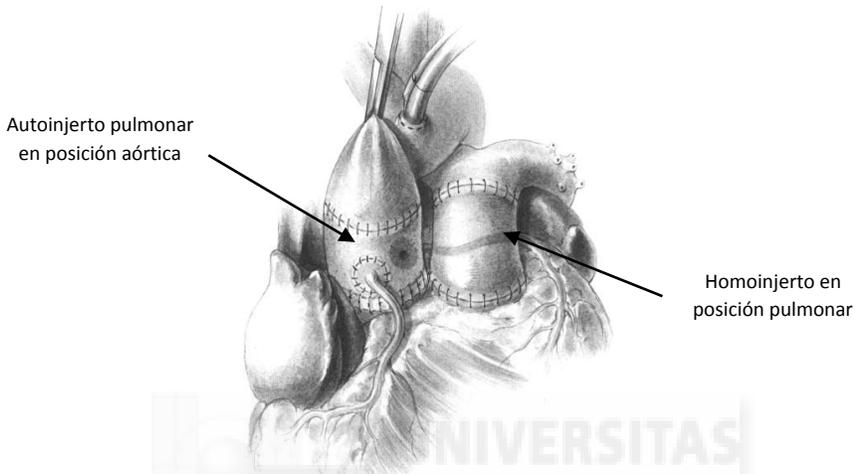
- Los tamaños que emplean son muy variables según la edad y desarrollo del niño y la cardiopatía a tratar, con escasa disponibilidad de donantes para la demanda numérica y específica en el caso de los homoinjertos.
- Los sustitutos más empleados en el adulto (las bioprótesis y las prótesis mecánicas) presentan un comportamiento hemodinámico desfavorable en tamaños pequeños.
- Los sustitutos mayoritariamente empleados (excepto en la operación de Ross) rápidamente quedan pequeños para las demandas del resto del organismo, lo que obliga a sucesivas reintervenciones para aumentar el tamaño de la válvula.
- En general los resultados en términos de durabilidad son francamente peores que los obtenidos con los mismos dispositivos en adultos.

Como consecuencia de lo expuesto, los sustitutos valvulares más empleados en la edad pediátrica son los homoinjertos, que aunque distan de ofrecer un adecuado perfil, no han sido superados por otros dispositivos que muestren mejor comportamiento^{22,34-40}. En este sentido existen varias líneas de investigación para mejorar la durabilidad de los homoinjertos como la que proponemos.

Operación de Ross

La operación de Ross consiste en disecar la raíz pulmonar del enfermo y colocarla en posición aórtica, sustituyendo

su raíz pulmonar por un homoinjerto criopreservado de cadáver (Esquema 3).



Esquema 3. Vista final de la Operación de Ross con la aorta aún clampada.

Conceptualmente la idea es colocar en posición sistémica un tejido vivo y adaptable en donde las condiciones hemodinámicas son más duras, dejando el sustituto artificial en posición venosa o pulmonar con menos estrés lo que redundaría en mayor durabilidad.

La técnica estuvo en boga a finales del siglo pasado y principios del actual, y ha demostrado ser la intervención ideal en la edad pediátrica.

Su ventaja es la capacidad del autoinjerto pulmonar de crecer con las necesidades del individuo en periodo de crecimiento, característica que no comparte con los homoinjertos. Hoy en día es la única forma de colocar un

tejido con la misma capacidad de la válvula natural en posición aórtica si exceptuamos el trasplante cardiaco.

En el apartado previo de anatomía mencionamos que la estructura histológica de la válvula pulmonar era distinta, más "ligera", a la de la válvula aórtica, ¿Cómo cambia su estructura una vez queda expuesta a las presiones y tensiones sistémicas?: Se ha demostrado en válvulas explantadas que el autoinjerto pulmonar es capaz de adquirir una estructura similar a la de la válvula aórtica.

La técnica presenta tres problemas en fase de resolución:

1. La técnica quirúrgica es mucho más compleja que el recambio valvular aislado, y por lo tanto es lógico pensar que con mayor riesgo quirúrgico.
2. El autoinjerto pulmonar con frecuencia se dilata a largo plazo, lo que ocasiona una reintervención complicada para reemplazar la neoraíz aórtica.
3. El homoinjerto pulmonar se deteriora menos que en posición sistémica pero también lo hace a largo plazo y en ocasiones de forma precoz dentro de los 2 primeros años de seguimiento. A veces se produce una calcificación tan exuberante que obliga a soluciones técnicas no exentas de riesgo.

Estos dos últimos problemas sitúan la tasa de reintervención en los primeros cinco años entre el 5 y el 10% según las series, reintervenciones en cualquier caso complejas de abordar.

Por ello su empleo está casi destinado a la población pediátrica. Las líneas de investigación actuales van encaminadas a mejorar el soporte del autoinjerto pulmonar para evitar su dilatación y a reducir la tasa de degeneración del homoinjerto pulmonar, siendo este último apartado el motivo del presente trabajo^{22,34,35,41-45}.

6- INJERTOS VALVULARES

Los primeros sustitutos valvulares que se emplearon fueron los xenoinjertos valvulares porcinos. Los resultados obtenidos con los primeros xenoinjertos fueron francamente malos. En las muestras de tejidos explantados que habían fracasado, se identificaron infiltrados de monocitos y macrófagos como consecuencia de la capacidad antigénica de las válvulas heterólogas.

Para reducir la capacidad antigénica de los xenoinjertos se comenzó a eliminar el componente celular mediante procesos de esterilización, empleando derivados mercuriales o formol. Los resultados obtenidos tampoco mejoraron los previos, hasta que se introdujo el uso del glutaraldehido en su procesamiento. Desde hacía mucho tiempo se sabía que tratando tejidos biológicos, como la piel, con glutaraldehido o alcohol, se mejoraban algunas de sus propiedades mecánicas, como la resistencia a la tracción y el desgaste⁴⁶. La exposición de cualquier tejido a este agente hace que se fije mediante un proceso conocido como Cross-Linking.

Histológicamente el proceso de Cross-Linking hace desaparecer la capacidad antigénica del tejido, elimina la capa endotelial, y apelmaza la matriz extracelular pasando a ser una especie de "fieltro" formado por los haces de fibras que se encontraban en la matriz inicial. El procesado no sólo elimina la posibilidad de rechazo, también modifica las propiedades mecánicas del tejido haciéndolo más rígido y resistente^{18,47-49}. Como contraprestación transforma el tejido en una matriz imposible de colonizar ni de degradar por las células autólogas, ya sean propias del tejido conectivo o endotelial.

Como comentamos una de las propiedades más importantes de los velos valvulares es la anisotropía, producida por los cambios en su estructura tisular durante el ciclo valvular. Desgraciadamente los velos fijados mediante esta técnica pierden esta propiedad. Desprovisto el tejido de estas características y colocado en un soporte (bioprótesis) el resultado es una válvula que incrementa su tensión sobre determinados puntos críticos como la unión de los velos a los postes. El procesamiento genera además en superficie radicales afines para crear focos de calcificación heterotópicos. También al eliminar los componentes celulares normales lo transforma en un tejido inerte incapaz de reparar las lesiones originadas durante los innumerables ciclos a los que está sometida; dicho en resumen su función está limitada en el tiempo hasta la aparición de disfunción primaria.

Ya entonces se pensaba que para incrementar la durabilidad de los sustitutos biológicos era necesario mantener lo mejor posible la integridad del componente celular y de la matriz extracelular.

En el caso de los xenoinjertos, no hay por el momento líneas de investigación basadas en mantener el componente celular. La incompatibilidad proteica interespecies determina no sólo fenómenos de rechazo hacia la célula, sino también contra las proteínas⁴⁶, casi todas fibrilares, contenidas en la sustancia intersticial, es por ello que no se consideran como sustitutos valvulares si no han sido previamente fijados. La investigación actual se centra en procesos que permitan una mejor conservación del tejido intersticial inicial y que por lo tanto tarde más en degenerar, y también en eliminar los focos primarios de calcificación^{28,50,51}.

Las líneas de investigación que abogaron por el mantenimiento integral del componente celular y acelular fueron los que implantaron el uso de homoinjertos humanos.

6.1 HOMOINJERTOS VALVULARES HUMANOS

Procedentes de donantes fueron muy empleados en las dos últimas décadas del siglo XX. Inicialmente se creía que al tratarse de un tejido vivo en el momento de su implantación conservaría las propiedades del tejido

autólogo de degradación-síntesis-reparación, y que por lo tanto su durabilidad sería excelente.

Para mantener su viabilidad inicialmente fue necesario acortar el tiempo entre el explante y el implante, permaneciendo en el intermedio en un baño nutritivo y antibiótico para eliminar el riesgo de contaminación. El tejido parecía muy sensible al tiempo de isquemia lo que hacía muy complicado la gestión de los equipos quirúrgicos, fue necesario un paso más en el desarrollo de la investigación que permitiese optimizar los recursos tisulares y médicos: la criopreservación y la creación de los bancos de válvulas.

Los homoinjertos valvulares procedentes de donantes son obtenidos mediante el tallado de raíces pulmonares o aórticas de corazones desestimados para el trasplante cardiaco, o una pequeña cantidad, de válvulas procedentes de los corazones explantados en receptores de un nuevo órgano. Hoy en día, como ocurre para el resto de los tejidos y órganos, nos encontramos con un problema de déficit de oferta de tejidos para atender la demanda internacional. Afortunadamente como comentamos antes el desarrollo tecnológico de la criopreservación permitió a finales del

siglo pasado almacenar, organizar y distribuir los tejidos disponibles.



Figura 8. Homoinjerto criopreservado aórtico de tamaño infantil tras su descongelación que incluye desde el faldón muscular y el velo anterior mitral proximalmente hasta el cayado y parte de la aorta descendente distal.

El procesamiento de las válvulas obtenidas es bastante simple, consiste en la inmersión en una solución de transporte y posteriormente en una solución antibiótica y nutritiva, por último se le añade una solución crioprotectora para su congelación mediante una rampa en nitrógeno líquido hasta -195°C y posterior almacenaje.

El propósito del procesamiento es poder implantar un tejido en el que el componente celular esté conservado y sea viable manteniendo a su vez la mejor arquitectura de los elementos extracelulares. Sobre el papel la viabilidad celular permitiría que las células trasplantadas dentro de la matriz y en el endocardio (la capa que más se deteriora

durante el procesado) fuesen capaces de seguir su ciclo biológico tras el implante.

Como ya dijimos, los homoinjertos implantados en posición aórtica no han mejorado los resultados de las bioprótesis clásicas, y aunque continúa conservando la indicación de las endocarditis aún no hay un estudio serio prospectivo que demuestre su superioridad frente a otras alternativas²⁷.

6.2 CAUSAS DE DEGENERACIÓN DE LOS HOMOINJERTOS

Pero si las bases científicas para emplear homoinjertos son sólidas ¿Por qué no funcionan como deberían?, ¿Cuál era la causa del deterioro estructural de los homoinjertos?

A finales del siglo pasado se publicó un artículo ⁵² en el que se estudiaban los cambios histológicos apreciables en estudios de necropsias en pacientes con trasplante cardiaco. Los resultados fueron muy simples: no existían cambios en las válvulas de estos enfermos respecto a los apreciables en la misma población de referencia. ¿Cuál era entonces la diferencia entre los trasplantes de homoinjertos aislados y los del órgano completo?: El tratamiento inmunosupresor.

Siguiendo esta línea de investigación se intentó optimizar la compatibilidad de los homoinjertos más allá de la ABO que ya se realizaba. Los resultados no fueron tampoco esperanzadores, con la misma tasa de degeneración siguiendo distintos perfiles de histocompatibilidad HLA^{35,53}.

Algunos grupos se llegaron a plantear pautas más o menos prolongadas de tratamiento inmunosupresor, idea desechada de forma universal ya que existían en esos momentos otras alternativas de tratamiento valvular sin ésta necesidad y los resultados iniciales con pautas poco agresivas no difirieron de los grupos control.

En cualquier intervención en la que se implante un tejido celular vivo nos encontramos con el problema de su compatibilidad, o, siendo un poco más específicos de la capacidad antigénica intrínseca del tejido que empleamos como donante, y de la capacidad del sistema inmune del huésped de generar su rechazo.

En el caso de los homoinjertos, las proteínas contenidas en la sustancia intersticial son similares en la misma especie y no tendrían por qué producir respuesta inmune alguna. Por el contrario las células contenidas en la matriz sí que expresan en su membrana los antígenos de histocompatibilidad HLA tipo I y II capaz de generar respuesta inmune. El tipo mayoritario y la intensidad de la respuesta inmune es la causa fundamental que ocasiona la disfunción precoz y tardía de estos sustitutos valvulares^{54,55}.

Las alteraciones macroscópicas halladas en los injertos "rechazados" se caracterizan por el engrosamiento de la pared del injerto, retracción en forma de acortamiento, pérdida de luz y finalmente gran calcificación. El tipo de degeneración no se parece en nada ni macro ni

microscópicamente al que se da en los sustitutos valvulares fijados.

El procesamiento del tejido que se investiga en la actualidad para reducir la capacidad antigénica y aumentar su durabilidad es la DESCELULARIZACIÓN.

6.3 MÉTODOS DE DESCELULARIZACIÓN VALVULAR

Su función es eliminar el componente celular y los restos antigénicos procedentes de su lisis. Este tipo de procesamiento ocasiona como efecto inmediato la pérdida del componente tisular que permite la regeneración, pasando de ser un tejido biológicamente activo a ser un tejido inerte de origen biológico, es lo que llamamos una matriz de origen biológico.

Existen muchas formas de eliminar el componente celular de un tejido, (tabla 1), ninguna de ellas lo consigue sin dañar la matriz y por lo tanto alterando sus propiedades físicas a corto plazo. La técnica más empleada se basa en exponer el tejido a series de choques osmóticos, no obstante, cuando el tejido a tratar es más o menos grueso deja amplias zonas viables en su interior, siendo necesario si se pretende una descelularización más intensa emplear métodos asociados. Otro de los métodos empleados simple o combinado es el uso de detergentes, que en general son menos respetuosos con la estructura matricial pero que permiten mejorar los resultados de la descelularización.

CLASIFICACIÓN	AGENTES DESCELULARIZANTES	REFERENCIAS
Acción aislada de los agentes descelularizantes		
<i>Métodos físicos</i>	Alta presión	56,57
	Anaerobiosis	58
	Congelación-descongelación	59
<i>Métodos químicos</i>	Iónicos (SDS)	60,61
	Iónicos (SD)	5,61
	No iónicos (Tritón X-100)	42,61
	Zwitteriónicos	62
	Alcoholes	49,63
	Soluciones hipotónicas e hipertónicas	64,65
	Ácidos y bases	66,67
<i>Métodos biológicos</i>	Enzimáticos (Tripsina)	68,69
Acción combinada de los agentes descelularizantes		
	<i>Combinación de métodos químicos (iónicos-iónicos; iónicos-no iónicos)</i>	70,71
	<i>Combinación de métodos químicos (iónicos-no iónicos y choques osmóticos)</i>	67,72
	<i>Combinación de métodos químicos (iónicos-no iónicos) y métodos biológicos (enzimáticos)</i>	73,74

Tabla 1: Clasificación de los agentes descelularizantes.

Otros investigadores han empleado diferentes métodos físicos como las radiaciones, cambios de temperatura, o químicos, pero finalmente todo se traslada a la misma ecuación:

CUANTO MAYOR ES LA DESCELULARIZACIÓN DE UN TEJIDO MAYOR ES LA DESTRUCCIÓN DE SU MATRIZ.

Una de las características del tejido valvular es que es poco uniforme: los velos son muy finos y celularizados, mientras que el faldón muscular es mucho más denso y grueso. El mismo tratamiento podría ser eficaz y respetuoso con los velos, pero insuficiente en términos de descelularización sobre el faldón o el cuerpo de la arteria^{75,76}, donde sabemos que se producen la mayor parte de los fenómenos degenerativos. Por otra parte, un tratamiento muy agresivo para el faldón y la pared podría dejar los velos excesivamente dañados. Aunque a priori esto parezca un razonamiento lógico, y supongamos que el tejido más delicado y fino es el que más va a sufrir, no es menos cierto que la mayor parte del daño se produce por la liberación de enzimas intracelulares al romperse la membrana celular y entrar en contacto con la matriz (los fibroblastos tienen la capacidad enzimática de degradar fibras dañadas y sustituirlas por nuevas), por lo tanto el segmento más dañado será el más celularizado.

Es muy importante tener en cuenta que no sólo necesitamos velos perfectos y resistentes, también es necesario un cuerpo del injerto consistente y fácilmente

suturable. La pared del homoinjerto y el faldón muscular son elementos muchas veces necesarios para reconstruir los tejidos del enfermo.

Algunos grupos con el objetivo de reducir el tejido del donante, abogan por implantar la menor cantidad posible de injerto, resecaando parte del faldón y casi la totalidad del tronco de la pulmonar, y reconstruir o reforzar esta porciones si fuese necesario para su implante con tejido autólogo del receptor, o tejido heterólogo fijado^{35,77,78}. En contra de esta estrategia, podemos decir que los homoinjertos en posición aórtica se han empleado con distintos métodos de implantación (subcoronariana, miniroot y sustitución de raíz completa), y por lo tanto con distinta "cantidad" de tejido implantado. Ningún de estos métodos han mejorado significativamente sus resultados respecto a los demás, por lo que debe ser más importante la calidad del tejido frente a su cantidad. Por otra parte, hay tantas variables a tener en cuenta en estas intervenciones, que necesitaríamos demasiado tiempo para comprobar que modificaciones "menores" mejorarían los resultados.

Los procesos de lisis celular deben complementarse con la eliminación de los restos celulares, que igualmente pueden ser antigénicos. Se realiza mediante ciclos de lavado y se complementan con el empleo de proteasas específicas. Si además hemos empleado detergentes sus restos deben ser eliminados por su efecto deletéreo sobre la matriz y para

evitar su acción sobre células que puedan recolonizar en el futuro el tejido implantado.

Una de las propiedades teóricas del tejido acelular al que llamaremos en adelante matriz, es que pueda ser de nuevo colonizado por células autólogas del receptor. Así pues una vez obtenida dicha matriz existen dos posibilidades: implantarla con la esperanza de que células pluripotenciales provenientes del torrente circulatorio la colonicen y ejerzan las funciones del componente celular eliminado, o bien, cultivar la matriz in vitro antes de su implante con células procedentes de su futuro huésped. En cualquiera de los dos casos el tejido final contendría células autólogas del receptor incapaces de generar fenómenos de rechazo.

Por el momento la recolonización espontánea de la matriz es algo poco demostrado para el tejido endotelial en posición pulmonar, menos aún en posición aórtica, y muy en discusión aún en el caso de la matriz intersticial, aunque hay más motivos para pensar que el fenómeno no se produce^{55,79}.

Nuestro reto es conseguir un método equilibrado de descelularización y recelularización que asociado a cambios en las técnicas de implantación mejoren los resultados de los sustitutos valvulares inertes actuales.

7- LINEA DE INVESTIGACIÓN PROPIA

En el Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital de León se busca un tratamiento más integral del enfermo valvular. La tendencia que se sigue en el abordaje de esta patología se basa en buscar la solución más fisiológica posible dentro de la vanguardia de la investigación: cirugía reparadora valvular en todos los casos en los que los velos estén aceptablemente preservados, sustitutos valvulares biológicos en caso necesario y cirugía de los trastornos del ritmo, fundamentalmente de la fibrilación auricular. Su población de referencia es mayor, en muchos casos con mal acceso y control del tratamiento anticoagulante, por lo que se suele extender la indicación de bioprótesis frente a válvulas mecánicas incluso por debajo de los 62 años. Sabemos que el desplazamiento de la indicación de bioprótesis a poblaciones más jóvenes, obligará en el futuro a una segunda intervención en algunos casos, o lo que posiblemente sea más grave, a que los enfermos soporten mayor grado de disfunción estructural valvular en la fase final de su vida. A pesar de todo, consideramos que entre las posibles alternativas es la menos mala. Por ello, es transcendental encontrar nuevos sustitutos valvulares que vayan un paso más allá de las bioprótesis "inertes" actuales, hacia un tejido nuevo metabólicamente activo.

Siguiendo la filosofía probiológica del Servicio, los enfermos menores de 60 años con enfermedad valvular aórtica sin posibilidades de reparación, eran valorados para

recambio valvular mecánico u operación de Ross. Tras ser informados concienzudamente, muchos de ellos, sobre todo los más jóvenes, optaron por la solución biológica y se les implantó el autoinjerto en posición aórtica y un homoinjerto criopreservado de cadáver pulmonar.

Todos los enfermos eran seguidos en la consulta externa y no tardamos en encontrar enfermos con degeneración del homoinjerto pulmonar. En la mayoría de los casos, el deterioro apareció en el primer año de postoperatorio y su severidad no indicaba la reintervención.

Algunos pacientes, sin embargo, requirieron ser reoperados, lo que nos hizo tomar conciencia de la complejidad técnica de las reintervenciones y del problema fundamental: ¿Qué alternativa tenemos a un homoinjerto en posición pulmonar degenerado? Fue entonces cuando comenzamos a estudiar los sustitutos valvulares descelularizados y su siguiente evolución, el cultivo de poblaciones celulares sobre las matrices obtenidas.

En esas mismas fechas, empezaron a publicarse los resultados de los que por el momento eran los únicos homoinjertos descelularizados disponibles comercialmente: Synergraft^{54,79-86}. Los primeros resultados fueron malos, pero tras realizar cambios importantes, la nueva generación de válvulas prometía mejorar los resultados de los homoinjertos tradicionales, al menos desde el punto de vista teórico. Fue entonces cuando

decidimos abrir una línea de investigación en homoinjertos descelularizados.

En la investigación fueron necesarios varios pasos:

1. Establecer y el refinar un protocolo de descelularización.
2. Elaborar un modelo experimental biológico donde implantar el material obtenido.
3. Buscar un sistema de comparación lo más subjetivo posible apoyado también en técnicas de imagen.

El primer grupo de investigadores estaba constituido por distintos especialistas: cirujanos cardiacos procedentes del Hospital de León, biólogos del Banco de tejidos de León y veterinarios de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León. Cada especialista centró su trabajo en un campo específico, así los cirujanos y veterinarios se centraron en diseñar el modelo experimental. Los biólogos fueron los encargados de la puesta a punto del protocolo de descelularización y el análisis de los resultados. Todas las decisiones se tomaron en común y nunca se perdió de vista el fin de la investigación: abordar un problema clínico de la forma más práctica posible.

Progresivamente se hizo necesario añadir al grupo especialistas en otros campos como anatomopatólogos o ingenieros industriales, necesarios para el análisis de los resultados de los test in vivo e in vitro.

Tres aspectos de la investigación se mantuvieron desde el principio hasta el final: la formación y análisis de las publicaciones que iban saliendo, la reorientación del diseño a medida que se obtenían resultados parciales y la búsqueda de financiación.



Esquema 3. Cronograma de la línea de investigación global. Los cuadrados rojos marcan el objeto de la tesis "Desarrollo y análisis de un protocolo de descelularización para la obtención de válvulas cardíacas acelulares", defendida por la Dra. Jennifer Ramos Carro en Octubre de 2014. Los cuadros verdes corresponden a los apartados estudiados en esta tesis.

Aunque a efectos prácticos es más sencillo entender que cada proceso daba pie al siguiente, en la práctica esto nunca fue así. En el cronograma que establecimos cada apartado tuvo un inicio y duración diferente, solapándose

unos con otros hasta el final (esquema 3). Podríamos decir que el edificio no se construyó de abajo hacia arriba, sino que todo se hizo a la vez pero a distinta velocidad.

7.1 DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN

La selección de un protocolo propio de descelularización a partir de la bibliografía de referencia resultó un proceso largo y complejo. A pesar del gran número de publicaciones no había uno que estuviese estandarizado ni tampoco unos criterios de calidad definidos.⁷³

Tras una investigación concienzuda sobre más de 300 homoinjertos, se eligió como métodos de citolisis los choques osmóticos alternando cambios de pH, evitando el uso de detergentes y por tanto su daño directo a la matriz y a la población de recelularización. De los 9 protocolos ensayados, por la intensidad de descelularización y el respeto a la matriz se empleó la alternancia de medio básico inicial y ácido final con los choques osmóticos.

Para evitar el daño ocasionado por el vertido de proteasas citoplasmáticas tras la lisis se empleó PMSF, inhibidor de estas enzimas, ya empleado en otros trabajos. Y para disminuir la capacidad antigénica de los restos nucleares presentes se ensayaron 3 protocolos diferentes con DNAsa y RNAsa, eligiendo de ellos el que sometía a los tejidos a mayor concentración y tiempo.

Los resultados obtenidos con el protocolo propio mostraron su eficacia en los puntos cruciales:

1. Ausencia de viabilidad metabólica celular residual.
2. Disminución de restos de ácidos nucleicos potencialmente antigénicos superior al 98%
3. Escaso deterioro estructural de la matriz

En este momento del documento, puede parecer superfluo mencionar estudios realizados por el mismo grupo ya defendido en otras publicaciones. Sin embargo, para comprender mejor los resultados obtenidos, es importante remarcar que los métodos que se emplearon para el análisis preimplantación fueron estrictos y que determinaron la ausencia de viabilidad celular nativa en los homoinjertos que se colocaron. Cualquier tipo de celularidad obtenida en las válvulas explantadas a los 6 meses, debe corresponder a células procedentes del receptor.

7.2 CONTINUACIÓN DEL PROYECTO

Con los resultados ya obtenidos, los siguientes pasos consistieron en la obtención de un modelo experimental propio, el implante de las matrices en los animales de experimentación y su explante y posterior análisis, casi toda la información obtenida desde entonces se expone en este trabajo.

El desarrollo del modelo experimental, así como los propios implantes de realizaron en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León por el grupo de cirujanos cardiacos y veterinarios.

El análisis de las muestras se realizó en las instalaciones de los laboratorios de la Universidad de León por parte de los

biólogos, y su interpretación se completó en los Servicios de Anatomía Patológica de los Hospitales de León y General Universitario de Alicante.



III JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



1- JUSTIFICACIÓN

Vivimos en una sociedad de constante cambio, lo que hoy es útil mañana será superado por algo mejor al menos en algún aspecto. En el campo de la cirugía valvular este proceso antes rápido ahora cambia lentamente. De ahí el creciente incremento en líneas de investigación en nuevos sustitutos valvulares cualitativa o cuantitativamente mejores.

Siguiendo la tendencia actual y "natural" de las líneas de investigación, cada vez se buscan en nuestra área sustitutos más biológicos, o, más respetuosos con nuestra biología. El procesamiento de tejidos propios en sustitución de los dañados, puede mejorar los resultados obtenidos con otros materiales ya muy ensayados.

La descelularización como tratamiento biológico que evite o disminuya el deterioro secundario al rechazo del tejido extraño, parece una línea de investigación muy abierta.

Nuestro trabajo se inició ante la necesidad de dar respuesta a un grupo particular de pacientes con degeneración precoz de homoinjertos pulmonares. En mi centro de trabajo, el Hospital de León, durante varios años se utilizó como sustituto valvular aórtico de forma electiva el autotransplante pulmonar (Operación de Ross). Pocos enfermos, pero todos jóvenes por la propia selección que se hacía de ellos, desarrollaron durante el primer año degeneración del homoinjerto pulmonar. Tras hacer una

revisión bibliográfica extensa, las alternativas de tratamiento quirúrgico eran inciertas, y entre ellas el empleo de homoinjertos descelularizados nos pareció interesante.

La necesidad de responder muchas de las preguntas científicas que planteaban estos enfermos, el deseo de crear un grupo de investigación en cirugía cardiaca y, el acceso a medios personales y físicos, constituyó este grupo de investigación. Del desarrollo de la investigación en este campo, esta tesis no es más que una parte.

El objetivo común fue el desarrollo in vitro de matrices tridimensionales acelulares, que puedan servir como guía para generar una completa funcionalidad tisular al introducir cultivos de células como recolonización.

Las fases planificadas del trabajo fueron:

1. Revisión bibliográfica de descelularización tisular.
2. Realización de un protocolo de descelularización idóneo y propio.
3. Análisis in vitro de los resultados obtenidos en descelularización.
4. Puesta en marcha y validación de un modelo experimental valvular pulmonar.
5. Análisis in vivo de los resultados en descelularización.
6. Desarrollo de una línea propia de cultivo celular.
7. Puesta en marcha de un biorreactor para cultivo celular sobre las matrices obtenidas e implantación in vivo.

8. Análisis final.

Las fases 6 y 7 aunque iniciadas se encuentran pendientes de desarrollo.



2- HIPÓTESIS

Los homoinjertos valvulares son una alternativa en el tratamiento de pacientes con patología valvular. Su uso se ha restringido por el desarrollo de fenómenos degenerativos relacionados con su capacidad para generar respuesta inmune.

La ingeniería tisular aporta herramientas, como la descelularización, que reducen la capacidad antigénica de los injertos. No existe un estándar en descelularización tisular, siendo necesario evaluar cada protocolo en un modelo experimental.

Los homoinjertos descelularizados mediante un protocolo propio basado en el uso de agentes físicos, son útiles como sustitutos valvulares pulmonares en un modelo experimental ovino.

3- OBJETIVOS

1. Desarrollar un modelo experimental biológico para el implante de matrices pulmonares descelularizados y describir los resultados para su validación.
2. Analizar las válvulas a los 6 meses de su implante en el animal de experimentación:
 - a. Determinar y caracterizar la presencia o ausencia de células viables en el tejido con técnicas de microscopía.
 - b. Valorar el estado de la matriz extracelular asociando métodos bioquímicos.
 - c. Valorar la respuesta inmune del receptor en los homoinjertos implantados.

IV MATERIAL Y METODO



1- PROCESAMIENTO VALVULAR

Para el grupo de estudio se emplearon como sustitutos valvulares, homoinjertos valvulares descelularizados de oveja siguiendo el protocolo diseñado por el grupo investigador. Para el grupo control se emplearon homoinjertos criopreservados estándares.

Las válvulas empleadas correspondían a corazones de oveja (*Ovis aries*) de entre 1 y 3 años de edad, obtenidos en el Matadero Municipal de Pola de Gordón (León). Los corazones se recogieron en recipientes plásticos con suero fisiológico estéril suplementado con antibiótico (bencilpenicilina sódica- 2,000.000 UI) y se mantuvieron a temperatura ambiente entre 1 y 2 horas hasta su procesamiento.

El material obtenido se trasladó al Banco de tejidos de León para su manipulación y tallado. La extracción de las válvulas pulmonares se hizo en condiciones de asepsia, bajo campana de flujo laminar vertical (CFL 475 EC, Clean Air).

Para la extracción completa del homoinjerto de la forma más limpia posible se siguieron estos pasos:

1. Eliminación de restos del árbol bronquial y estructuras mediastínicas (cadenas ganglionares, grasa y timo).
2. Separación de las adherencias entre la arteria aorta y pulmonar hasta alcanzar el miocardio superior del septo interventricular.
3. Identificación y sección de la bifurcación de la arteria pulmonar lo más alta posible.

4. Incisión transversal en el tracto de salida ventricular derecho a unos dos centímetros del anillo pulmonar. Una vez identificado el límite caudal de la válvula pulmonar por dentro se amplió la incisión paralelamente al anillo hacia los laterales llegando por los dos lados al septo.
5. Sección transversal de dos centímetros del septo interventricular conectándola lateralmente con la incisión previa.
6. Separación final del miocardio posterior de la válvula pulmonar dejando siempre un buen faldón muscular para evitar el daño sobre los velos y permitir un buen margen para su sutura posterior.
7. Liberación del tejido adiposo adyacente al miocardio del faldón muscular.
8. Tallado final de la pieza una vez explantada, eliminando la grasa epicárdica del tronco pulmonar y la base de los senos de Valsalva, y el exceso de tejido muscular para conformarlo a las necesidades del implante.

Se intentó disminuir la manipulación sobre el homoinjerto durante la intervención quirúrgica, por lo que se dejó la pieza preparada tal cual fuese necesario en el momento de su implante, esto es: Por abajo con un faldón escaso pero suficiente para no acercarse demasiado a la sutura proximal a la zona de implantación de los velos, y por encima limitando la longitud justo a la zona de la unión sinotubular pocos milímetros por encima de la comisura de los velos.

En las ovejas, al contrario que en la anatomía humana, el tronco de la arteria pulmonar es muy corto, formando un ángulo de casi 90° antes de bifurcarse. La morfología del homoinjerto pulmonar difiere mucho cuando se talla en vacío respecto a la que presenta una vez implantado bajo presiones pulmonares. Cualquier acodamiento ocasiona aumento de las resistencias postvalvulares, o cambios en alteraciones geométricas en el cierre, lo que origina con facilidad insuficiencia pulmonar. Cualquiera cambio en las condiciones de trabajo del homoinjerto alteraría los resultados del estudio.

Para evitar problemas en el implante marcamos la longitud de la pulmonar del receptor de acuerdo con el tamaño del injerto a implantar, ya que una vez cortado el tronco de la pulmonar se retrae, e hicimos primero la anastomosis distal, con la sangre que siempre salía de la pulmonar procedente de la circulación bronquial se verificó la competencia del homoinjerto y se suturó en la posición que respetaba mejor su anatomía.

Los cambios en el tallado y preparación de la válvula se realizaron como consecuencia de los resultados obtenidos en el caso 0 (figura 9)

Las válvulas se sometieron a un periodo de descontaminación entre 24-48 horas a temperatura ambiente en suero fisiológico estéril con 640 µg/ml de tobramicina, en el rango de concentración entre 64 µg/ml-320 µg/ml de sulfametoxazol-trimetoprima, 100 µg/ml de vancomicina, 20 µg/ml de anfotericina B y 16 µg/ml de colistimetato sódico.

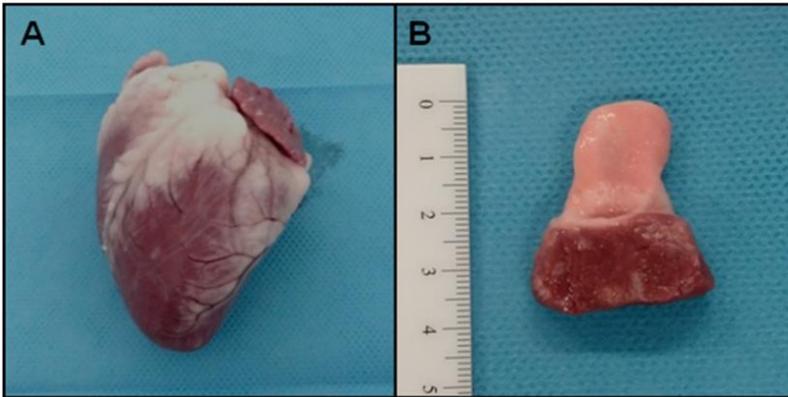


Figura 9. A Pieza cardiaca completa B Homoinjerto valvular pulmonar tras su tallado.

1.1- PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN.

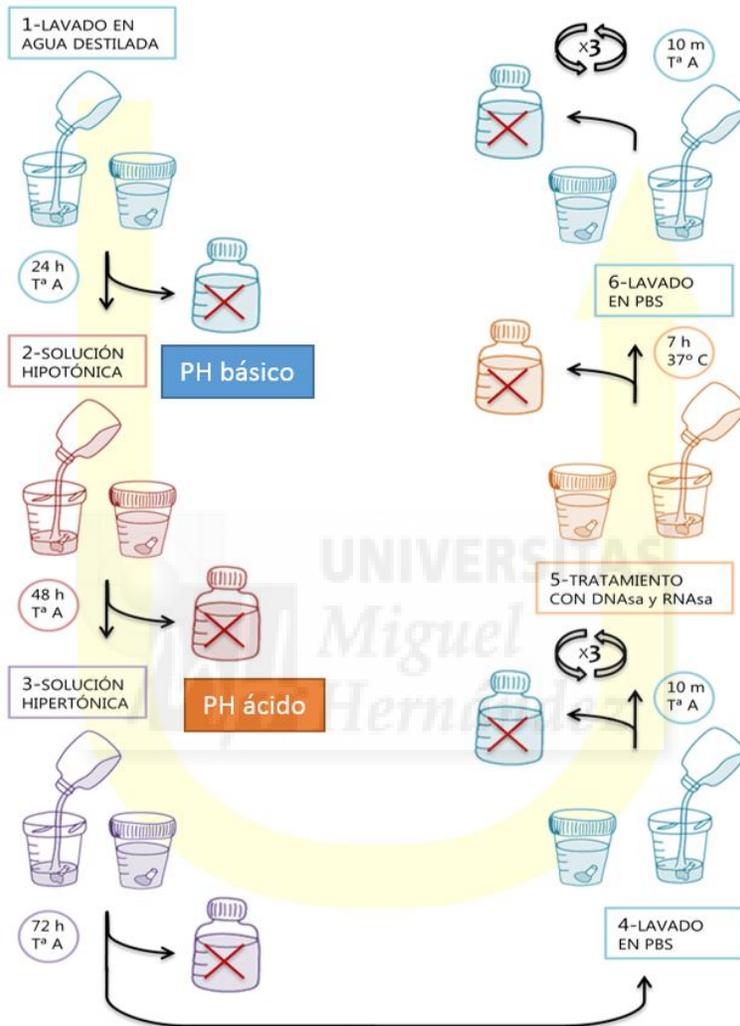
El protocolo de descelularización detallado en el esquema 4, se inició con un lavado de 24 horas con agua destilada estéril antes de introducir las muestras en la solución hipotónica (Protocolo 1 en anexo I). Se ajustó el pH (KI 2.211, Hanna Instruments) entre 11 y 11,5, y se mantuvieron las muestras durante 48 horas. A continuación, se pusieron en contacto con la solución hipertónica (Protocolo 2 en anexo I). Se ajustó el pH entre 5 y 5,5. Los tejidos estuvieron en contacto con esta solución hipertónica durante 72 horas.

Para finalizar, se realizaron 3 ciclos de lavado con tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline, PBS) estéril de 10 minutos de duración, bajo agitación orbital a 12.000 revoluciones por minuto (rpm) (Incubator Shaker HWM-200B, Lan Technics).

Posteriormente se realizó un tratamiento enzimático con desoxirribonucleasa I (DNAsa I) (50 µg/ml) y ribonucleasa A (RNAsa A) (40 µg/ml) (ver Protocolo 4 en anexo I) que se dejó actuar durante 7 horas en una incubadora de cultivos celulares a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa.

Finalmente, las válvulas fueron lavadas 3 veces con tampón sulfato (PBS) estéril durante 10 minutos bajo agitación orbital.

Las soluciones fueron preparadas en condiciones de asepsia a temperatura ambiente, y los ajustes de pH se realizaron con ácido clorhídrico 1 M e hidróxido sódico 2 M. Inicialmente las válvulas permanecieron en el último líquido de lavado a temperatura ambiente hasta su implante, siendo sustituido a partir del segundo implante por la misma solución antibiótica empleada durante su descontaminación. Al inicio y al final del procesado de los tejidos, se tomaron muestras de las soluciones para control microbiológico con el fin de validar la calidad del material en cada paso y finalmente del tejido a implantar.



Esquema 4. Esquema explicativo del proceso de descelularización. Los frascos tachados con una cruz corresponden a las muestras microbiológicas analizadas y negativas antes del implante en una animal.

1.2- PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

La preservación de las muestras se realizó en base a las rutinas de un establecimiento de tejidos para su posterior implante (protocolo 10 en Anexos).

Con las válvulas seleccionadas se realizó una congelación programada, proceso necesario para poder preservar las muestras en nitrógeno líquido. Se congelaron y se almacenaron en este medio un periodo mínimo de una semana. Para la descongelación se introdujeron durante 5 min en un baño termostático a 37°C y se lavaron rápidamente en suero fisiológico salino para eliminar la posible toxicidad del DMSO.

2- CUIDADO ANIMAL Y PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Todos los procedimientos realizados en esta fase del estudio se llevaron a cabo según la legislación española vigente (RD 53/2013 del 1 de febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia) y europea (Directiva 2010/63/UE) y tras la aprobación del Comité Ético de la Universidad de León. Se emplearon 13 ovejas hembras de raza Churra (*Ovis aries celticus*) con una edad de 2 años, con un peso medio de 50 ± 10 Kg procedentes de la Granja de la Universidad de León.

Las intervenciones quirúrgicas, estabulación y estudios de RMN cardiaca se realizaron en las instalaciones de la

Facultad de Veterinaria de la Universidad de León. Se utilizó siempre el mismo quirófano, el mejor dotado en equipamiento para animales de este porte. El día previo a la intervención, se introdujo todo el fungible y material a emplear en el quirófano, y se descontaminó mediante la vaporización de peróxido de hidrógeno.

Los animales fueron trasladados entre 7 y 9 días antes de los procedimientos a las instalaciones de la Unidad de Hospitalización del Departamento de Cirugía y Anatomía Veterinaria. Tras el traslado fueron pesados y alojados en grupos de 2-3, con el fin de mantener su comportamiento gregario.

Al día siguiente de su ingreso, los animales fueron examinados clínicamente y se les extrajo una analítica básica para seleccionar animales sanos. Los elegidos y se mantuvieron en periodo de cuarentena 7 días antes de la cirugía y aclimatarlos a su nuevo alojamiento.

Dos días antes de la intervención se redujo el aporte dietético a la mitad. El día previo a la intervención, los animales fueron rasurados sólo en la zona quirúrgica y se les dejó en ayunas de alimento sólido las 24 horas previas. Se permitió durante el pre y postoperatorio inmediato libre acceso al agua.



Figura 10. Animal estabulado en su instalación previo al procedimiento quirúrgico.

2.1- PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO:

2.1.1- Manejo médico y anestésico durante la Intervención

Como medicación preanestésica se empleó una combinación de midazolam (Midazolam Normon® 5 mg/5 ml) a 0,25 mg/kg e hidrocloreuro de metadona (Metasedin® Laboratorios Dr. Esteve) a 0,2 mg/kg, administradas por vía intramuscular.

Comprobado el adecuado estado de sedación, el animal fue trasladado a quirófano, donde se preoxigenó con mascarilla con FiO_2 del 0,5 y se realizó la venoclisis de ambas venas cefálicas.

Asegurada la permeabilidad de las vías endovenosas, se la indujo la anestesia con propofol (Propofol Lipuro® 20

mg/ml B. Braum) a 2-3mg/kg por vía intravenosa lenta e intubación orotraqueal convencional.

El mantenimiento anestésico durante el procedimiento se hizo con sevoflurano (Sevoflo® Abbot Animal Health) a 1-1,5 CAM, salvo en la fase de circulación extracorpórea, sustituyéndolo por una perfusión continua de propofol a 9 mg/kg/h.



Figura 11. Animal anestesiado y preparado para iniciar la intervención.

Como analgesia intraoperatoria se utilizó fentanilo (Fentanest® 0.05mg/ml KernPharma), administrando una dosis de carga de 5mcg/kg, seguida por una perfusión continua a dosis de 6mcg/kg/h, y dosis de rescate en caso necesario.

Antes de iniciar la toracotomía, se administró como bloqueante muscular besilato de atracurio (Tracrium® 50 mg/5ml Glaxo Smith Kline) a de 0,25 mg/kg, repitiendo la dosis cada 30 minutos sólo en caso de actividad muscular.

La anticoagulación se hizo con heparina al 5% (Heparina Rovi® 50.000 500 mg/ml) a 3mg/kg antes de la canulación y entrada en circulación extracorporea, los tiempos de CEC fueron lo suficientemente cortos como para no necesitar dosis de mantenimiento. Para la reversión de la anticoagulación, tras salir de circulación extracorpórea y extracción de las cánulas, se empleó protamina (Protamina Hospira 50 mg/5ml) a dosis equivalentes 1:1 a la utilizada de heparina.

Los parámetros ventilatorios en los periodos fuera de circulación extracorpórea fueron:

- FiO_2 0,4
- Volumen corriente 9-10 ml/kg
- Relación I/E 1:2; 1:3 (según de las presiones parciales de O_2 y CO_2)
- PEEP 4 cm de H_2O , que tras la toracotomía se aumentó hasta 8 cm de H_2O .

Durante el procedimiento quirúrgico se monitorizaron la presión inspiratoria, frecuencia respiratoria, volumen minuto y concentración de CO_2 espirado.

Durante el periodo de circulación extracorpórea, se detuvo la ventilación, manteniendo una presión en vía aérea de 10-15 cm de H_2O y la mínima FiO_2 posible (0,25) para evitar atelectasias pulmonares.

Tras la salida de circulación extracorporea, se reinició la ventilación siguiendo los parámetros previos a la entrada. Para evitar atelectasias muy frecuentes tras el colapso y manipulación pulmonar en cirugía torácica se realizaron

maniobras de reclutamiento alveolar con presiones pico altas incrementando la PEEP hasta 10-12 cm H₂O de forma paulatina.

En caso de hipoxemia, se incrementó la FiO₂ gradualmente hasta 0,5-0,7 y se redujo el tiempo espiratorio. Cada cambio en los parámetros de ventilación tuvo en cuenta la situación hemodinámica del animal en ese momento, en particular de la precarga.

La perfusión de fentanilo se interrumpió 30 minutos antes de finalizar la intervención quirúrgica, administrando una dosis de rescate de metadona (0,2mg/kg).

Antes del cierre de la toracotomía, se realizó un bloqueo intercostal con anestesia local infiltrando los 5 espacios intercostales que más se habían movilizado con el retractor durante el procedimiento. En cada uno de ellos, se inyectó 2 ml de bupivacaína al 0,5% (Inibsacain® 0,5% plus Inibs Hospital).

Respecto a la monitorización de constantes, se midieron los siguientes parámetros:

- Frecuencia cardiaca (FC).
- Presión arterial invasiva (sistólica, diastólica y media) cateterizando ambas arterias auriculares.
- Saturación parcial de oxígeno mediante pulsioximetría (SpO₂).
- Volumen espirado de CO₂ (endtidal CO₂).
- Parámetros ventilatorios (Presión pico, presión meseta, FR, VM, PEEP)
- Temperatura central: al inicio y al final del procedimiento.

Dado al escaso tiempo empleado de circulación extracorpórea sólo se realizaron gasometrías arteriales en tres periodos: antes de la entrada en circulación extracorpórea, a los 10 minutos de su inicio, y una vez fuera de la misma a los 10 minutos de decanular. Se analizaron los siguientes parámetros:

- pH
- Presión parcial de oxígeno (PO₂)
- Saturación de oxígeno (SaO₂)
- Presión parcial de dióxido de carbono (pCO₂)
- Bicarbonato (HCO₃)
- Sodio (Na⁺)
- Potasio (K⁺)
- Cloro (Cl⁻)

Se administró 1,6 mg/kg de furosemida (Seguril® 20 mg/2ml Sanofi Aventis) con el fin de devolver el volumen de cebado a través de la cánula arterial y posteriormente por una de las vías periféricas del circuito de CEC e incrementar el hematocrito. Como terapia analgésica y antiinflamatoria se administró, 4 mg/kg de carprofeno intravenosa (Rimadyl® 50 mg/ml Zoetis).

Como vasoconstrictor en los episodios de hipotensión, se emplearon pequeños bolos intravenosos de fenilefrina (hidrocloruro de fenilefrina genfarma® Sol. iny. 10 mg/ml Genfarma).

2.1.2. Técnica quirúrgica

Para la perfusión, se utilizó empleó una bomba de circulación extracorporea Sarns 5000 (Sarns Inc. Ann

Arbor US) con un módulo acompañante de normotermia del mismo fabricante. Solo se emplearon dos módulos de rodillo, uno para la perfusión sistémica y otro para aspiración de campo y reinfusión a través del reservorio del oxigenador. Los kits de oxigenación variaron en los distintos casos según la disponibilidad de sets, donados por la industria o inutilizados en clínica humana por ruptura de la cadena de esterilización.

El instrumental quirúrgico fue obtenido a través de la Unidad de Esterilización del Hospital de León, procedente de material en periodo de obsolescencia. El material más específico y no disponible, fue adquirido de segunda mano a través de portales de instrumental on-line (www.dotmed.com www.medwow.com www.ebay.es)

Se colocó al animal una vez monitorizado y anestesiado, en decúbito lateral derecho. El acceso se realizó a través del 4º espacio intercostal izquierdo, disecando el polo caudal de la inserción de la escápula.

Tras la apertura del tórax, se manipuló con extremo cuidado el pulmón por su facilidad para formar atelectasias, teniendo que movilizarlo anterior y posteriormente para el acceso a las zonas de canulación.

Una vez heparinizado, se canuló la aorta torácica descendente con una cánula recta sujeta con sendas bolsas de tabaco adventiciales (Translaminar Maquet). Posteriormente se abrió y suspendió el pericardio al plano de la toracotomía y se canuló la orejuela derecha, rechazando el tronco de la pulmonar caudalmente. Se

emplearon en los primeros casos cánulas de un solo puerto, pasando a emplear a partir de los 3 primeros, una cánula cavoatrial (TF 292902 Edwards Lifescience).

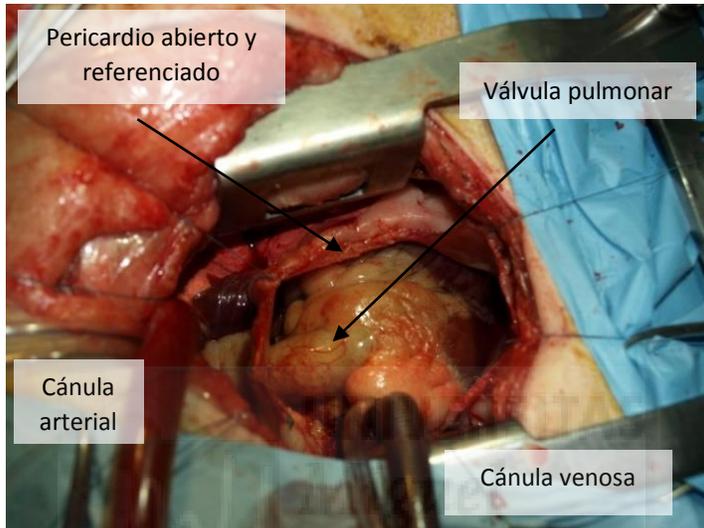


Figura 12. Campo quirúrgico abierto por el 4º Espacio Intercostal izquierdo. El animal se encuentra ya bajo circulación extracorporea.

Se acortó el circuito de CEC al máximo empleando tubuladura de 3/8 en ambas líneas arterial y venosa, para disminuir volumen de cebado y evitar la hemodilución. Se intentó en todos los casos si las presiones lo permitían eliminar parte del cebado mediante la técnica del autopriming (sustituir lentamente antes de entrar en circulación extracorpórea parte de la solución de cebado de las cánulas por sangre del propio animal).

Los cálculos realizados para estimar los flujos de bomba, (flujo máximo, ideal y mínimo) se estimaron a partir de los gastos cardíacos publicados en la literatura para ovejas en

reposo (entre 5,2 +/- 1,2 litros/minuto). En todo momento se mantuvieron presiones de perfusión medias de 90 +/- 10 mm de Hg, aconsejada en la escasa literatura al respecto que encontramos. No fue necesario en ningún caso clampar la aorta ni realizar la intervención con isquemia miocárdica.

Tras la entrada en CEC se seccionó la arteria pulmonar discretamente por debajo de las comisuras valvulares, se resecaron los tres velos nativos, se identificó el tronco de la coronaria izquierda y se reseco un tramo de 2 cm del tronco de la arteria pulmonar hasta su bifurcación adyacente al plano aórtico distal. Se preparó el homoinjerto pulmonar terminando de tallarlo según la morfología del receptor y eliminando en todo lo posible el faldón muscular inferior y en la parte distal la bifurcación pulmonar, suturando distal y proximalmente el homoinjerto con polipropileno de 5/0 (ProleneE® SXPL2400 Ethicon US). Tras verificar la hemostasia y la correcta alineación del injerto, se fue retirando la asistencia de la bomba, se salió de circulación extracorpórea y se reinfundió todo el volumen del reservorio lentamente.

Durante el cierre se realizó el bloqueo con anestésico local ya comentado del 2º al 6º espacio intercostal, inyectados desde la cara externa del paquete intercostal vasculo nervioso. Se colocó un tubo de drenaje torácico en la porción posterior del 5º espacio intercostal al que se ajustó una válvula de Heimlich casera, (un dedo de guante fenestrado e impregnado en vaselina en su cara interna)

para el drenaje de aire y posibles colecciones que fue retirado a las 24 horas de la intervención.



Figura 13. Homoinjerto tallado previo a su implante En el centro de la fotografía se aprecian los velos pulmonares cerrados.

2.1.3- Control postquirúrgico

Tras finalizar la intervención, se cerró el vaporizador de sevoflorano, iniciando la fase de recuperación anestésica. Recuperada la ventilación espontánea, el reflejo deglutorio y el palpebral, se extubó a los animales, manteniendo la oxigenoterapia mediante mascarilla y aplicando calor por medio de mantas térmicas, durante el periodo de recuperación.



Figura 14. Animal estabulado tras la intervención quirúrgica. Se aprecia en su costado el drenaje con el sistema rudimentario de Heimlich.

Comprobado el correcto estado tanto hemodinámico como respiratorio, fue trasladado a una sala aclimatada, bajo vigilancia y asistencia hasta su completa recuperación. El animal permaneció estabulado en dicha sala hasta el día siguiente y tras su evaluación, llevado de nuevo a la unidad de hospitalización. La medicación postoperatoria, consistió en carprofeno 4mg/kg/24horas vía subcutánea, durante cinco días, como terapia antiinflamatoria y amoxicilina-clistina (EupenPlus® 100 ml Fatro Iberica) a dosis de 15 mg/kg/24h vía intramuscular, como antibioterapia, durante 9 días.

Como analgesia postoperatoria, utilizamos fentanilo transdérmico (Durogesic® Matrix 50 Janssen Cilag) a dosis de 100mcg/h las primeras 72 horas. El parche se aplicó en la zona lumbo-sacra, después de rasurar la piel en seco y sin provocar heridas y/o laceraciones que alterasen su

liberación. Debido a que el parche se colocó el día de la intervención, hasta que las concentraciones plasmáticas de fentanilo alcanzasen niveles terapéuticos, se administró metadona a dosis de 0,2mg/kg cada 4 horas.

Transcurridas 72 horas, se administró como analgésico postoperatorio buprenorfina (Buprex®) 0,01 mg/kg cada 8 horas, vía intramuscular.

Durante el periodo postoperatorio se comprobó la ausencia de signos de enfermedad, dolor o malestar, comprobando en todo momento la correcta ingesta de alimento y agua.

3- RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR CARDIACA

A los 6 meses de la intervención quirúrgica los animales fueron anestesiados para la realización de una RMNC y posteriormente sacrificados.

Para la realización de la RMN los animales fueron preanestesiados con midazolam (0,25 mg/kg) y metadona Intramuscular (0,1 mg/kg IM). Tras 15 minutos se procedió a la venoclisis de la vena cefálica y a administrarse propofol a dosis de 2 mg/kg como inductor anestésico, y el mantenimiento se realizó con isofluorano al 2% durante el procedimiento.

El equipo utilizado para la obtención de las imágenes de CRM fue un equipo de Resonancia Magnética 3.0 T HDx de General Electric perteneciente a la Fundación Investigación Sanitaria en León y ubicada en la Unidad Experimental de

Diagnóstico por Imagen en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León.

Todos los estudios se realizaron con una antena específica CRM de 8 canales de General Electric (HD Cardio Array) y se utilizó el sincronismo cardiaco y respiratorio propio de la máquina para la obtención de imágenes. Dado el equipo utilizado cabe señalar que los nombres de las secuencias son las empleadas por GE.

Para el estudio de RMNC los animales se posicionaron en la camilla deslizante de la máquina, en decúbito lateral derecho con la parte craneal hacia el exterior del equipo y la entrada del animal dentro del Gantry (tubo de exploración en el equipo de IRM) se realizó en sentido caudo-craneal y en posición inversa. En el posicionamiento en decúbito lateral las extremidades delanteras se extendieron en dirección craneal y las traseras en dirección caudal. En ambas posiciones, las extremidades se separaron con almohadillas para evitar el contacto directo entre ellas y las consiguientes quemaduras producidas por las Radiofrecuencias.

4- EUTANASIA

Habitualmente se realizó una vez anestesiado el animal después de la resonancia. Se profundizaba la anestesia con propofol 4 mg/kg y a continuación T61 Intervet International GMBH (Embuitramida, Mebezonio yoduro y Tetracaina clorhidrato) como eutanásico a dosis de 0,3 ml/kg. En caso de retrasar el sacrificio se despertaba al animal y, antes del procedimiento, se realizaba la misma

pauta de preanestesia y sedación (midazolam, metadona y propofol) y luego el T61 intravenoso.

En todos los casos en la necropsia se realizó un estudio macroscópico completo. En el primer caso, y posteriormente en los dos primeros animales que llegaron a cumplir los 6 meses de estudio, se añadió un estudio microscópico de cerebro, hígado, bazo y pulmón. Tras verificar la ausencia de signos infecciosos o tromboembólicos en las necropsias se obvió el estudio microscópico de los restantes órganos, centrando el estudio micro en la pieza cardíaca.

La extracción del homoinjerto se realizó siguiendo el acceso por 4º espacio intercostal izquierdo que se empleó en la primera intervención, se explantó en bloque la raíz pulmonar y la raíz aórtica para evaluar los cambios en la raíz implantada respecto al tejido aórtico autólogo no procesado.

5- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS

Para poder comparar los resultados en las muestras obtenidas tras el implante a los 6 meses, nos basamos en las mismas pruebas empleadas durante el desarrollo de los estudios in vitro con algunas modificaciones.

Para evaluar la celularidad de las muestras sólo se realizaron pruebas de microscopía, H-E y SEM. En fases previas de la investigación habíamos empleado el Alamar Blue para la cuantificación celular, el motivo para no utilizar la misma sistemática previa fue que, mientras que en la fase

previa lo que intentábamos demostrar era la eficacia de un protocolo de descelularización sobre una población homogénea, lo que buscábamos a los 6 meses del implante era valorar qué tipo de celularidad se había obtenido y con qué disposición.

En cuanto a la tipificación de la matriz, se siguió el mismo protocolo de pruebas de imagen y análisis cuantitativo de los componentes.

No se realizaron test biomecánicos in vitro por la escasez y valor de las muestras obtenidas. Para realizarlas es necesario emplear entre $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{3}$ de la totalidad del tejido valvular, fragmentos "fáciles" de obtener en ensayos in vitro, pero limitados en las muestras valvulares tras su implante animal.

Como contraprestación a la ausencia de test biomecánicos, se analizó el funcionamiento valvular in vivo y se cuantificaron las dimensiones y flujos pulmonares mediante Resonancia Nuclear Magnética Cardíaca. En el momento de redacción el análisis de los resultados no se ha llegado a completar, quedando pendiente. En cualquier caso el valor de los estudios aumentará considerablemente cuando se puedan comparar con los obtenidos de animales con homoinjertos recelularizados, siguiente fase en la que el grupo se encuentra en la actualidad.

La metodología que se siguió con las válvulas explantadas fue la siguiente:

Una vez obtenida y tallada la pieza quirúrgica (9 válvulas pulmonares y 9 aórticas), las válvulas fueron divididas en

sus tres velos de forma que cada segmento contuviese faldón muscular, arteria y velo, y se distribuyeron del siguiente modo:

- El velo no coronario fue fijado en formol e incluido en parafina para técnicas de anatomía patológica convencionales con hematoxilina-eosina (Ver protocolo III en anexos). De las 18 muestras se analizaron al menos tres cortes del mismo velo. Cada uno de ellos fueron descritos de forma independiente por dos Anatomopatólogos, que analizaron la celularidad autóloga, la infiltración inflamatoria y la integridad de la matriz siguiendo una escala visual. La celularidad se estableció en una escala de tres grados: ausencia de celularidad, celularidad incompleta y celularidad similar a la del tejido normal. La estructura de la matriz se clasificó en tres grados según estuviesen conservada la estructura normal, parcialmente conservada o completamente alterada. En cuanto al infiltrado inflamatorio fue descrito pieza por pieza de forma objetiva.
- Del segundo de los velos coronarios se obtuvieron las 18 muestras para cuantificar la concentración de elastina, colágeno y glucosaminoglicanos. Se utilizaron kits colorimétricos comerciales específicos para cada componente extracelular: Para la detección de colágeno se utilizó el kit Sircol (ver protocolo VII en anexos), para la detección de la elastina se utilizó el kit Fastin (ver

protocolo VIII en anexos) y para la detección de glucosaminoglicanos se utilizó el kit Blyscan (ver protocolo IX en anexos). Se midió la colorimetría obtenida por absorbancia, en el lector de placas (Multiskan EX, Labsystems), con los filtros recomendados por el fabricante. Se restó el blanco a la medida de absorbancia. (ver anexos correspondientes).

- Por último el tercer velo se procesó para microscopía electrónica de barrido, para ver a nivel ultraestructural el estado de la matriz extracelular de la válvula tras el implante. (ver protocolo VI en anexos).

El número total de muestras procesadas procedentes de los animales operados fue de 54. A su vez los resultados obtenidos con cada segmento y estudio fueron comparados con velos pulmonares normales de oveja y con velos aórticos obtenidos del mismo animal. Por último los resultados obtenidos en la cuantificación bioquímica y las imágenes de SEM fueron comparadas con válvulas descelularizadas siguiendo el mismo protocolo pero no implantadas.

6- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los parámetros relacionados con el modelo experimental se empleó el programa Epi Info 7. Para Windows, versión 7.1.4.0.

Para todas las variables, se realizó un Test de Bartlett, para comprobar si la muestra seguía la normalidad. En el caso de que p fuese mayor a 0,05 la muestra era normal y el

análisis que se realizó fue el ANOVA de una vía. Por el contrario, si p era igual o menor a 0,05 la muestra se consideraba no paramétrica y, por tanto, se aplicó el test Kruskal-Wallis. De esta forma, se comprobó si existían diferencias estadísticamente significativas o no entre los periodos, para cada variable. Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas, si $p=0,05$.

Para el análisis de los datos realizados en los ensayos bioquímicos se utilizó el programa estadístico R (R Development Core Team (2011). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Fue necesario descargar los paquetes estadísticos *car*⁸², *gvlma* y *multcomp*.¹⁶⁴ La representación de los datos obtenidos se realizó como la media \pm error estándar de la media (EEM).

Para el desarrollo del análisis estadístico de los datos se aplicó un modelo lineal generalizado y se comprobó la distribución normal de los residuos. Sobre el modelo lineal, se realizó un análisis de varianza (*ANalysis Of VAriance*, ANOVA) factorial, para evaluar el efecto de cada factor presente, y se aplicó un ajuste *white adjust* (localizado dentro del paquete estadístico *car*). La variabilidad y heterogeneidad características de datos obtenidos a partir de muestras biológicas pueden generar el no cumplimiento de alguna de las asunciones del modelo, por lo que el ajuste se aplicó en todos los casos para asegurar la homocedasticidad en los residuos. Una vez realizada la ANOVA, se realizó un análisis *post hoc* con el test de Tukey para todos los factores y así evaluar el grado de

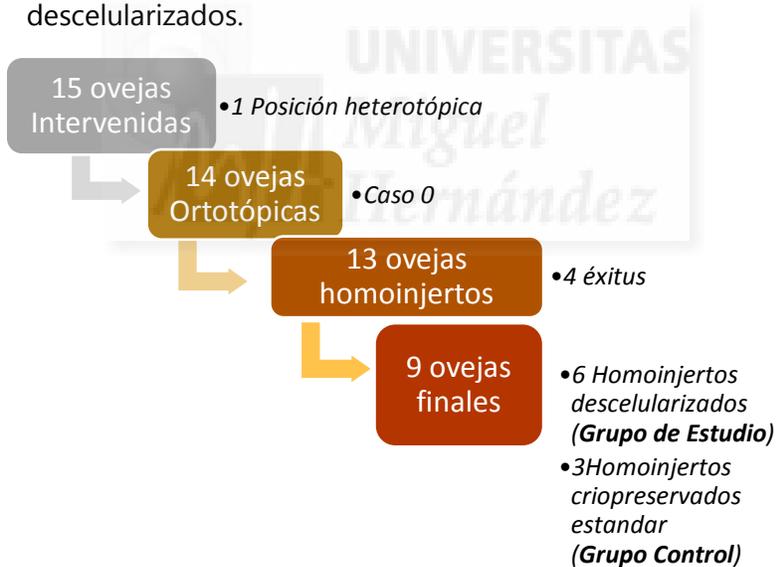
significación al realizar una comparación entre las clases del factor. Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.



V RESULTADOS



Fueron intervenidos a lo largo del estudio 15 ovejas, a una de ellas se le interpuso un homoinjerto criopreservado ovino sin tratar en aorta torácica descendente sin necesidad de circulación extracorpórea. Los restantes animales recibieron un sustituto valvular en posición ortotópica con necesidad de circulación extracorpórea. El primer animal sirvió como caso 0, y se substituyó su arteria pulmonar por un homoinjerto criopreservado ovino sin tratar, posteriormente y de forma simultánea se realizaron 3 sustituciones más por homoinjertos criopreservados normales y 10 sustituciones por homoinjertos ovinos descelularizados.



Esquema 5. Secuencia temporal y caracterización de los animales intervenidos.

El primer animal fue intervenido implantándose en posición heterotópica en aorta torácica descendente un homoinjerto criopreservado. El animal fue sacrificado al mes del procedimiento. Evaluados los resultados anatómicos y anatomopatológicos obtenidos en este primer caso se cambió de estrategia hacia un modelo ortotópico.

Solventados los problemas estratégicos secundarios del cambio de modelo, se inició la serie implantando todos los injertos valvulares en posición pulmonar. El primera animal (caso 0) murió a las 6 semanas del procedimiento. En la necropsia y el estudio anatomopatológico de las muestras obtenidas, se determinó como causa de muerte una endocarditis pulmonar por aspergillus. Las vegetaciones exuberantes sobre la válvula pulmonar condicionaron aumento de gradientes y destrucción de los velos que llevó a la pérdida del animal por fracaso ventricular derecho, que en la necropsia aparecía ya dilatado.

1-RESULTADOS CLÍNICOS

A nivel clínico, las mayores complicaciones operatorias fueron las respiratorias, fundamentalmente las sufridas durante el periodo postoperatorio inmediato. En un caso se produjo una parada cardiorrespiratoria que no respondió a las maniobras de RCP, posiblemente debida a un efecto depresor respiratorio residual del fentanilo en perfusión, ya que en los primeros casos, no se cesaba su

administración hasta finalizar el procedimiento. Este fue el único éxito en quirófano.

Se perdieron tres animales más durante el periodo de estabulación: el primero por una hemorragia súbita masiva a nivel de la anastomosis distal a las 48 horas de la intervención, como se demostró en el estudio postmortem, otro por un distrés respiratorio a las 24 horas y el tercero fue sacrificado al mes como consecuencia de una lesión en una extremidad durante su estabulación. Aunque la lesión no comprometía su situación cardiovascular ni respiratoria, desestimamos mantenerlo estabulado hasta los 6 meses por incapacidad del animal para mantenerse de pie, lo que en el caso de los rumiantes gregarios compromete su viabilidad.

En los restantes animales se completó el estudio, manteniendo la estabulación hasta los 6 meses, momento en el que se realizó una RMNC, posteriormente la eutanasia y el estudio necrópsico.

1.1 PARÁMETROS ANALIZADOS DURANTE LOS PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

Para facilitar su análisis, incluimos los parámetros hemodinámicos y valores de laboratorio en sangre periférica normales en la oveja en la tabla 2.

VALORES FISIOLÓGICOS OVEJA	
Temperatura (°C)	38,3-39,9
Frecuencia cardiaca (lpm)	63-120
Frecuencia respiratoria (rpm)	15-20
Presión arterial sistólica (mmHg)	136±5
Presión arterial diastólica (mmHg)	56±4
Presión arterial media (mmHg)	85±5
PaO ₂ (mmHg) (FiO ₂ = 0,21)	75-100
PaCO ₂ (mmHg)	30-40
pH	7,43-7,53
Na ⁺ (mmol/L)	140-164
K ⁺ (mmol/L)	4,2-6,7
Cl ⁻ (mmol/L)	113-121

Tabla 2. Valores fisiológicos de la especie ovina.

Las variables más importantes analizadas durante el procedimiento quirúrgico fueron:

Tiempos y temperaturas: Los tiempos y temperaturas analizadas durante los procedimientos fueron los siguientes:

Tiempos (minutos)	
Anestesia	223,18
Cirugía	150,18
Circulación Extracorporea	41,12
Recuperación de respiración espontanea	7±2
Extubación	15±3
Temperaturas (°C)	
Inicial (mediana)	37,8
Final	35,5
Descenso medio de la temperatura pre y post (%)	6,04

Tabla 3. Valores medios de tiempo y temperaturas obtenidos.

Comparadas las temperaturas registradas la temperatura final fue 2.28°C menor que la inicial, lo que supone un 6.04% menor que la inicial.

Constantes hemodinámicas: Las variables analizadas fueron:

	Pre- operatorio	Durante la CEC	Post- operatorio
Presión arterial sistólica (mmHg)	100,58±9,31	80,29±13,29	104,09±17,04
Presión arterial diastólica (mmHg)	77,59±11,15	70,67±9,82	83,54±14,18
Presión arterial media (mmHg)	85,75±9,34	74,45±11,86	91,96±17,33
Frecuencia cardíaca preoperatoria (lpm)	89,45±14.74	102,64±18.51	96,15±9,13

Tabla 4. Valores medios de presión sistólica, diastólica y media así como frecuencia cardíaca obtenidos durante el procedimiento quirúrgico.

El análisis estadístico de los resultados, obtuvo diferencias significativas comparando cada una de las medias, pre y postoperatoria, con las mismas medias durante el periodo de CEC.

Sólo la comparación entre presión arterial diastólica antes de la CEC y en CEC mostró diferencia aunque no significativa ($p=0.072$ ANOVA). Es importante aclarar que

durante el periodo de CEC no podemos considerar como tales las presiones diastólicas, tomando como valores las presiones menores dentro del registro ondulado característico de las bombas de rodillo como la que empleamos.

Es llamativo el dato de que las presiones medias antes y después de la CEC fueron significativamente mayores que la presión media de perfusión durante la CEC ($p=0.005$ y $p=0.002$ respectivamente ANOVA).

Gasometría arterial e ionograma: Los parámetros analizados fueron:

	Preoperatoria	Durante la CEC	Postoperatoria
PH	7.41±0.06	7.37±0.10	7.30±0.08
PO₂ (mmHg)	187.27±22.36	231.90±45.28	178.22±56.07
PCO₂ (mmHg)	41.76±7.91	41.46±10.67	49.69±11.94
K⁺ (mEq/l)	3.16±1.05	2.82±4.49	2.70±0.42
Na⁺ (mEq/l)	152.61±16.66	147.46±4.33	147.76±2.68
Cl⁻ (mEq/l)	111.23±4.81	112.61±2.63	111.76±3.19

Tabla 5. Valores medios en la gasometría arterial e ionograma obtenidos

El PH descendió en un 0,54% en la fase de CEC y un 0.95% en el periodo post CEC, respecto a los valores basales. En el análisis estadístico comparando las medias de PH obtenidas antes, durante y después de La CEC se comprobó que las diferencias obtenidas sólo fueron

significativamente diferentes comparando el periodo preCEC frente al periodo postCEC con una p 0.00098 (ANOVA).

En cuanto a la PO_2 , se vio incrementada, siempre respecto a su valor basal, en un 23,84% en el periodo CEC, mientras que en el postCEC experimentó un descenso del 4,83%, siempre dentro de valores fisiológicos. En cuanto a la comparación entre los tres periodos, fueron significativas las diferencias entre las medias de los periodos Pre y Post CEC frente a las medias obtenidas durante la CEC (p 0.0022 y 0.029 respectivamente)

La evolución de la PCO_2 desde el inicio del procedimiento hasta el periodo de circulación extracorpórea, descendió un 0,74%, aunque posteriormente, se incrementó un 18,96% en el periodo Post respecto su valor basal, alcanzando valores de hipercapnia permisiva. En la comparación estadística no se encontró ninguna combinación con diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$), aunque la diferencia entre la PCO_2 basal frente a la Post CEC rozó la significación con una p 0.057.

La evolución de los iones monitorizados fue la siguiente:

La concentración de Na^+ disminuyó en un 3.37% y un 3,17% en los periodos de CEC y PostCEC respectivamente, sin significación estadística.

Analizando los datos de la gasometría arterial, se comprobó que desde el inicio del procedimiento hasta la

fase de CEC, los niveles de potasio se redujeron un 10,92%. En el periodo PostCEC mostró una disminución del 14,58% respecto al valor inicial. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones realizadas.

La concentración de Cl^- mostró un ascenso del 1,24% en el periodo de CEC, e incrementó su valor en un 0,48% en el periodo PostCEC respecto al basal. Las comparaciones efectuadas no fueron estadísticamente significativas.

2- RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Como hicimos en la fase previa del estudio del modelo de descelularización, realizamos el estudio diferenciando los tres segmentos anatomopatológicamente diferentes: el velo valvular, la pared arterial y por último el miocardio del faldón. La diferenciación de estas tres partes tiene más sentido, como más tarde veremos, no sólo por sus diferencias histológicas, sino también por la diferente respuesta obtenida en los protocolos de decelularización, en cuanto a eliminación del componente celular y limitación del daño a la matriz.

Se tomaron como referencia los hallazgos obtenidos en la válvula aórtica del mismo animal, y de igual manera se comparó el resultado del grupo de estudio con las muestras obtenidas del grupo de los homoinjertos criopreservados no sometidos a ningún proceso de descelularización, últimos 3 casos.

En el ensayo ciego anatomopatológico se utilizó una graduación: poco (+), medio (++) y mucho (+++), para clasificar los cortes histológicos obtenidos en función del grado de celularidad y estado de la matriz respecto al presentado en el tejido procesado en Fresco (no ha estado expuesto a ningún tipo de tratamiento). Se consideró que el proceso fue óptimo en cuanto al grado de celularidad, si su puntuación resultó escasa (+) y en relación al estado de la matriz si su puntuación fue elevada (+++).

CASO	SUSTITUTO	GRADO CELULARIDAD		
		VELO	ARTERIA	MÚSCULO
Oveja 1	H crio	+	++	+++
Oveja 2	H crio	+	++	+++
Oveja 3	H crio	+	+	+++
Oveja 4	H decel	+	++	+++
Oveja 5	H decel	+	++	+++
Oveja 6	H decel	+	++	+++
Oveja 7	H decel	+	++	++
Oveja 8	H decel	+	+	+++
Oveja 9	H decel	+	++	++

Tabla 6. Hallazgos histológicos en cuanto al grado de celularidad observados mediante microscopía óptica convencional de campo claro con tinción de Hematoxilina Eosina

Los resultados se mostraron separados por zonas de la válvula a considerar, Velo, Arteria y Músculo. Siguiendo la misma escala se analizó el endotelio en cada uno de los segmentos.

CASO	SUSTITUTO	ESTADO MATRIZ		
		VELO	ARTERIA	MÚSCULO
Oveja 1	H crio	+	++	++
Oveja 2	H crio	+	+	++
Oveja 3	H crio	+	+	++
Oveja 4	H decel	+	+	++
Oveja 5	H decel	+	+	+++
Oveja 6	H decel	+	+	++
Oveja 7	H decel	+	+	++
Oveja 8	H decel	+	+	++
Oveja 9	H decel	+	++	++

Tabla 7. Hallazgos histológicos en cuanto al estado de la matriz observados mediante microscopía óptica convencional de campo claro con tinción de Hematoxilina Eosina

Al tratarse de una escala cualitativa, cuando existió conflicto en la calificación de las muestras se buscó un nuevo especialista fuera del grupo investigador.

CASO	SUSTITUTO	ENDOTELIO	COMENTARIOS
Oveja 1	H crio	+	Cambios post Cx
Oveja 2	H crio	+	Cambios post Cx
Oveja 3	H crio	+	
Oveja 4	H decel	+	Cambios post Cx
Oveja 5	H decel	+	Reacción ptos sutura
Oveja 6	H decel	+	
Oveja 7	H decel	+	
Oveja 8	H decel	+	
Oveja 9	H decel	++	Cambios post Cx

Tabla 8. Hallazgos histológicos en cuanto al estado del endotelio observado mediante microscopía óptica convencional de campo claro con tinción de Hematoxilina Eosina

2.1 RESULTADOS EN EL VELO VALVULAR

En todos los casos estudiados la celularidad obtenida sobre los velos fue muy escasa o prácticamente nula. Los únicos núcleos aislados se encuentran dispersos sin ningún patrón organizativo.

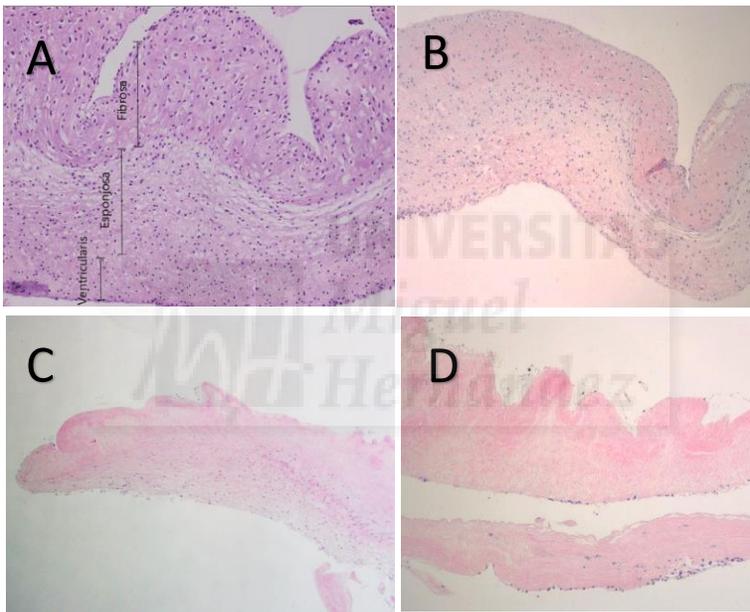


Figura 15. Imágenes correspondientes a velos pulmonares teñidos con HH vistos por microscopía convencional de campo claro.10X **A** Velo pulmonar en fresco **B** Velo aórtico del animal de estudio **C** Velo pulmonar correspondiente a un homoinjerto Criopreservado **D** Velo pulmonar correspondiente a un homoinjerto descelularizado

Sólo 1 de los 9 casos presentó escasa celularidad exclusivamente en la capa ventricularis, el mencionado

caso correspondía a un homoinjerto criopreservado, los otros dos homoinjertos no tratados y criopreservados mostraron el mismo grado de celularidad que los homoinjertos decelularizados, es decir prácticamente nula.

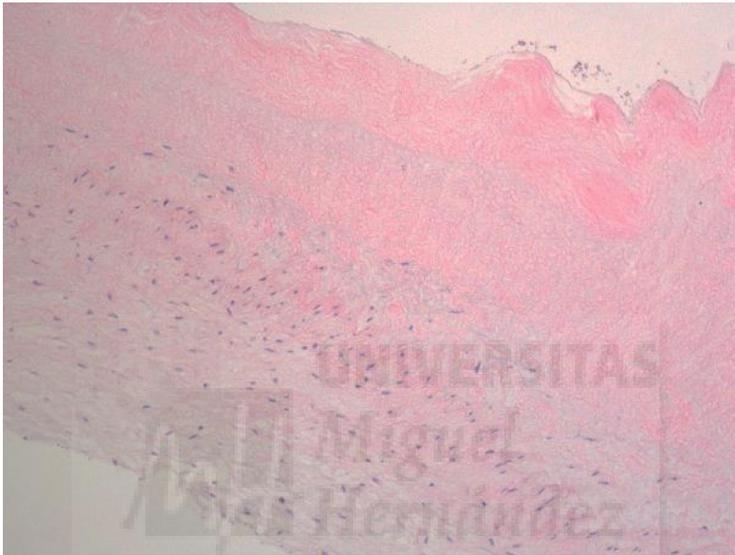


Figura 16. Imagen correspondiente a un velo pulmonar de un homoinjerto criopreservado, teñido con HH visto por microscopía convencional de campo claro 10X. Se aprecia la ausencia de celularidad en las capas superiores, aunque se mantiene la disposición de las fibras en su interior.

La celularidad observada en las válvulas aórticas de los mismos animales fue normal, comparable a las muestras obtenidas de animales en fresco.

En cuanto al grado de conservación de la matriz, se siguió un criterio muy estricto en su valoración, en todas las muestras eran fácilmente identificables las tres capas,

como se muestra en la figura 17, y en todas ellas también eran identificables la disposición de sus fibras, no obstante si las comparamos con sus correspondientes velos aórticos su grado de estructuración era significativamente menor. Los resultados en este aspecto fueron similares en el grupo control y en el de los homoinjertos descelularizados.



Figura 17. Imagen correspondiente a un velo pulmonar de un homoinjerto descelularizado, teñido con HH vistos por microscopía convencional de campo claro 10X.

2.2 RESULTADOS EN LA PARED ARTERIAL

Las muestras analizadas mostraron un grado de celularidad moderado, en un caso de cada grupo la celularidad fue algo menor. La celularidad ha sido discretamente superior

en los homoinjertos criopreservados frente a los descelularizados, si bien su distribución es muy parecida. La capa adventicia muestra un patrón casi normal. En la capa media existen zonas completamente descelularizadas y núcleos de más alta celularidad con tendencia a organizarse en un patrón normal. La capa íntima prácticamente no tiene componente celular en ninguno de los dos grupos. Por el contrario, y como es normal, las muestras de tejido aórtico como las muestras en fresco, mostraron una disposición celular en forma de columnas o filas, ocupando los espacios entre las fibras del tejido conectivo.

En cuanto a la conservación de la matriz, como norma general los resultados son parecidos a los obtenidos en el velo con un nivel de conservación algo mayor. En particular en dos de los casos, correspondientes uno a cada grupo, coincidiendo con aquellos en los que el componente celular era más abundante, la matriz presenta una disposición más armónica y similar al tejido en fresco.

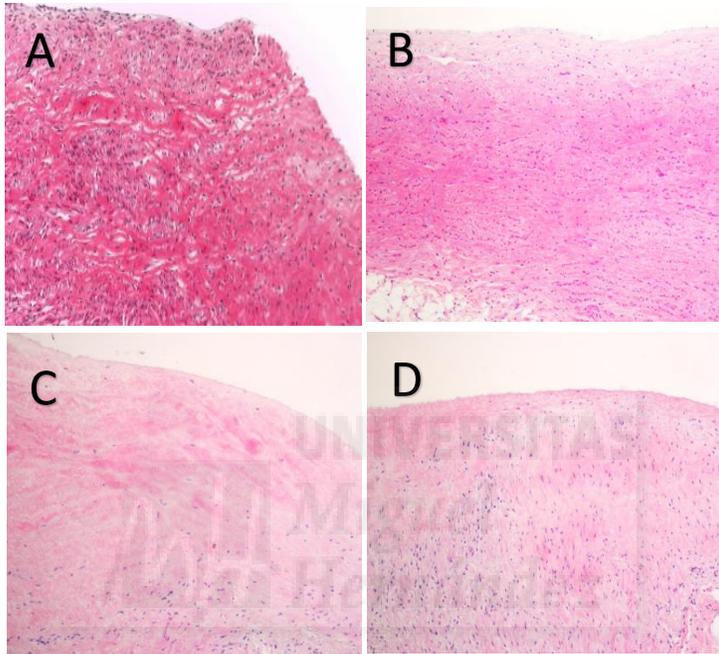


Figura 18. Imágenes correspondientes a pared arterial teñidos con HH vistos por microscopía convencional de campo claro 10X. **A** Pared pulmonar en fresco **B** Pared arterial aórtica del animal de estudio **C** Pared arterial pulmonar correspondiente a un homoinjerto Criopreservado **D** Pared arterial pulmonar correspondiente a un homoinjerto descelularizado

2.3 RESULTADOS EN EL FALDÓN MUSCULAR

Su análisis ofrece los resultados más sorprendentes, en todas las muestras, y en particular en un homoinjerto descelularizado el componente celular era prácticamente normal. La concentración de núcleos fue homogénea y similar en los dos grupos, sólo muy discretamente inferior al mismo segmento de las válvulas aórticas. En un estudio más detallado se observa de forma uniforme en todas las muestras que la disposición celular asemeja a la del tejido muscular normal, disponiéndose en hileras que forman las fibras. A mayor aumento, desgraciadamente, las estrías típicas de las fibras musculares están ausentes en todas las muestras, lo que se traduce posiblemente en ausencia de función contráctil organizada.

En cuanto al estado de la matriz fue también la porción con mejor conservación. Cabe destacar que la presencia de fibrosis, calcificación o infiltración histiocitaria en esta zona sólo fue adyacente a los puntos de sutura como comentaremos inmediatamente.

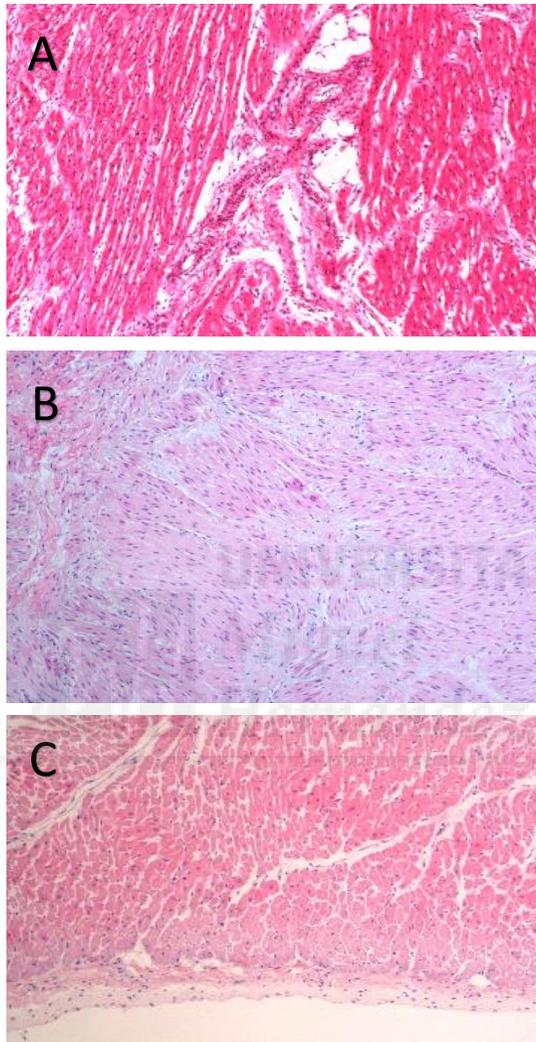


Figura 19. Imágenes correspondientes al faldón muscular teñidos con HH vistos por microscopía convencional de campo claro 10X. **A** Faldón muscular en fresco **B** Faldón muscular pulmonar correspondiente a un animal del grupo control **C** Faldón muscular pulmonar de un homoinjerto descelularizado

2.4 RESULTADOS EN EL ENDOTELIO:

La revisión retrospectiva de los cortes histológicos de las muestras se realizó valorando el endotelio obtenido siguiendo la misma regla. Se asignó tres cruces (+++) cuando las características endoteliales fueron similares a las de la válvula aórtica del mismo caso (epitelio estratificado, plano, uniforme y sin interrupciones), cuando el endotelio no existió o sólo apareció en áreas correspondientes a menos de un tercio de la superficie del corte y sobre todo de aspecto pleomorfo se le asignó una cruz (+), por último cuando las características halladas fueron intermedias se le asignó dos cruces (++) .

Todas las muestras del grupo de estudio mostraban células endoteliales sobre el velo pulmonar, aunque en ningún caso el patrón era el de un endotelio organizado similar al aórtico. Sólo en una válvula pulmonar descelularizada se apreciaba un endotelio estructuralmente mejor, pero que se desprendía con facilidad, de características bastante uniformes pero sólo en aproximadamente la mitad de su superficie.

El análisis de los distintos segmentos valvulares, mostró que el velo tuvo menos tendencia a colonizarse por endotelio, hecho que coincide con el tejido menos recelularizado. La zona con mejor comportamiento relativo fue la arteria, como se muestra en la figura 20.

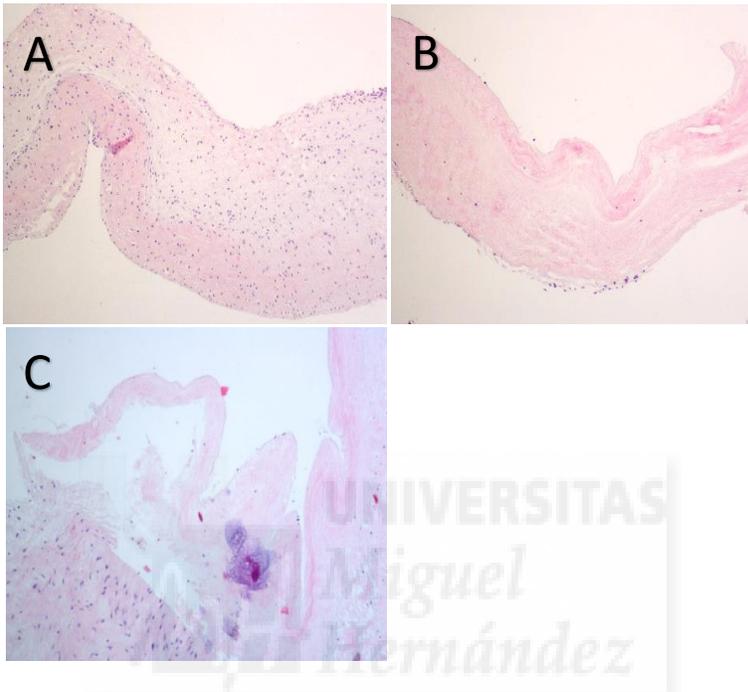


Figura 20. Imágenes correspondientes al faldón muscular teñidos con HH vistos por microscopía convencional de campo claro 10X. **A** Velo Aórtico de control **B** Velo pulmonar correspondiente a un Homoinjerto descelularizado **C** Faldón muscular, Pared arterial y Velo pulmonar de un homoinjerto descelularizado

2.5 OTROS HALLAZGOS

Como hallazgo incidental pero importante, en los estudios histológicos sobre las válvulas aórticas se identificaron en tres muestras formas larvarias de parásitos. Por el contrario no se halló en ninguna válvula pulmonar implantada,

posiblemente por la mayor selección que se realizó de los donantes valvulares.

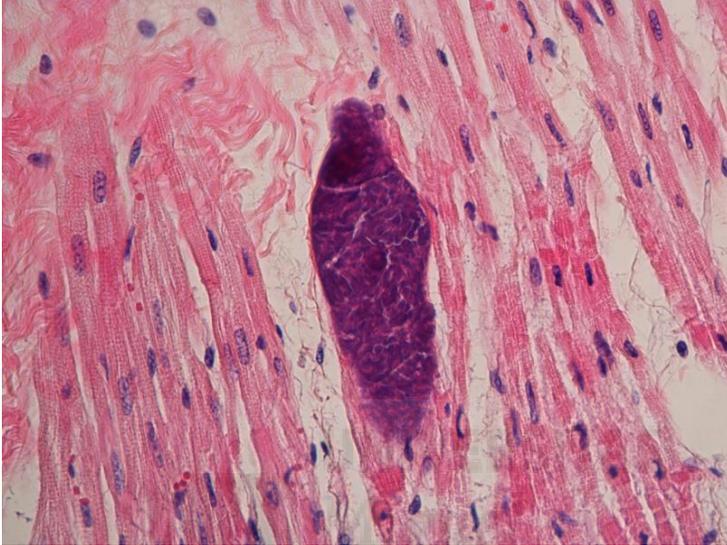


Figura 21. Faldón muscular de raíz aórtica del grupo control teñido con HH visto por microscopía convencional de campo claro 100X. Se aprecia una forma larvaria posiblemente de una filaria sin infiltrado linfocitario. En las fibras musculares adyacentes se aprecia con facilidad la estriación típica de las fibras musculares.

En ninguna muestra de tejido valvular se halló infiltración linfocitaria más allá las zonas más distales de los bordes superior e inferior. Reacción vista íntimamente ligada a los puntos de sutura, como consecuencia de la reacción a cuerpo extraño (figura 22).

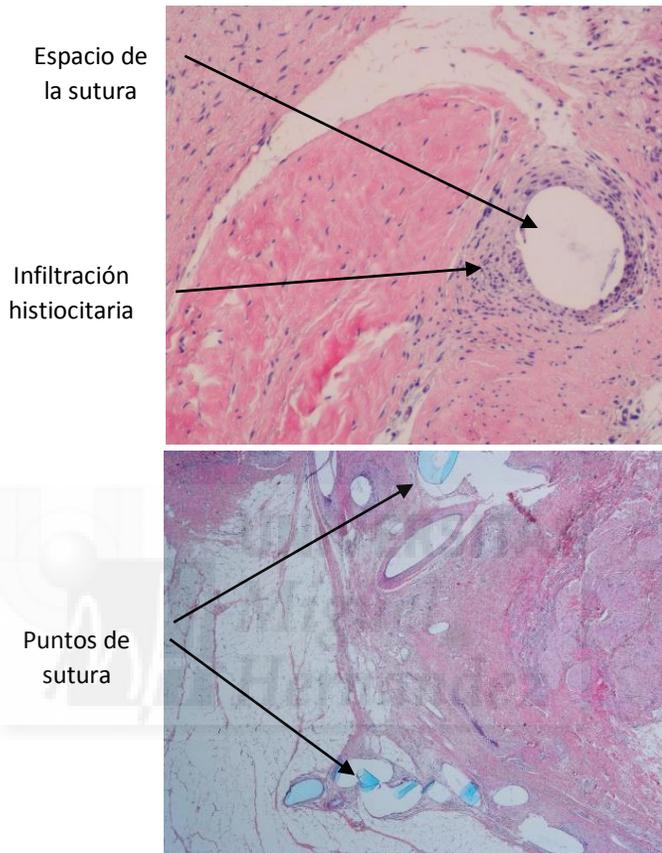


Figura 22. Faldón muscular de raíz pulmonar descelularizada teñido con HH visto por microscopía convencional de campo claro 10X.

En uno de los bordes también se encontró un granuloma en vecindad a las suturas (figura 23) y un foco de calcificación heterotópica (figura 24).

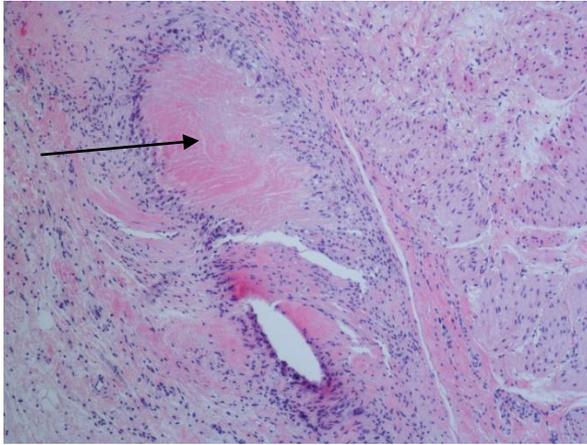


Figura 23. Faldón muscular de raíz pulmonar descelularizada teñido con HH visto por microscopía convencional de campo claro 10X. Se marca con la flecha un granuloma con infiltración periférica linfocitaria

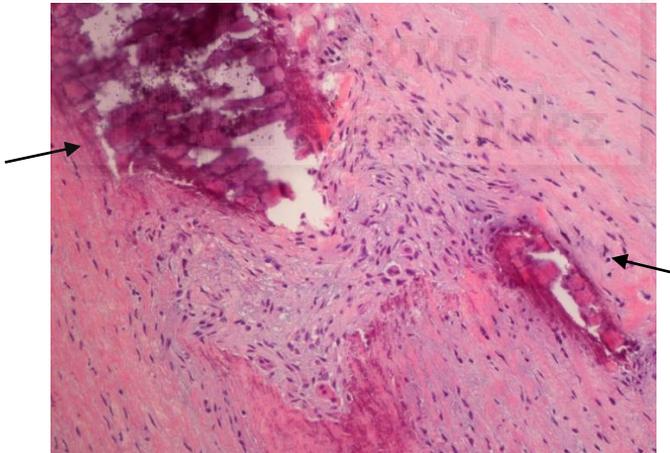


Figura 24. Faldón muscular de raíz pulmonar descelularizada teñido con HH visto por microscopía convencional de campo claro 10X. Marcados con flechas se aprecian focos de calcificación heterotópica.

En dos muestras se encontraron zonas de sangrado antiguas con presencia de hemosiderófagos, cercanas también a las zonas de sutura (figura 25).

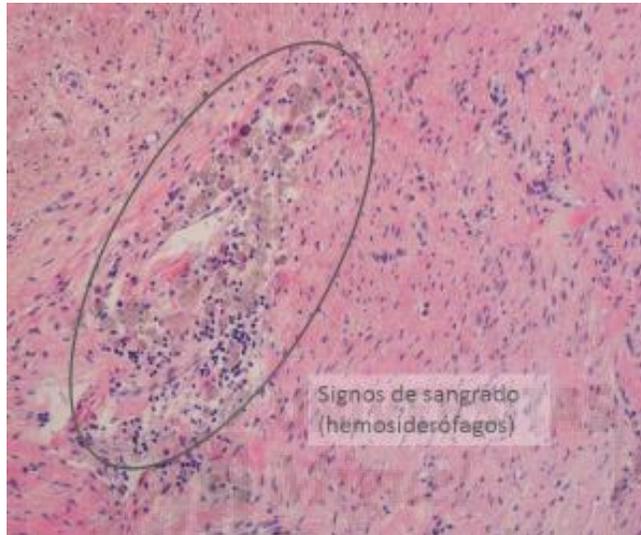


Figura 25. Faldón muscular de raíz pulmonar descelularizada teñido con HH visto por microscopía convencional de campo claro 10X. Hemosiderófagos.

La aparente regeneración celular del faldón, comparada con las mismas muestras de la válvula aórtica nativa, mostraron diferencias:

El tejido regenerado se dispone en fibras al igual que el miocardio normal, pero su orientación no es tan uniforme como en los demás tejidos comparados. Tampoco se aprecian las características estrías que forman las líneas y bandas oscuras y claras (lo que hace presumir la ausencia de actividad contráctil), y que a su alrededor aparecen

zonas de vacuolización similares a las observadas en enfermedades degenerativas de significado indeterminado.

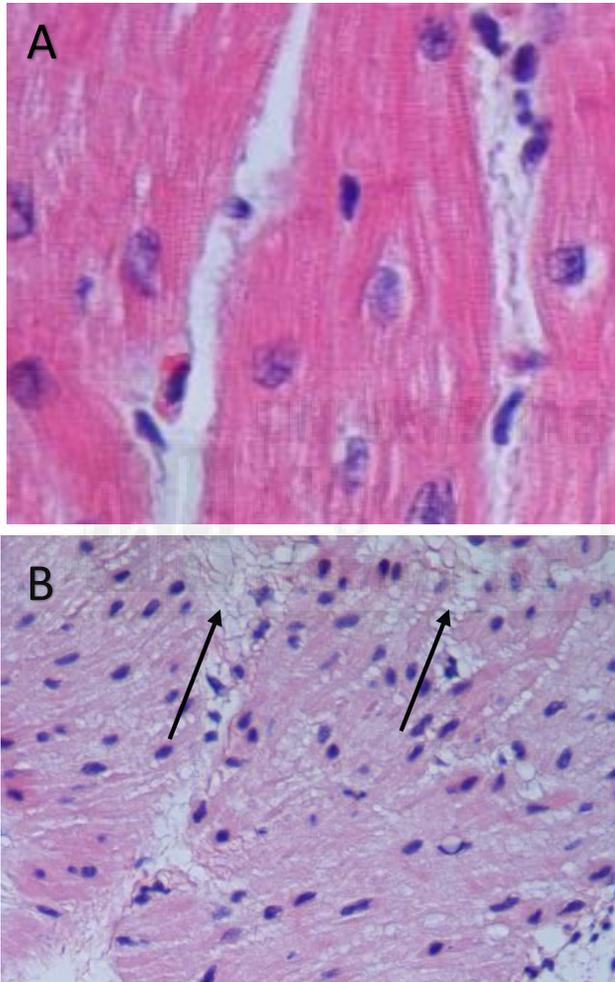


Figura 26. **A** Faldón muscular de raíz aórtica nativa. **B** Faldón muscular de raíz pulmonar descelularizada, ambas teñidas con HH donde se aprecian estrías sólo en la imagen A y fenómenos de vacuolización en la imagen B señaladas por flechas.

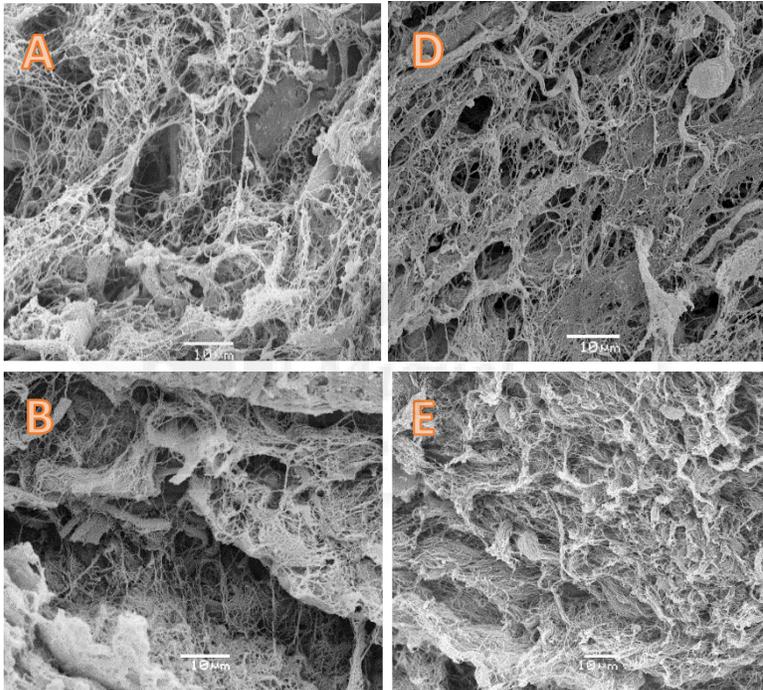
3- RESULTADOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las imágenes obtenidas por SEM proporcionaron otro punto de vista de la microestructura, complementaria a los resultados histológicos previos.

Si comparamos las imágenes obtenidas de las válvulas aórticas, (consideradas como muestras en fresco, ya que procedieron del propio animal sobre el que se realizó la intervención) las válvulas pulmonares descelularizadas y las válvulas pulmonares criopreservadas, se observa que no existen diferencias apreciables entre ellas, como se aprecia en la figura 27. La matriz extracelular presenta una gran organización de las fibrillas tridimensionales en las muestras de pared arterial (Figura 27- A, B y C) de las muestras procesadas a partir de las válvulas en fresco, descelularizadas y congeladas post-implante. Resaltar que en las estructuras no se apreció un componente celular incluido en la estructura tridimensional.

En las imágenes correspondientes al velo valvular, se muestra una clara disposición de las fibrillas, componentes de la estructura tridimensional, similar en los velos de las válvulas aórticas (o en fresco), de las válvulas pulmonares descelularizadas y en las válvulas pulmonares congeladas extraídas tras el protocolo experimental (Figura 27- D, E y F). En ningún caso se observó la presencia de componente celular en su interior en esta zona.

Es posible que el procesamiento de las muestras haya enmascarado la presencia de las mismas, dentro de la matriz extracelular, de la misma forma que muestra, que tras los tratamientos no se vio afectada la matriz.



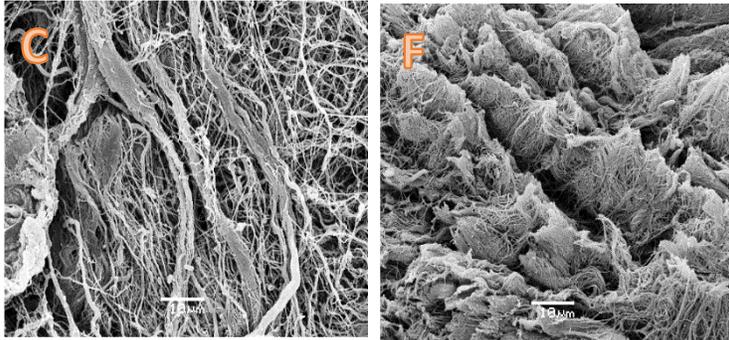


Figura 27. Comparación entre las muestras de SEM obtenidas de los fragmentos de arteria y velo de las válvulas aórticas; las muestras de arteria y velo, extraídas de las válvulas pulmonares descelularizadas post-implante y las muestras de arteria y velo, procesadas a partir de válvulas pulmonares congeladas post-implante. En todas las imágenes se muestra el alto estado de conservación de la matriz extracelular aunque cabe remarcar que ni en las válvulas nativas de las ovejas ni en las válvulas implantadas se aprecian signos de presencia celular en el interior de las estructuras tridimensionales. Visualizado a 1.000 aumentos en el microscopio de barrido. A Arteria. Válvula aórtica. 1.000 X. B Arteria. Válvula Pulmonar (DC). 1.000 X. C Arteria. Válvula Pulmonar (Cong). 1.000 X. D Velo. Válvula aórtica. 1.000 X. E Velo. Válvula Pulmonar (DC). 1.000 X. F Velo. Válvula Pulmonar (Cong). 1.000 X

Sobre las imágenes obtenidas de una oveja del grupo estudio, se pudo apreciar (Figura 28), cómo la superficie del velo valvular ha sido colonizada (como se corresponde con algunos resultados histológicos) por células presumiblemente de origen endotelial al estar en contacto directo con el flujo sanguíneo de la circulación pulmonar. Cabe resaltar la creación de una monocapa dónde las células han establecido uniones entre ellas de forma similar

a la observada en los velos valvulares nativos, es decir, sin descelularizar.

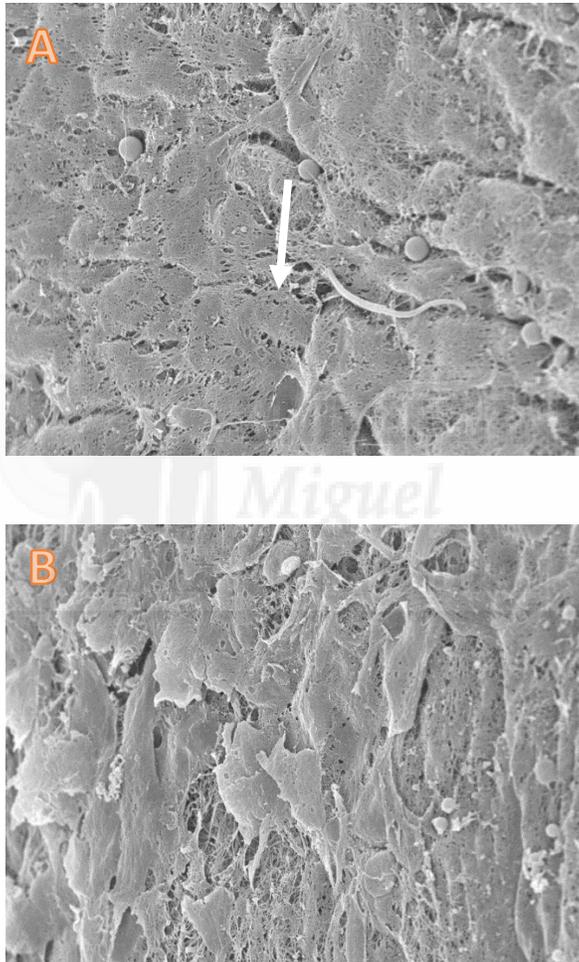


Figura 28: Imágenes de SEM de la válvula pulmonar descelularizada La flecha blanca muestra las células endoteliales recubriendo la superficie del velo valvular. A Velo válvula pulmonar DC. Oveja 1.2. 1.000X. B Velo válvula pulmonar DC. Oveja 1.2. 1.000X

4- RESULTADOS DE ENSAYOS BIOQUÍMICOS

Las principales proteínas constituyentes de la matriz extracelular son el colágeno, la elastina y los glucosaminoglicanos (GAG). La cuantificación de su concentración en los tejidos permitió comparar las muestras de los tejidos obtenidos a partir de las válvulas aórticas con las válvulas descelularizadas pulmonares y las válvulas congeladas pulmonares extraídas tras el protocolo experimental. Éstas técnicas se emplearon en la determinación del mantenimiento de las proteínas extracelulares tras el protocolo de descelularización al que se sometieron las válvulas pulmonares⁸⁷ y los tejidos que se explantaron a los 6 meses en el animal receptor.

4.1 DETECCIÓN DE COLÁGENO

Las muestras analizadas tanto en la detección de colágeno como de elastina fueron sólo la arteria y el velo, ya que el faldón muscular tiene como única función soportar la sutura proximal. La estructura residual de su matriz no tiene importancia, además en test previos demostraron la misma resistencia biomecánica sin verse afectados por el protocolo de descelularización.

Tras la extracción con el kit comercial Sircol, se obtuvo una reacción colorimétrica, de tonos rojizos, cuando se detectó presencia de colágeno. Se analizaron los valores de absorbancia obtenidos y se aplicó un análisis estadístico en base al modelo lineal generalizado.

En el análisis ANOVA no hubo diferencias significativas entre la concentración de colágeno en el velo de la válvula aórtica y el velo de las válvulas pulmonares, tanto las descelularizadas como las criopreservadas (Figura 29).

La concentración de colágeno fue similar entre las muestras de arteria analizadas a partir de las válvulas aórticas, las válvulas pulmonares descelularizadas y las válvulas pulmonares criopreservadas, no detectándose diferencias significativas entre ella (Figura 30).

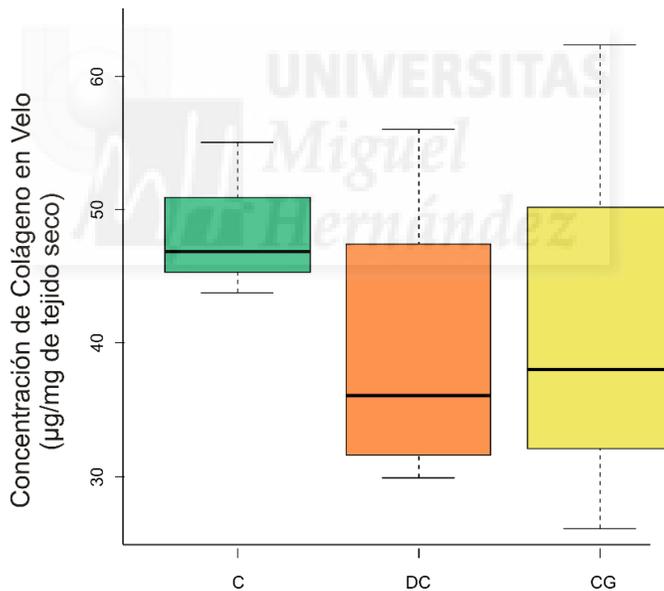


Figura 29. Gráfico de box plots para la concentración de colágeno en velo. No existieron diferencias significativas entre las válvulas aórticas control (C), las válvulas pulmonares descelularizadas (DC) y las válvulas pulmonares criopreservadas (CG).

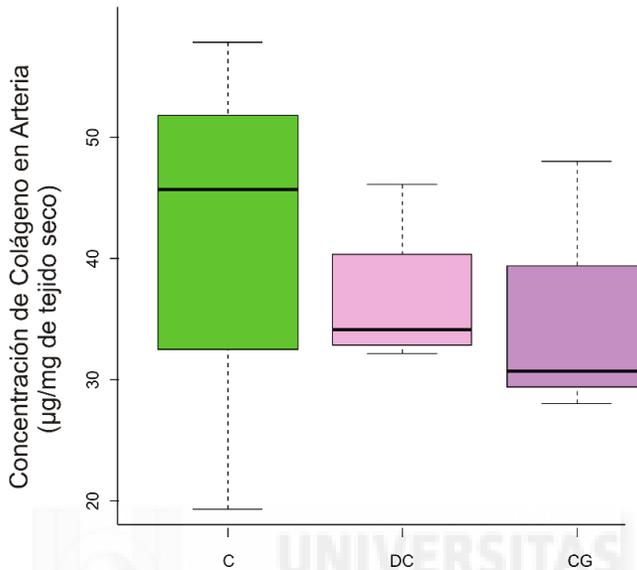


Figura 30. Gráfico de box plots para la concentración de colágeno en arteria. Se puede observar que no existieron diferencias significativas entre las válvulas aórticas control (C), las válvulas pulmonares descelularizadas (DC) y las válvulas pulmonares criopreservadas (CG).

4.2 DETECCIÓN DE ELASTINA

Cuando se detectó elastina en las muestras, con el protocolo de extracción del kit comercial Fastin, se obtuvo una reacción colorimétrica de tonos amarillentos. Se realizó el análisis estadístico sobre los valores de absorbancia obtenidos.

Se realizó el análisis con el conjunto de datos obtenidos y el análisis de varianzas ANOVA, detectó la ausencia de diferencias significativas entre el grupo control, las válvulas aórticas, y el grupo de estudio, las válvulas pulmonares

descelularizadas y las válvulas pulmonares criopreservadas. Esto implica que las concentraciones de elastina fueron similares independientemente del protocolo al que se sometieron las muestras (Figura 31 y 32).

Los análisis estadísticos evidenciaron que dicha similitud entre la concentración de elastina se mantuvo tanto en el velo como en la arteria.

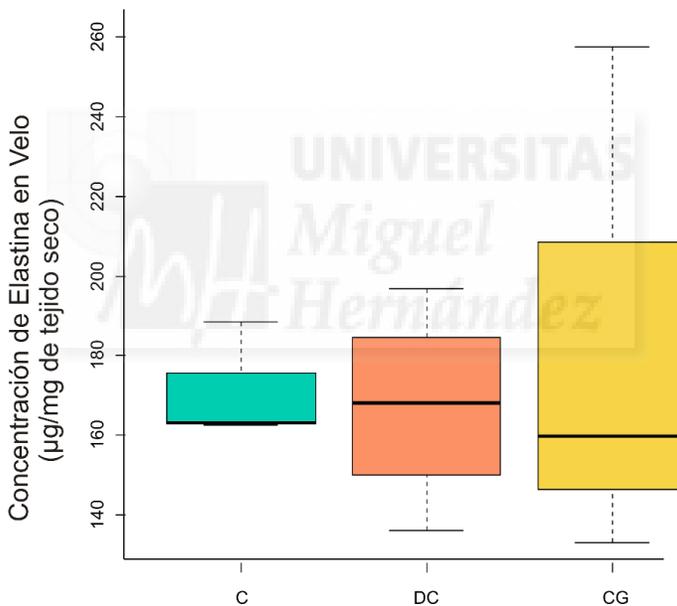


Figura 31. Gráfico de box plots para la concentración de elastina en velo. No existieron diferencias significativas entre las válvulas aórticas control (C), las válvulas pulmonares descelularizadas (DC) y las válvulas pulmonares criopreservadas (CG).

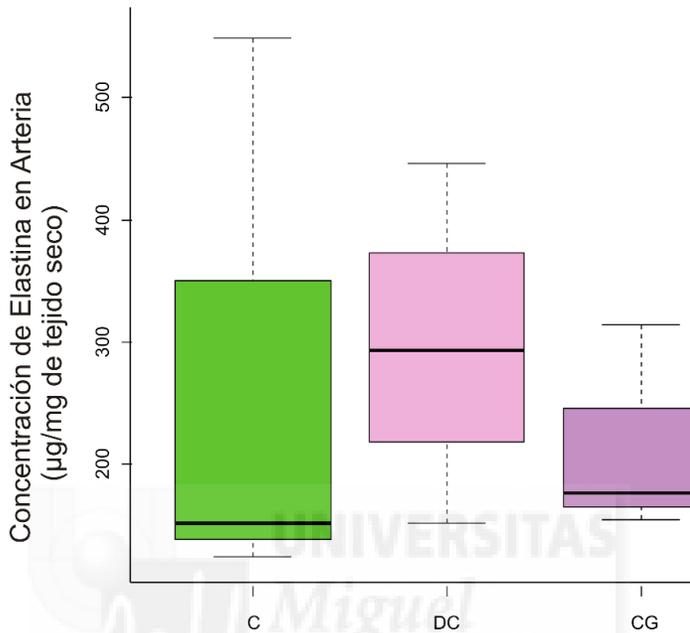


Figura 32. Gráfico de box plots para la concentración de elastina en arteria. No existieron diferencias significativas entre las válvulas aórticas control (C), las válvulas pulmonares descelularizadas (DC) y las válvulas pulmonares criopreservadas (CG).

4.3 DETECCIÓN DE GAG

Se realizó solo en el velo, ya que sólo él presenta una capa estructural conformada únicamente por glucosaminoglicanos, la capa esponjosa. Para la extracción de GAG se utilizó el kit comercial Blyscan, que permitió detectar su presencia con una coloración azulada que se midió por absorbancia.

Se realizó un análisis de varianza o ANOVA, los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio. Se mantuvo la concentración de GAG detectados tanto para los velos control (aórticos) como los velos estudio, pulmonares descelularizados y pulmonares criopreservados (Figura 33).

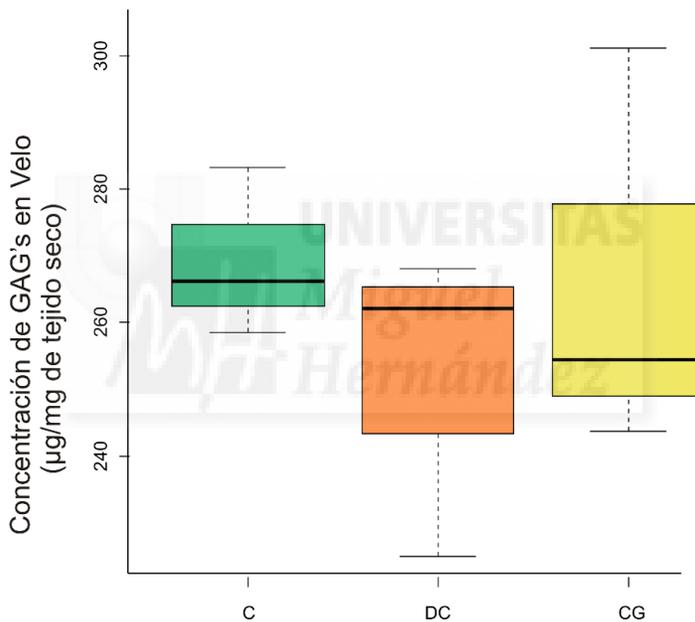


Figura 33: Gráfico de box plots para la concentración de glucosaminoglicanos (GAG's). No existieron diferencias significativas entre las válvulas aórticas control (C), las válvulas pulmonares descelularizadas (DC) y las válvulas pulmonares criopreservadas (CG).

VI DISCUSIÓN



Analizaremos los resultados obtenidos por objetivos. Comenzaremos la discusión con los datos relativos a los objetivos 1 y 2, es decir el desarrollo y análisis del modelo experimental. Posteriormente discutiremos el sustituto valvular que hemos empleado poniendo en contexto nuestra investigación con respecto a las últimas publicaciones relacionadas y por último compararemos nuestros resultados en las válvulas explantadas subdividiendo los resultados según el contenido celular hallado y la estructura de la matriz.

1. DISCUSION DEL MODELO EXPERIMENTAL

Tradicionalmente el desarrollo de los nuevos productos médicos comprendía una fase de investigación básica y preclínica muy larga, para posteriormente verificar los resultados en la fase clínica. Hoy en día, con el auge de la investigación traslacional y la necesidad de obtener resultados aplicables lo antes posible, la fase inicial se ha reducido considerablemente, en favor de estudios con enormes muestras poblacionales que tras la comercialización de un fármaco busca criterios de no inferioridad.

Los modelos experimentales biológicos son parte importante dentro del desarrollo de la tecnología sanitaria. Su uso está siendo relegado en la actualidad en favor de otros modelos experimentales in vitro menos costosos en términos económicos y a veces con criterios casi estéticos, como casi el abandono del modelo canino^{21,88-90}. Sin embargo, la experimentación animal sigue siendo un pilar básico antes de iniciar cualquier ensayo en fase clínica.

Hoy en día somos capaces de elegir entre los muchos modelos experimentales animales cual es el óptimo para desarrollar una línea de investigación, de forma que sus resultados sean extrapolables a los obtenidos en clínica humana, al menos en términos de seguridad. Sin embargo, todos tenemos en mente sonoros fracasos de la experimentación animal para prever resultados nefastos en humanos^{83,91}. Si analizamos los fallos uno por uno, siempre se pueden identificar errores de bulto en la elección, diseño, y desarrollo del modelo experimental, lo que debe llevar nuestro nivel de exigencia al máximo en esta fase del desarrollo de nuevos dispositivos o fármacos.

En general las normas exigen emplear como animal experimental al de menor porte en el que sus resultados sean previsiblemente trasladables al hombre. En el caso de patología miocárdica hemos visto últimamente la migración del modelo porcino a otros modelos de menor tamaño^{2,92-97}. Solo si el modelo se asociaba a instrumentación coronaria era necesario, por cuestiones técnicas, aumentar el tamaño del animal para facilitar el despliegue de los dispositivos intracoronarios^{3,88,98}. Para el desarrollo de sustitutos valvulares, es necesario acudir a animales de gran porte como modelos experimentales. La complejidad de intervenir animales pequeños continúa siendo un reto difícil de soslayar, y la traslación de los resultados obtenidos es aún desconocida.

Cuáles deberían ser las características de un modelo experimental biológico valvular:

1. Baja mortalidad.

2. Sencillez de desarrollo.
3. Similitud anatómica respecto a la anatomía humana.
4. Similitud del perfil trombogénico con respecto al hombre.
5. Validación e Implantación: Se considera más sólido en términos comparativos cuanto mayor es el número de investigadores que lo utilizan.
6. Durabilidad que permita analizar resultados a medio y largo plazo.
7. Económico.

El modelo biológico más empleado en la actualidad en cardiología es el modelo porcino, desgraciadamente como modelo valvular tiene limitaciones:

- Modelo trombogénico poco parecido al humano⁹⁹.
- Presenta variación anatómica en la raíz aórtica con respecto a la anatomía humana.
- Para modelos a medio y largo plazo son incómodos en su manejo, ya que crecen mucho en poco tiempo y el coste y las necesidades de estabulación varían a lo largo del tiempo de estudio.
- Su crecimiento puede ser útil para evaluar el comportamiento de dispositivos en periodo de crecimiento, pero es un inconveniente en dispositivos diseñados para ser implantados en humanos adultos que no varían de forma significativa su tamaño y por lo tanto su requerimiento.

Fundamentalmente por estos dos últimos motivos se han venido buscando otros modelos más uniformes que permitan tiempos de estabulación más largos y así poder prolongar el estudio de los dispositivos o fármacos a medio y largo plazo. No hay que olvidar que en la actualidad uno de los parámetros más exigentes en los nuevos dispositivos valvulares es su durabilidad, esta característica del tejido implantado varía mucho de unas especies a otras. Extrapolar los resultados interespecies nunca es sencillo y solo se consigue tras el empleo sistemático de los mismos protocolos con los mismos animales, durante periodos de estabulación muy largos. Como muestra, tanto la FDA como las normas ISO recomiendan estabulaciones superiores a las 20 semanas para dispositivos valvulares con el fin de obtener resultados comparables.

Uno de las alternativas al modelo porcino clásico, es la selección de razas de cerdos con menor crecimiento y más parecidos a los patrones humanos. Dichos modelos son caros, poco empleados en nuestra investigación y lo que es más importante fuera de nuestro alcance logístico. La segunda opción es emplear modelos más cercanos a nuestro medio, bien conocidos y que limiten alguno de los problemas anteriores.

En el año 1968 se publicó por primera vez el uso del modelo ovino en patología valvular¹⁰⁰, y así desde finales del siglo pasado han ido aumentando los grupos que emplean este modelo en patología valvular¹⁰¹⁻¹⁰⁴. En concreto, su empleo está ligado al uso de sustitutos valvulares biológicos, desplazando cada vez más al más

incómodo modelo porcino. Sin embargo, dos artículos pusieron en tela de juicio su utilidad, en el primero se demostró que la variabilidad genética de los animales procedentes de granjas de cría intensiva es muy baja¹⁰⁵, si lo que queremos es estudiar son fenómenos de rechazo, el modelo debería ser lo más próximo a la realidad en cuanto a diversidad génica. La solución sería fácil seleccionando adecuadamente de los animales incluidos en el estudio. El segundo artículo describió los resultados catastróficos de un xenoinjerto descelularizado ampliamente estudiado en ovejas que pasó a fase clínica para su implante en población pediátrica⁸³. El artículo fue demoledor y estigmatizó el animal como modelo valvular, si bien es cierto que resultados similares se habían producido con otros dispositivos probados en otras extirpes filogenéticas y más en concreto en el modelo porcino.

El corazón ovino es comparable al humano en tamaño y constituye un modelo idóneo para la evaluación del proceso de calcificación.^{101,105} Además, presenta un potencial de endotelización superior al descrito en humanos.¹⁰⁶

Schenke-Layland¹⁰⁷ demostró basándose en estudios de biomecánicos, que las válvulas porcinas son más resistentes que las válvulas ovinas. Esta diferencia permite al modelo ovino ser más sensible a los cambios biomecánicos que se produzcan en las válvulas tras la eliminación del componente celular, siempre y cuando los

periodos de estabulación que empleemos sean lo suficientemente prolongados.

A pesar de las críticas, todo parece indicar que el modelo ovino se va implantando en los estudios cardiológicos sobre animales de gran porte, por ejemplo el estudio animal que finalmente autorizó el uso de una de las prótesis aórticas implantables transcater, se realizó sobre un modelo Hufnagel ovino (Tratamiento sobre la aorta descendente sobre un animal con insuficiencia aórtica iatrogénica). Por añadidura la revisión de las normas ISO en su documento 5840 (incluyendo sus dos últimos suplementos, el último relativo al diseño de los estudios sobre modelos experimentales) reconocen al modelo ovino como el más empleado y útil en la actualidad, a nivel global, para el estudio de dispositivos valvulares.

Además de las ventajas que antes hemos descrito, en nuestro medio nos decidimos por el modelo ovino por los siguientes motivos:

- Las series publicadas sobre esta línea de investigación mostraban tendencia a hacerse cada vez más usando ovejas¹⁰⁰⁻¹⁰⁴.
- La Facultad de Veterinaria de la Universidad de León estaba empleando el animal como modelo en otras líneas de investigación, por lo que se tenía experiencia en su manejo anestésico.
- El modelo una vez desarrollado es reproducible, sencillo y accesible.

- Permite tiempos de estabulación largos en nuestro medio.

En nuestro país no existen en la actualidad líneas de investigación en patología valvular que empleen modelos experimentales animales (al menos que produzcan publicaciones científicas), solo en centros muy localizados podemos poner a un animal de porte en CEC, y en estas ocasiones solo sirve para demostraciones ligadas a dispositivos comercializados por la industria. Así pues nuestra orientación para elegir lo que queríamos hacer y cómo, se debe a la información científica que encontramos sobre modelos experimentales y la experiencia de parte del grupo en el mismo modelo en otras áreas de investigación, todo ello fuertemente condicionado a nuestras restricciones económicas.

En los primeros momentos mientras una parte del equipo estaba desarrollando el trabajo sobre el tejido que se iba a implantar, otra se centró en las posibilidades de llevar a cabo el implante con éxito. Se crearon todos los protocolos necesarios (estabulación, anestesia y sedación, monitorización, CEC, anticoagulación, analgesia, profilaxis antibiótica, etc), y por parte de la Facultad de Veterinaria se llevó a cabo un estudio prospectivo en calidad de sedación, de inducción y mantenimiento anestésico y por último un estudio de calidad de analgesia, todos ellos englobados en un trabajo fin de Master ya publicado¹⁰⁸.

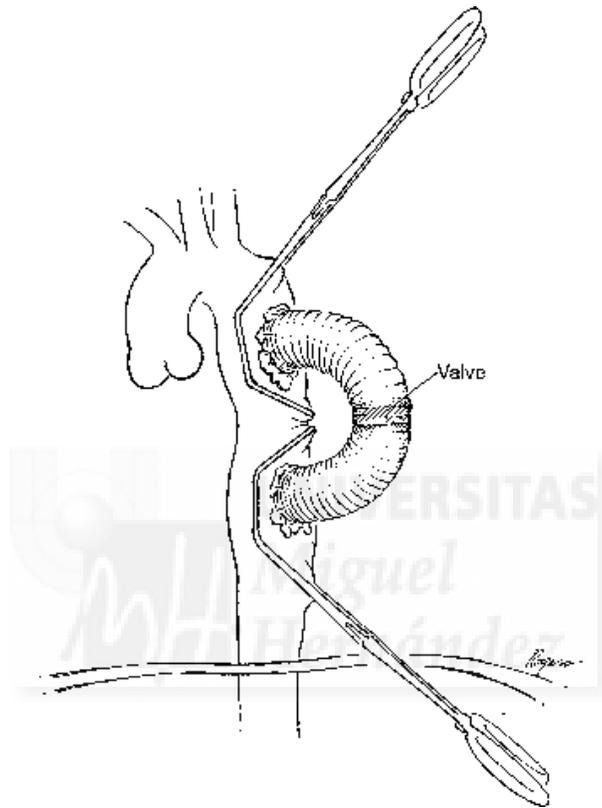
Algunas de las dificultades iniciales fueron:

- Aunque el modelo estaba descrito era poco empleado y por lo tanto poco comparable con los resultados obtenidos por otros grupos.
- La variabilidad anatómica en el tracto de salida del VD y válvula pulmonar no es mucha, pero si existen algunas variantes que en ocasiones han dificultado la vía de abordaje o la canulación. Hay que tener en cuenta que todo el instrumental y fungible del que dispusimos procedía de clínica humana, y está diseñado para ese fin.
- El acceso por la vía clásica (la esternotomía media) es complicado ya que son animales en los que su mayor dimensión es antero posterior siendo muy estrechos en sentido coronal.
- Los grupos sanguíneos ovinos no están bien estudiados. En nuestro trabajo hemos estudiado fenómenos de histocompatibilidad, por lo que no nos ha parecido oportuno exponer los animales de estudio a posibles reacciones de sensibilización por contacto con sangre de animales de su misma especie.
- Al necesitar periodos de estudio tan largos, pequeñas complicaciones que pasarían por meras incomodidades, como una pequeña cojera, nos han obligado al sacrificio de animales antes de completar el estudio, por lo que el cuidado en cada una de las fases del ensayo ha tenido que ser exquisito.
- Para mantener la estabulación inicial, y que desarrollen lo antes posible su comportamiento gregario (importantísimo para su supervivencia a medio e incluso

a corto plazo) hay que agruparlas cuanto antes, con el riesgo de daño de unos a otros al ser pronto identificados como animales más débiles.

- Es prácticamente imposible mantenerlas con algo que no reconozcan como suyo sin que se lo intenten arrancar o comer, no solo ellas sino también sus congéneres (suturas, drenajes, parches con medicación, apósitos, etc.)
- Su carácter gregario hace que sea necesario agruparlos precozmente con riesgo de daño de unos a otros identificados por ellos mismos como animales frágiles.

En el primer caso solo se abordó la aorta torácica siguiendo un modelo tipo Hufnagel ya descrito previamente¹⁰¹, poco empleado para cirugía abierta, pero cada vez más útil en ensayos de dispositivos valvulares aórticos¹⁰⁹⁻¹¹¹. El modelo consiste en crear una insuficiencia aórtica iatrogénica y colocar un homoinjerto criopreservado estándar, en la aorta torácica descendente mediante una toracotomía media izquierda por 4º espacio intercostal. Se suturaba la válvula mediante el clampaje lateral de la aorta y prolongando la porción distal del sustituto valvular con un injerto de dacron isodiametral con respecto al tronco de la pulmonar, se coartó el vaso nativo entre ambas anastomosis mediante una cinta de cordón umbilical para obligar a derivar la totalidad del flujo de la aorta torácica descendente por el homoinjerto.



Esquema 6: Esquema de la implantación de una válvula mecánica interpuesta en un injerto de dacron en la aorta torácica descendente con clampaje lateral.

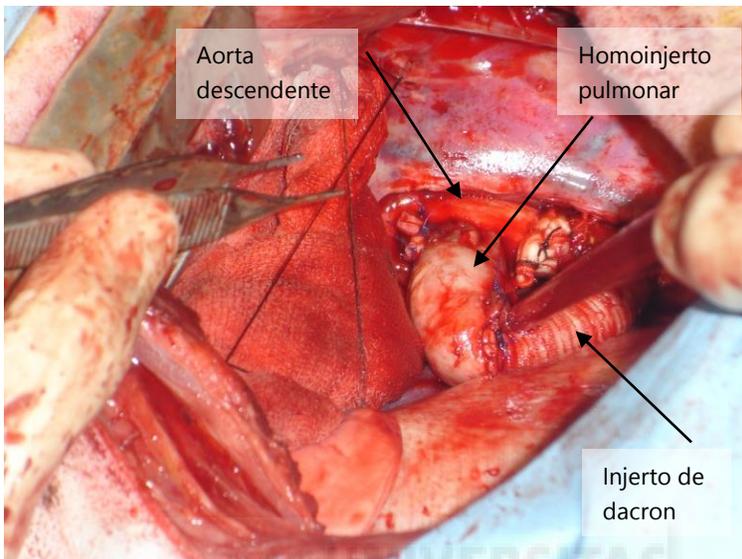


Figura 34: Homoinjerto pulmonar implantado en la aorta torácica descendente de la oveja prolongado con un injerto de dacron.

A los dos meses del implante se eutanasió el animal y se tomaron muestras del tejido implantado, tras su análisis se observaron zonas de trombosis parcial, colecciones compatibles con pseudoaneurisma parcialmente trombosado, y en general una reacción fibrosa muy exuberante. Los hallazgos fueron difíciles de interpretar fisiopatológica, por lo que a la vista del el fracaso cosechado, se cambió al modelo ortotópico (Sustituto valvular pulmonar en posición pulmonar).

Al cambiar el tipo de implantación surgieron nuevas complicaciones, algunas relacionadas con la selección de los animales: por ejemplo el tamaño era un factor poco importante inicialmente, por lo que se escogieron de poco porte para simplificar su manejo. Al tener que asistir a los

animales con circulación extracorpórea era preferible emplear animales más grandes y por tanto con más volemia. Los animales más grandes también fueron los que tardaron más tiempo en despertarse y mantenerse de pie, con tendencia a golpearse y ser admitidos por su grupo como débiles. Los animales gregarios tienden a aislar a los individuos enfermos, pisándolos, golpeándolos o dificultándoles el acceso a la comida y al agua lo que compromete su supervivencia. Comparando los pros y contras decidimos escoger a animales en torno a los 50 Kg, suficientemente grandes para no hemodiluirlos demasiado y suficientemente pequeños para que pudiesen rehabilitarse con rapidez.

Durante el procesamiento de los tejidos previos a su implantación, encontramos con bastante frecuencia filarias en el árbol arterial pulmonar y lesiones valvulares derivadas de su infestación. Este tipo de zoonosis no supone un riesgo en el consumo de su carne, pero en nuestro caso si lo que se pretende estudiar son valvulopatías derechas pueden producir lesiones e interferir los resultados. El porcentaje de animales infestados varía según las explotaciones ganaderas, varía entre el 30 y el 80% de la cabaña, siendo más común en animales de mayor edad, tampoco es infrecuente encontrar animales infestados por más de una especie. En nuestra experiencia fue frecuente encontrar parásitos o formas larvianas en los animales donantes, por lo que fue necesario desechar muchas muestras. La selección fue más exhaustiva en los animales receptores, donde no se encontró ningún parásito en la válvula pulmonar. A pesar

del cuidado puesto, a los 6 meses de la intervención, en la necropsia se encontraron en las muestras analizadas de la válvula aórtica formas larvianas del parásito, sin embargo en ninguna muestra de las válvulas donantes, ni en las válvulas pulmonares explantadas una vez terminado el estudio se encontraron vestigios de infestación o lesiones valvulares no justificables por los fenómenos que se estudiaban.

El modelo necesario era un modelo pulmonar, por lo que nos decidimos una vez revisada la bibliografía y varias visitas al matadero y sala de despique del matadero de La Pola de Gordón, realizar el abordaje por toracotomía lateral izquierda por 4º Ell. Este acceso permite el abordaje cómodo a la arteria pulmonar y a la aorta torácica descendente y un acceso más complicado a la aurícula derecha, zona de canulación venosa.

Inicialmente se elaboró un protocolo de cardioplegia se desestimó por la dificultad para acceder a la aorta ascendente y clamparla e infundir la solución. El abordaje por toracotomía izquierda es incómodo para hacer el clampaje aórtico, así que intentamos el animal 0 realizarlo sin isquemia. La técnica presenta algunas incomodidades, el campo nunca está ni exangüe ni inmóvil, pero la intervención se llevó a cabo con éxito sin prolongar mucho los tiempos de cirugía ni de circulación extracorpórea.

Aunque el modelo estaba ya publicada por algunos grupos investigadores^{100,102,103}, su descripción era muy somera en los detalles técnicos necesarios para ponerlo en funcionamiento, en particular los relacionados con el

manejo anestésico y quirúrgicos. Tampoco había acceso a otros grupos en nuestro entorno de los que aprender, por lo que estudiamos detenidamente la anatomía torácica y vascular del animal y nos servimos de otros modelos cercanos con el mismo perfil anatómico también en rumiantes.¹¹²

Para el establecimiento de la circulación extracorpórea usamos canulación central insertando las cánulas en la orejuela de la aurícula derecha luxando los grandes vasos hacia abajo y en la aorta torácica descendente. Se empleó una cánula de cava única tipo atriocava que dejaba un campo cómodo. La situación de la cava inferior en la oveja es muy superior, lo que hizo difícil la colocación en algunos casos. Cuando no se pudo colocar y se optó por una cánula simple, la cirugía transcurrió con continuos problemas de drenaje y entrada de aire en el circuito venoso. Posiblemente este fuese el aspecto que condicionó más el devenir de la cirugía, cuando se conseguía buen drenaje los tiempos se acortaron sensiblemente.

Ante la exigencia impuesta de no usar hemoderivados, elaboramos una estrategia similar a las empleadas en los programas de ahorro de sangre de centros hospitalarios¹¹³:

- Tiempos quirúrgicos y con CEC cortos, que no excediesen de los 50 minutos.
- Volúmenes de cebado pequeños manteniendo el reservorio venoso por debajo del límite inferior de su capacidad.

- Circuitos mini. Se retiró el filtro arterial y se acortaron las tubuladuras para eliminar el secuestro en este espacio muerto, también se redujeron a 3/8 de pulgada los diámetros de las líneas venosas.
- Hemostasia rigurosa y reinfusión del 100% del volumen residual del circuito de la bomba mediante una bolsa satélite por vía periférica.

Tras el éxito del animal 0 debido a la endocarditis fúngica, se revisó la bibliografía y se consultó al Servicio de Medicina preventiva del Hospital de León. Las medidas necesarias para reducir la posibilidad de endocarditis fúngica, hacen referencia a purificar la calidad de la atmósfera dentro del quirófano. Nuestra posibilidad de mejorar el número de recambios aéreos y la interposición de filtros era nula, por lo que tomamos las siguientes medidas:

- El día previo a la intervención realizamos un ciclo de desinfección con la nebulización de un antiséptico manteniendo todo el material fungible a emplear en el procedimiento.
- Limitamos la circulación de personal dentro del quirófano durante el procedimiento.
- Se extremaron las medidas de asepsia y antisepsia durante el procedimiento.
- Añadimos a la solución de transporte del homoinjerto anfotericina B (20 µg/ml) y se limitó la manipulación del material valvular fuera de la solución a justo el

momento del implante (previamente se tallaba antes de entrar en circulación extracorpórea).

- Se adelantó la realización de la RMN cardiaca al mes del procedimiento, ya que mantener estabulados animales con infección activa por hongos desperdiciaba recursos y retrasaba nuevos cambios para evitar dichas infecciones.

En las exploraciones con RMN cardiaca realizadas en los dos siguientes animales al mes del implante fueron negativas para signos de infección, por lo que se continuó con las mismas medidas adoptadas y se retrasó de nuevo la prueba de imagen al momento en el que estaba previsto hacerse (antes de la necropsia a los 6 meses).

1.1. DISCUSIÓN DE LOS PARAMETROS ANALIZADOS EN EL MODELO EXPERIMENTAL

Durante las series semanales de intervenciones se monitorizó la calidad en el protocolo de manejo perioperatorio. Con vistas a depurar el protocolo completo de la cirugía se fueron analizaron todas las variables monitorizadas, así como el resultado final, medido no solo en términos de mortalidad, sino también como calidad del procedimiento: tiempos empleados, evolución analítica (sobre todo la hemoglobina final) y calidad de la recuperación.

1.1.1 Variables hemodinámicas.

Comparando las presiones arteriales medias en nuestra serie durante el procedimiento quirúrgico, se observó una

caída leve de la tensión arterial durante el periodo de CEC, que fue más acusada justo en el momento de la entrada. El fenómeno había ya sido descrito por otros autores¹⁰³, en la serie publicada por Schauvliege en 2006 la hipotensión supuso un problema mayor, si bien es cierto que el soporte empleado para la cirugía fue una asistencia ventricular derecha sin necesidad de oxigenador.

Las asistencias derechas únicas no son empleados en humanos, salvo en el hipotético caso de asistencia monoventricular por disfunciónVD pura, en cualquier caso no son útiles en cirugías aisladas sobre cavidades derechas por el siguiente motivo:

La forma en semiluna del ventrículo derecho permite su adaptación a los cambios de volemia, incluso súbitos, ya que cambios pequeños en la longitud de sus fibras se traducen en grandes cambios de volumen ventricular. El retorno venoso varía dependiendo de la actividad que realizamos y la aurícula y el ventrículo derecho actúan como cámaras de capacitancia, que transforman el flujo discontinuo en constante hacia una cámara que tolera mal los cambios de volumen, el ventrículo izquierdo. Si sustituimos el ventrículo derecho por una bomba centrífuga sin reservorio, el sistema es inflexible a los cambios de volumen y produce fluctuaciones en el gasto derecho, que se trasladan inmediatamente al lado izquierdo. Con nuestra monitorización veríamos oscilaciones de la tensión arterial constantemente y de difícil manejo salvo aumentando mucho la presión venosa central a costa de volemia. Este es el motivo por el que no

se emplean para procedimientos sobre la válvula pulmonar asistencias derechas, prefiriendo circulaciones completas intercalando un oxigenador. En la práctica incluso las disfunciones ventriculares derechas reversibles tras endarterectomías pulmonares, se tratan mediante la colocación de una ECMO (asistencia biventricular y respiratoria simultánea).

Otra de las posibles causas que justifica la baja incidencia de episodios hipotensivos observados fue por el uso de sevoflurano en vez de isoflurano (el anestésico inhalatorio más usado en anestesia veterinaria). Se ha demostrado en otros modelos animales cardiacos, que el empleo de sevoflurano para el mantenimiento de la anestesia en vez del Isoflurano, induce menos hipotensión, arritmias ventriculares y finalmente mortalidad¹¹⁴.

Dos de nuestros animales presentaron hipotensión marcada a la entrada en CEC. El "fenómeno de primer paso", ampliamente conocido en clínica humana, es debido en parte a que el fluido de cebado del circuito de extracorpórea está constituido por fluidos de reposición sin cuerpos formes. Cuando comienza la perfusión, el líquido desplaza en bolo la sangre, provocando una hemodilución súbita casi completa, hasta que tras unos ciclos la volemia se hace más uniforme. Al sustituir la sangre por otro fluido disminuye la resistencia vascular periférica, la viscosidad sanguínea y la concentración de catecolaminas circulantes, lo que ocasiona hipotensión.

El otro momento en el que las presiones medias bajaron significativamente fue al salir de CEC. En nuestra serie ocho animales requirieron vasoconstrictores en bolo para su corrección. La caída media respecto al valor basal fue de un 13,18 %. Este fenómeno está descrito en la serie de Schauvliege, y se observa en la práctica clínica humana cotidianamente. Su causa no es otra que la transición entre un sistema de circulación externo y el propio, en menos de un minuto los ventrículos, que casi siempre han salido de un periodo de isquemia, deben ser capaces de mantener un gasto cardiaco fisiológico.

En cualquier caso, tanto la severidad de la hipotensión, como la necesidad de soporte inotrópico fueron menores en nuestro estudio respecto a los descritos anteriormente¹¹⁵. Únicamente se empleó como terapia adrenérgica fenilefrina, a dosis de 4 µg/kg en bolos de 2 ml (100 µg/ml), recuperándose las presiones arteriales de forma satisfactoria en todos los casos. En ningún caso fue necesario soporte inotrópico o vasoconstrictor en perfusión continua, que en las series comparadas en las que fue necesario entre un 25 y un 30 % de las ocasiones.

Otro efecto hemodinámico observado en más de la mitad de los casos, fue un incremento puntual de la presión arterial y la FC al inicio del procedimiento quirúrgico. Este comportamiento se describe ya en otros ensayos, en los que se corrige con betabloqueantes¹⁰³. En nuestro caso se consideró más adecuado aumentar el grado de analgesia con un bolo de fentanilo seguido del aumento de la dosis

en perfusión. En todos los casos los animales respondieron satisfactoriamente.

1.1.2 Complicaciones respiratorias.

Las complicaciones más graves durante la cirugía fueron respiratorias. Estuvieron causadas por varios factores, algunos relacionados con la CEC, y otros por características propias de la especie.

Los efectos de la CEC sobre el pulmón como órgano diana (pulmón de perfusión) son muy conocidos, sus complicaciones aparecen mayoritariamente durante el postoperatorio inmediato ¹¹⁶, sin embargo en la literatura relacionada con el modelo ni tan siquiera se nombran.

Como características particulares del animal empleado, destacan la rapidez para acumular secreciones, que requirieron aspiraciones frecuentes del árbol traqueobronquial, y la facilidad para formar atelectasias tras la compresión del parénquima. Ya sea por compresión extrínseca o por bloqueo del árbol bronquial resultaron difíciles de expandir con maniobras de reclutamiento. Paradójicamente al aspecto del parénquima, las saturaciones periféricas de oxígeno pre, intra y postoperatorias no se alteraron, de hecho, no hubo diferencias significativas entre ellas, particularmente entre la preoperatoria y la post CEC, momento en el que el parénquima estaba más colapsado y comenzaba el reclutamiento tras estar el pulmón sin ciclar durante más de 20 minutos.

Un éxitus a las 24 horas del procedimiento se produjo como consecuencia de insuficiencia respiratoria, en las pruebas complementarias que se hicieron así como en el estudio postmortem se observaron compatibles con un distrés respiratorio. No se pudieron demostrar alteraciones ni sobre el ventrículo derecho, ni sobre la válvula pulmonar recién implantada que justificasen el cuadro. Aunque no impresiona el diagnóstico (hay enfermos que desarrollan cuadros similares exclusivamente por la CEC), si lo hace por la velocidad de instauración del cuadro y la extensión de las lesiones pulmonares en un animal que no guardaba memoria inmune frente a la CEC.

1.1.3 Parámetros analíticos.

El único que mostró diferencias significativas durante todo el procedimiento fue la concentración plasmática de potasio. No se encontraron alteraciones clínicas por esta causa, lo que concuerda con otros trabajos^{103,115}, en algunas series se corrigió el defecto infundiendo una solución suplementaria de potasio. Basándonos en el conocimiento de que son animales que manejan una concentración fisiológica de potasio muy variable (desde 3.5 a 7 mEq/l) con excelente tolerancia, en nuestro caso no se corrigió nunca el déficit, sin que se apreciaran efectos clínicos deletéreos.

1.1.4 Estudio de la mortalidad.

En el grupo de estudio fue del 30,7%, significativamente alta. Es difícil comparar nuestros resultados con los comunicados oficialmente por otros autores. En

publicaciones veterinarias se considera mortalidad quirúrgica (o a veces denominada anestésica) aquella que acontece en el quirófano, en humanos por el contrario es la mortalidad conjunta hasta los 30 días de postoperatorio o durante el mismo ingreso hospitalario. La mortalidad publicada del modelo experimental en los artículos de revistas veterinarias hace mención solo a la mortalidad dentro del quirófano. Con esta consideración, nuestra mortalidad (anestésica o quirúrgica) fue del 7,6%, lo que se encuentra en la zona baja del rango de las publicaciones ^{100,102-104,115}. Sin embargo creo que el criterio que más se ajusta a la calidad debe ser el de la mortalidad de la serie completa hasta el final del estudio, que en nuestro caso debería haber sido más baja.

Revisando las series publicadas de sustitutos valvulares en modelos experimentales, en ninguna se cita la mortalidad a lo largo del estudio ¹¹⁷⁻¹²¹, es posible que no hubiese decesos entre los animales intervenidos, pero es difícil creer que en 6 meses o más, ninguna serie haya notificado ninguna muerte. Al fin y al cabo no son ensayos clínicos que estudien durabilidad o eventos relacionados con los sustitutos empleados, se centran en el estudio de las piezas implantadas.

En cualquiera caso considerando la escasa experiencia inicial del grupo, la ausencia de modelos cercanos a imitar y la complejidad del procedimiento considero que la mortalidad es razonablemente baja, aunque es mejorable.

La mayor parte de los éxitos (3), se produjeron en la última tanda de procedimientos. Para disminuir el efecto de la

curva de aprendizaje y reducir la posibilidad de perder muchos animales seguidos, se agruparon los animales en semanas, realizando 1 caso cada día durante 1 semana (5 casos en 1 semana), y si el estado de los animales a los 3 meses era adecuado acometíamos una nueva semana. Esto nos permitió hacer una evolución a saltos y además redujo el riesgo económico. Antes y después de cada semana de trabajo se analizaban los resultados obtenidos y se diseñaban los cambios o mejoras en los protocolos. Trabajar así mantuvo la exigencia en el grupo, evitando la desidia y el relax que supone hacer procedimientos con una cadencia lenta y uniforme.

2.- DISCUSION DEL SUSTITUTO VALVULAR

La utilización de homoinjertos como sustitutos valvulares ha estado y está extendido por todo el mundo.

Las indicaciones en las que más se ha empleado este sustituto son:

1. Corrección de cardiopatías congénitas, como el Fallot, bien en edad pediátrica o de adultos para prevenir el efecto a largo plazo de la insuficiencia pulmonar.
2. Endocarditis con gran destrucción tisular sobre el anillo, fundamentalmente en casos de endocarditis sobre prótesis aórticas implantadas previamente²².
3. Operación de Ross: Su redescubrimiento universalizó su empleo en posición pulmonar en adultos jóvenes arrebatando parte del segmento que antes pertenecía a las prótesis mecánicas. Años más tarde con la

publicación de los resultados obtenidos en la población adulta, y la experiencia individual de cada grupo al tener que reintervenir pacientes tan complejos hizo decrecer su uso. Hoy en día es una de las pocas indicaciones contempladas en las guías de práctica clínica^{22,122}.

Gran parte de la información que tenemos hoy en día acerca de la degeneración primaria de los homoinjertos valvulares se ha obtenido de las series de operación de Ross^{34,35,41-44,123}. ¿Por qué es esto? En la operación de Ross el homoinjerto pulmonar sustituye anatómicamente a un tejido normofuncionante, su implante es sencillo, y el resultado anatómico y funcional final es muy parecido al de un individuo sano. Casi siempre los enfermos no presentan alteraciones en la circulación pulmonar y sus presiones son fisiológicas. En resumen son las condiciones ideales en las que un sustituto valvular pueda funcionar, y su disfunción debería obedecer solo a factores relacionados con las características del material implantado y su interacción con el huésped.

Si nos atenemos a los resultados de las series largas y clásicas de intervenciones de Ross podemos decir que la libertad de reintervención por disfunción del homoinjerto pulmonar es bastante baja. Solo un porcentaje pequeño de enfermos desarrollan disfunción del mismo de forma precoz, es decir antes de los 3 años de la intervención^{34,35,41-44}.

El desarrollo de disfunción del homoinjerto puede estar producido por dos mecanismos básicos:

- El desarrollo de respuesta inmune del huésped.
- Deterioro de las propiedades mecánicas del homoinjerto por el déficit de capacidad de reparación de los componentes de la matriz.

La responsable de generar los dos mecanismos es la misma, la célula intersticial, que posee capacidad antigénica capaz de generar rechazo y es la responsable de la reposición de las fibras, GAG y demás componentes de la matriz.

Es lógico pensar, que tras el implante de un homoinjerto criopreservado de cadáver no tratado, los fenómenos de rechazo y reparación natural de la matriz coexisten en mayor o menor grado. Dependiendo de los factores relacionados con el huésped prevalecerá una forma y grado de disfunción.

Siendo esquemático, disfunciones muy precoces en términos de ruptura suelen estar ocasionados por deterioro de las propiedades mecánicas del homoinjerto en su procesamiento^{38,47,48}. La degeneración en forma de estenosis del cuerpo del homoinjerto en menos de dos años tiende a ser ocasionada mayoritariamente por fenómenos de rechazo tisular. Por último degeneraciones más tardías caracterizadas por gran calcificación están relacionadas con la suma de los dos mecanismos biológicos de disfunción^{28,39,50,51,124-127}.

No existe aún un conocimiento exacto, de qué tipo de respuesta inmune es la responsable en la degeneración que presentan los homoinjertos, pero parece demostrado

que el homoinjerto más duradero es el que mejor estructura celular posee en su interior.

Algunos investigadores como Dignan et al, experimentando inicialmente sobre un modelo ovino y posteriormente en estudios observacionales sobre una muestra humana, analiza la respuesta humoral titulando las concentraciones de anticuerpos anti HLA tipo I, músculo liso y sobre todo HLA tipo II ¹²⁸ desarrollados tras el implante de un homoinjerto; las respuesta observada siempre es positiva, y en general homogénea en cuanto a su concentración.

Hemos analizado si los resultados obtenidos difieren comparando pacientes intervenidos por primera vez, de aquellos en los que previamente ya se había implantado un homoinjerto. A priori la respuesta debería ser más intensa en el grupo de los enfermos reintervenidos, sin embargo en poco tiempo parece que la titulación de anticuerpos se vuelve uniforme ^{79,117,129-132}. Estas investigaciones, no han sido capaces de explicar por qué algunos individuos desarrollan disfunción precoz del homoinjerto y al ser reintervenidos en sucesivas ocasiones, la degeneración aparece cada vez con más rapidez.

Para algunos autores la respuesta humoral detectada es menor empleando homoinjertos descelularizados frente a los criopreservados tradicionales. Esta respuesta atenuada se ha descrito tanto en clínica humana como en modelos animales ^{131,133}. Por el momento y con la tecnología en descelularización de la que disponemos parece que la respuesta en mayor o menor grado está siempre presente,

y por lo tanto no queda claro si la ventaja teórica se va a traducir en mejora de durabilidad.

En nuestra opinión, si ésta sola fuese la causa de degeneración de los homoinjertos, su deterioro debería ser un fenómeno previsible, constante y relativamente rápido, sobre todo en la población pediátrica, donde los fenómenos de rechazo humoral se establecen rápidamente. En la práctica el fenómeno no siempre es igual en intensidad y duración, por lo que deben existir otros fenómenos implicados. No obstante lo incuestionable, a la vista de los resultados publicados, es que existe inmunización incluso en aquellos tratados con homoinjertos descelularizados y por lo tanto, debe existir deterioro atribuible a este fenómeno.

Otros autores han analizado la respuesta inmune celular tras el implante de un homoinjerto ^{134,135}, unos estudiaron la concentración de linfocitos T helper en bazo y en sangre periférica en ratas tras el implante de un homoinjerto, otros extrajeron y cultivaron poblaciones celulares de muestras de homoinjertos degenerados explantados, en todos ellos encontraron una población predominante de linfocitos T citotóxicos frente a antígenos del donante. Los resultados obtenidos con ambos experimentos confirman la importancia de la respuesta celular en el deterioro estructural de los homoinjertos.

En este momento es interesante recordar el estudio realizado por Wilhelmi ¹³⁶, en el que comparó raíces valvulares explantados de pacientes previamente trasplantados cardiacos, con los hallazgos

correspondientes a homoinjertos implantados degenerados. Recordamos que mientras los homoinjertos presentaban fenómenos degenerativos típicos, las raíces aórticas y pulmonares de los enfermos trasplantados no presentaban ningún tipo de deterioro. Recordamos que se atribuyó la ausencia de dicho deterioro exclusivamente al tratamiento inmunosupresor que tomaban los pacientes trasplantados. Pues bien la combinación de fármacos que tomaban los pacientes no era efectiva contra la respuesta celular, exclusivamente lo es contra la respuesta humoral, lo que introduce una incógnita más en nuestro razonamiento.

De acuerdo con la información obtenida de forma experimental, aunque no sepamos con exactitud cuál es el modo de rechazo predominante, está claro que de uno u otro modo todos los enfermos a los que implantamos un homoinjerto deberían presentar deterioro estructural. Cuando los homoinjertos se implantan en posición aórtica es un fenómeno constante ^{36,137,138}, sin embargo ¿Por qué en la cirugía de Ross existe tan poca morbilidad asociada al uso de homoinjertos pulmonares según los registros actuales?

- ¿Es porque las valvulopatías pulmonares, son tan bien toleradas, que pueden pasar años hasta apreciar cambios en la evolución clínica de los enfermos?
- ¿Es porque la mayor parte de la población, aunque desarrolle rechazo no termina de desarrollar disfunción del homoinjerto?

- ¿Serían necesarios seguimientos por encima de los 10 años para observar degeneraciones valvulares pulmonares?
- ¿Tiene importancia la edad de la intervención en el desarrollo de degeneración del homoinjerto?

Son preguntas difíciles de responder hoy, lo que parece claro es que los enfermos con esta corrección no siguen la misma evolución que los homoinjertos implantados en posición sistémica en adultos.

Sin poner en entredicho la veracidad de los registros a largo plazo de la Operación de Ross^{34-36,41,43-45,123,136,139}, y sus buenos resultados, en la mayoría de los enfermos, podríamos considerar que los homoinjertos implantados no han generado una respuesta inmune lo suficientemente agresiva como para sustituir elementos de la matriz por tejido fibroso. Además es inevitable pensar que si muchos homoinjertos siguen funcionando bien 10 años después de su implante debe haber una población celular realizando su función: O bien el tejido celular donante implantado ha sido capaz de mantener la matriz extracelular siguiendo su ciclo natural, o bien este componente celular ha sido sustituido por células procedentes del receptor con la misma capacidad. Desgraciadamente no hay ningún trabajo que haya sido capaz de categorizar genéticamente la estirpe celular de los homoinjertos explantados a largo plazo e identificarlos como procedentes del receptor o del donante.

En la práctica clínica es difícil aceptar esta situación ideal de libertad absoluta de disfunción a largo plazo por distintas evidencias:

1. La respuesta inmune, al menos humoral, generada por los antígenos de superficie HLA es bastante uniforme en nuestra especie, y de hecho la generación de anticuerpos anti HLA postimplante estudiada se ha mostrado constante. Es por ello razonable pensar que existen más factores del donante o del receptor, aún poco conocidos que determine la agresividad de la respuesta y/o la disfunción en el tejido implantado.
2. En la práctica clínica en los grupos que han implantado y seguido pacientes con homoinjertos en posición pulmonar, es frecuente encontrar calcio a nivel del homoinjerto o cambios anatómicos que no siempre generan disfunción valvular.
3. En la literatura, en los estudios llevados a cabo con muestras de homoinjertos explantados, no queda claro que queden células viables y funcionales procedentes del donante o del receptor, pero lo que parece claro es que una matriz valvular acelular no fijada terminará por degenerar en el futuro.

Una cuestión que parece interesante es plantearnos si los resultados de las series clásicas de operación de Ross son tan buenos y distintos a otras series de adultos porque la mayor parte de los casos incluidos en la serie inicial corresponden a población pediátrica. Como planteamos antes: ¿La madurez del sistema inmune a la edad del implante juega algún papel en el proceso?.

Otro fenómeno seguramente relacionado con la respuesta inmune de los receptores, es que algunos pacientes tras el implante de un homoinjerto y su posterior degeneración, al ser reintervenidos de forma sucesiva desarrollan degeneración con más rapidez. Dirigido inicialmente al tratamiento de estos enfermos, una empresa especializada en el procesamiento de tejidos biológicos (es el principal banco mundial de homoinjertos valvulares privado del mundo), experimentó con un proceso de eliminación del componente celular de los tejidos sin dañar la matriz (descelularización), siendo en la actualidad el único fabricante que ha obtenido la marca FDA para la comercialización de válvulas descelularizadas en EEUU. Los resultados obtenidos hasta el momento con estos injertos, conocidos como SynerGraft©, no dejan claro si modifican las ventajas e inconvenientes de los homoinjertos tradicionales celularizados ^{81-86,140,141}, pero parece que esta línea de investigación es acertada para enfermos con este perfil clínico. Si los resultados obtenidos con este producto o similares ^{30,77,79,80,86,105,117-121,131,139,142-149} responden a las expectativas, modificaran con seguridad los algoritmos de elección de sustitutos valvulares.

2.1. PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN PROPIO

En la actualidad, la investigación en cultivos celulares va paralela al desarrollo de matrices sobre las que desarrollar dichos cultivos in vitro. Las líneas desarrolladas varían mucho, pero se dividen en grandes rasgos en cuatro:

- Matrices sintéticas: Formadas por materiales biodegradables, como el ácido poliláctico y poliglicólico,

presentan variedad en su diseño ya que son fáciles de manipular (se puede controlar incluso el tamaño de poro) y suponen un suministro ilimitado⁹⁴.

- Matrices biológicas: Formadas por tejidos o moléculas biocompatibles, como la submucosa intestinal (comercializada ya para su implante como parche en cirugía valvular mitral), o la fibrina procedente del propio paciente o el colágeno. Forman matrices muy permeables al oxígeno y a los nutrientes¹⁵⁰.
- Matrices autólogas: Se sintetizan a partir de células del propio paciente, se cultivan láminas de células en placas específicas que permiten generar capas plegables¹⁵¹.
- Otras matrices, son híbridas entre diferentes tipos de matrices sintéticas y biológicas. Destacan en la actualidad el desarrollo en las técnicas de producción, como la impresión en 3D o el electrospinning¹⁵².

En nuestro caso hemos obtenido matrices biológicas de raíces pulmonares de individuos de la misma especie. Es, por número de publicaciones, la técnica predominante por su facilidad para obtener estructuras anatómicamente similares a las originales que hay que sustituir. Para su producción se emplean los protocolos de descelularización.

Los resultados obtenidos hasta hoy en los implantes de matrices biológicas o válvulas descelularizadas han sido dispares, tanto a nivel experimental como en uso clínico

54,79-82,143,153. Posiblemente dicha disparidad está justificada no solo por los diferentes procesos empleados para su obtención, sino también por la metodología del análisis.

Desde la publicación de Bader en 1998⁶, la válvula cardiaca ha constituido el tejido de referencia en la descelularización de tejidos debido a su complejidad estructural. En nuestro caso, para sistematizar los resultados decidimos estudiar, desde las primeras fases de la investigación, las válvulas dividiéndolas en sus tres porciones histológicamente bien diferenciadas, el faldón muscular, la pared arterial y el velo valvular. Cada porción está histológicamente adaptada a las diferentes condiciones hemodinámicas que tiene que soportar, y al ser diferentes, lo lógico es que respondan de forma distinta a los procesos de citolisis a los que las sometemos. Otro argumento para su análisis por separado, es que los procesos de degeneración de los homoinjertos afectan de forma desigual a los distintos componentes, así los fenómenos degenerativos afectan en mayor medida al faldón muscular y la pared arterial, ocasionando una reacción fibrosa y más tarde calcificada con aumento paulatino de los gradientes a su través. No es frecuente encontrar alteraciones en los velos que generen insuficiencia valvular.

Nuestra idea inicial fue emplear métodos de descelularización que no empleasen detergentes, con el fin de evitar su daño directo a la matriz y la toxicidad de los restos sobre la población celular que pueda quedar en contacto con la matriz implantada.

El protocolo que seguimos para la caracterización de la matriz que implantamos determinó la ausencia de viabilidad prácticamente completa, por lo que la celularidad hallada en las muestras explantadas a los 6 meses sólo puede proceder del receptor. También los resultados de caracterización bioquímica y de resistencia mecánica hacían presumir que tras el implante de los homoinjertos descelularizados su comportamiento mecánico y hemodinámico iba a ser bueno, pero todos los resultados tenían que ser evaluados en un modelo experimental.

3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EN LAS MUESTRAS EXPLANTADAS

En muchos aspectos, los resultados han sido concordantes con los esperados de acuerdo con los ensayos y estudios que se hicieron sobre los protocolos de descelularización.

No encontramos indicios de que el sustituto valvular implantado difiriera en sus propiedades mecánicas de las de un homoinjerto normal o una raíz pulmonar nativa, al menos durante el periodo de seguimiento.

Era poco probable que hubiésemos encontrado fallos precoces relacionados con ruptura del homoinjerto o dilatación aneurismática a los 6 meses de su implante. No obstante un animal falleció a las 48 horas de la intervención como consecuencia de un shock hemorrágico. En la necropsia se evidencia de una disrupción en la anastomosis distal de la arteria pulmonar. A raíz de este caso se

chequearon minuciosamente la calidad de las anastomosis realizadas pues la hemorragia pudo ser debida a un error técnico. En el estudio macroscópico de la necropsia de los animales a los 6 meses se revisaron las zonas de las anastomosis, sin encontrar presencia de pseudoaneurismas o dilataciones anormales en la raíz pulmonar. Por otra parte parece que en los pocos casos descritos en la literatura de rupturas bruscas o dilatación de los homoinjertos, estas son más frecuentes en la zona de los senos de Valsalva o Morgani , donde los homoinjertos son más finos y su diámetro mayor.

Durante el seguimiento a todos los animales se les realizó una RMN de control, cuyos resultados aún siguen siendo analizados, pero avanzando los datos no se produjeron aumentos de los diámetros pulmonares respecto a las medidas tomadas in vitro antes de su implante. Tampoco se observó disfunción valvular significativa, aunque fue frecuente encontrar insuficiencia pulmonar trivial que posiblemente tuviese relación con la técnica quirúrgica y que no tiene significación patológica.

Los resultados son interesantes y prometedores, puesto que como antes mencionamos, las raíces valvulares ovinas son peores en términos biomecánicos que las porcinas. Revisando estudios similares parece que el periodo de 6 meses es tiempo lo suficientemente largo como para detectar defectos biomecánicos graves en la matriz debidos al proceso de descelularización.^{30,77,79,80,86,105,117-121,131,139,142-149}

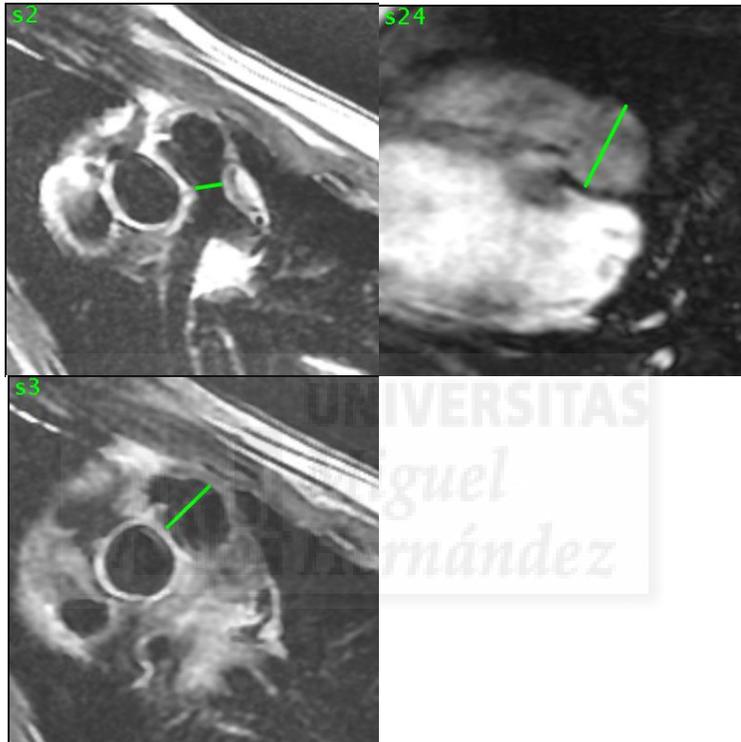


Figura 35. Secuencia obtenida por RMNC de un Homoinjerto tratado en posición pulmonar. La secuencia s2 y 3 han sido obtenidas en un T1 BB, la S24 ha sido tomada tras la administración de gadolinio en una partición volumétrica 3D de un estudio angiográfico. Las longitudes marcadas en verde corresponden a en la imagen superior izquierda al diámetro de la arteria pulmonar principal (8.1 mm), en la superior derecha a nivel del anillo o zona de sutura inferior, y la inferior al diámetro a nivel de los senos de Valsalva (26 mm).

3.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE MICROSCOPIA ÓPTICA:

3.1.1. Análisis de la celularidad

En la totalidad de los estudios prospectivos publicados analizan la celularidad hallada de los homoinjertos explantados únicamente en los velos^{30,77,79,80,86,105,117-121,131,139,142-149}. Al no existir otros trabajos que diferencien las distintas porciones valvulares, para poder comparar nuestros resultados respecto de otros protocolos de descelularización sobre la arteria hemos tenido que revisar trabajos sobre sustitutos arteriales tratados^{7,51,62,154}. En el caso del faldón muscular no hemos encontrado ningún trabajo sobre el desarrollo de matrices muscular, por lo que no ha sido posible realizar comparación alguna.

Es importante señalar, que como hemos mencionado en varias ocasiones anteriormente, la sensibilidad para detectar células viables en las válvulas implantadas durante los ensayos fue excelente. En el caso del Alamar Blue, es cierto que su mayor uso es para detectar viabilidad en cultivos celulares, pero al menos dos trabajos previamente validaron el método para evaluar la viabilidad de estructuras tridimensionales tras un método de homogenización de la muestra¹⁵⁵, que seguimos. También se analizó la capacidad de difusión del reactante (resazurina) con distintos tiempos de incubación, siendo necesarios tiempos largos (24 horas) para homogeneizar la difusión en el segmento más compacto, el músculo. El

resultado cuantitativo de ausencia de restos celulares viables fue confirmado morfológicamente con la tinción de las muestras de H-E y con la SEM. El ensayo Pico-Green además mostró ausencia de restos de ácidos nucleicos detectables en las muestras. Toda esta evidencia indica que cualquier celularidad encontrada sobre el homoinjerto 6 meses después de su implante debe proceder del receptor.

Como describimos en la tabla 6, se encontró celularidad intersticial en todas las válvulas implantadas. En concreto sobre el velo llamó la atención que la celularidad hallado fue muy escasa o casi ausente, no solo en las válvulas tratadas sino también en los homoinjertos criopreservados no tratados. Si comparamos nuestros resultados, coinciden con los hallazgos observados en algunas series en donde no se observa recelularización intersticial sobre el velo. Otras series por el contrario encontraron recelularización parcial sobre la misma porción¹¹⁹. En el caso de los único injertos descelularizados con autorización comercial "Synergraft", solo existe evidencia de un homoinjerto explantado por un evento no relacionado y analizado posteriormente, en él que la única celularidad presente fue inflamatoria linfocitaria en toda su superficie incluso incursiones dentro de la matriz⁸⁶.

Es destacable que en ninguna de las muestras analizadas de los tres segmentos se observaron células de origen inflamatorio más allá de las zonas adyacentes a los puntos de sutura, ocasionados lógicamente como consecuencia de la reacción a cuerpo extraño. Tampoco en ningún animal del grupo control se observó infiltración linfocitaria.

En cuanto a la celularidad hallada en la arteria, salvo en un animal de cada grupo en donde no se observaron células intersticiales, en los restantes se encontraron, siguiendo en algunos casos patrones de infiltración procedentes fundamentalmente de la adventicia, aunque en algunos casos y en menor intensidad también se observaron procedentes del endotelio.

Comparados estos resultados con los obtenidos con matrices procedentes de injertos arteriales^{62,154,156}, parece que aunque en todos los casos comparados se trata de arterias sistémicas, nuestros resultados son concordantes con los observados con anterioridad, si bien es cierto que salvo para casos específicos de infecciones sobre injertos previos ningún xenoinjerto descelularizado u homoinjerto (procedente por ejemplo de arteria umbilical) ha demostrado mejor permeabilidad de los sustitutos vasculares clásicos¹⁵⁶.

Destacamos, como mencionamos en el caso del velo, no haber encontrado ningún infiltrado inflamatorio en una zona en la que en los homoinjertos degenerados desarrollan más respuesta inmune.

En cuanto al faldón muscular, los resultados han sido sorprendentes, a pesar de ser la porción con menor densidad celular en fresco, en las válvulas explantadas es el segmento con mayor colonización. De hecho la densidad celular se puede considerar prácticamente normal respecto al tejido en fresco tanto en el grupo control como en el grupo de estudio. El grado de estructuración comparado con el tejido en fresco procedente del faldón aórtico deja

bastante que desear. Es posible que regenerar un tejido complejo como es el muscular lleve más de 6 meses, aunque tampoco sabemos si el tejido generado llegará en algún momento a asemejarse al nativo. Para un estudio del proceso de regeneración muscular sería necesario realizar un estudio secuencial y no transversal a los 6 meses.

3.1.2. Análisis de la matriz

La prueba más potente para el análisis de la matriz desde el punto de vista cualitativo es la SEM, y los resultados obtenidos son excelentes tanto en superficie como en los cortes de las muestras. No hay ensayos consolidados con esta técnica de análisis de la matriz en la literatura de homoinjertos valvulares¹⁵⁷. Es preciso decir que la cuantificación de la calidad de la matriz se realiza mediante una escala visual no cuantitativa, por lo que los resultados no aportan variables numéricas que permitan comparar series distintas.

En la determinación cuantitativa de colágeno, elastina y GAG (esta última sólo sobre el velo) de las muestras a los 6 meses de su implante mostró concentraciones estadísticamente similares para los homoinjertos tratados, no tratados y las válvulas aórticas de los mismos animales. Las diferencias encontradas en la composición fibrilar entre las válvulas aórticas y pulmonares, no fueron estadísticamente significativas. No hay que olvidar, que la composición proporcional de las dos válvulas en el mismo individuo varía, al estar sometidas a mayores presiones, la concentración de colágeno y elastina es mayor en la válvula

aórtica que en la pulmonar. En muestras obtenidas de pacientes intervenidos con el procedimiento de Ross se ha demostrado que la composición y disposición de las fibras del autoinjerto pulmonar al estar sometido a presiones sistémicas se modifican asemejando las de las válvulas aórticas.

Los kits empleamos para la caracterización bioquímica de las muestras ofrecen resultados muy robustos, no obstante es un método poco difundido en el análisis de las matrices valvulares. En el año 2006 Stock et al, trabajando en uno de los grupos más activos en matrices valvulares, en la Universidad Friedrich-Schiller en Jena, Alemania, emplearon la misma sistemática de análisis cuantitativo que nosotros sobre distintas matrices valvulares implantadas percutáneamente en un modelo experimental diferente¹⁵⁷.

Dentro del análisis cuantitativo, la determinación de GAG nos parece de particular importancia. Como mencionamos en la introducción, su concentración es alta sobre todo en el velo valvular, separando capas con distintas propiedades mecánicas. Su función es la de amortiguar las fuerzas de cizallamiento que aparecen entre las dos capas "fibrilares" a lo largo del ciclo valvular. Las concentraciones en los otros dos segmentos son significativamente más bajas, y su papel menos determinante. Los GAG presentes en la matriz son producidos por las células intersticiales y tienen un turn-over relativamente rápido, además son particularmente vulnerables a cualquier método de descelularización, fundamentalmente a los detergentes,

pero también a otros medios físicos o químicos como los cambios de pH. En nuestro caso las muestras obtenidas del velo y teñidas mostraron la escasa o nula recelularización de los velos, por lo que esperábamos encontrar en los test bioquímicos que la concentración de GAG fuese baja. Por el contrario las concentraciones halladas en las muestras a los 6 meses fueron similares a las de sus correspondientes aórticas y las pulmonares no tratadas.

3.1.3. Análisis del endotelio

¿Por qué es tan importante el estudio del endotelio sobre la matriz?

La respuesta sencilla sería que podría mejorar el perfil tromboembólico de la válvula. ¿Sería esto un gran beneficio? Los mismos sustitutos valvulares tienen mayor riesgo de trombosis cuando se colocan en posición derecha o venosa que si lo hacen sustituyendo una válvula izquierda. También tienen más tendencia a la trombosis las válvulas aurículo-ventriculares que las semilunares, y así estableciendo un ranking la válvula más trombogénica sería la tricúspide y la menos la aórtica. La causa principal es la menor presión y por lo tanto velocidad de flujo en posición venosa, lo que ocasiona estasis y trombosis. Existe suficiente evidencia en la literatura del escaso desarrollo endotelial tanto en las válvulas biológicas como en los homoinjertos criopreservados, sobre todo en los velos. Algunas publicaciones describen cierto grado de endotelización sobre algunos sustitutos valvulares, aunque su distribución y sobre todo funcionalidad parece bastante

incompleta. Tanto las bioprótesis como los homoinjertos han demostrado tener un riesgo bajo de tromboembolismos pulmonares tras su implante en posición pulmonar, si bien es cierto que no existen indicaciones universalmente aceptadas en cuanto al tratamiento antitrombótico de estos enfermos, y muchos de ellos permanecen antiagregados o anticoagulados según algunos registros³⁵.

Llegados a este punto, podemos decir que empíricamente sabemos que los homoinjertos y bioprótesis pulmonares no se endotelizan, pero tampoco producen trombosis, por lo que conseguir un sustituto "endotelizable" no parece aportar una gran ventaja desde el punto de vista clínico.

Como ya mencionamos en la introducción, la importancia del endotelio en los mecanismos de permeabilidad vascular y en la modulación de las células intersticiales parece básica. Lógicamente cualquier tejido "funcionaría" mejor si sus vasos están recubiertos de endotelio, pero en el caso de las matrices hay un motivo más buscar la endotelización.

En el periodo embrionario parte de las células endoluminales procedentes de la cresta neural que más tarde formarán el endotelio de las cavidades, migran hacia la zona intersticial de los grandes vasos y forman su capa muscular lisa. En la base de los grandes vasos constituyen el tejido intersticial de las válvulas semilunares siguiendo un proceso de "mesenquimación" del endocardio conocido como "transdiferenciación".

El mecanismo de transdiferenciación está regulado por un mecanismo muy complejo. Se sabe que existe un marcador presente en las células endocardiales que migran, la α -actina del músculo liso, que posteriormente desaparece para siempre del endotelio. Dos factores de crecimiento transformadores (TGF), el $\beta 2$ y el $\beta 3$ favorecen el paso de célula endotelial a intersticial. Durante el proceso aparecen otras moléculas, que se sabe que lo condicionan, pero que por el momento su función específica no es conocida.

Podríamos pensar que conseguir una mejor endotelización podría activar el proceso de transdiferenciación y recolonización intersticial a partir del endotelio, y de hecho algunos grupos trabajando con otros tejidos no valvulares, apuestan por cultivar sobre sus estructuras endotelio, con el fin de facilitar el crecimiento sobre las matrices ^{142,143,158}.

Deberíamos plantearnos también que asumimos que la presencia de endotelio puede favorecer la colonización de la matriz subyacente, pero es también posible que su hallazgo no sea más que un marcador de la capacidad de recelularizarse un tejido, esto es, si la matriz o el sustituto valvular tiene características aceptables para su colonización, entonces empezaría creando endotelio. Visto así añadirlo exógenamente tras su cultivo in vitro, puede no mejorar los resultados previstos de recelularización intersticial.

El grado de endotelización de los homoinjertos no fue el esperado: solo en 2 de los 9 casos se encontró un grado de recelularización endotelial apreciable, y en ninguno de los dos se mostró parecido en extensión y densidad nuclear a

su correspondiente velo aórtico. Por segmentos los menos endotelizados correspondieron a los velos, seguido de la pared arterial. El músculo debido a la pequeña longitud en contacto con el torrente circulatorio no fue analizado.

La morfología endotelial de las muestras teñidas con hematoxilina-eosina no era muy estructurada, sin embargo el endotelio presente en los velos aórticos del mismo animal en algunos casos mostraba el mismo aspecto a pesar de que el material no había sido ni tratado ni manipulado durante los procedimientos.

Desgraciadamente comparar características cualitativas entre diferentes grupos investigadores resulta muy difícil. Las fotografías con las mismas tinciones que aparecen artículos relacionados con descelularización muestran casi siempre el mismo fenómeno, sin embargo solo una vez ha sido descrito como tal. Posiblemente la categorización funcional del neoendotelio merecería un estudio aparte.

Como dato positivo en este apartado es que en un velo correspondiente a una válvula tratada que presentaba cierto grado de endotelización, bajo la visión de SEM mostró no sólo un aspecto más uniforme que con la tinción de H-E convencional, sino que además habían desarrollado uniones entre ellas tal como hacen en los velos nativos.

Sea cual sea la secuencia en el desarrollo celular, en nuestra experiencia hemos obtenido mejor grado de recelularización intersticial en las muestras con mejor endotelio.

La conclusión de este apartado es que no sabemos los mecanismos que consiguen que unas matrices sean más fáciles de colonizar que otras. Analizando globalmente los resultados aportados por todas las series, parece que sea necesario antes de su implante cultivar sobre la matriz al menos un componente celular. El diseño de los bioreactores y las distintas estirpes posibles, aumenta enormemente las posibilidades de investigación en este campo, y también los requerimientos económicos de los laboratorios de investigación.

Algunos autores relacionan la colonización no solo con la viabilidad de las células que se han cultivado in vitro antes de su implante, sino con factores apocrinos producidos o bien por células cultivadas de la matriz, o bien por endotelio igualmente cultivado. Otros grupos han optado por generar sobre la matriz dos estirpes distintas, una desdiferenciada hacia tejido conectivo en el interior del tejido o en la cara externa del homoinjerto, y otra endotelial en la superficie interna. El diseño de los bioreactores para conseguir esta doble colonización es complejo, teniendo en cuenta que además de baños celulares independientes con distintos requerimientos, el sistema debe ser dinámico e imitar los ciclos valvulares.

VII CONCLUSIONES



1. El modelo experimental ovino permite el estudio de sustitutos valvulares en posición pulmonar, asemejando durante todo el procedimiento las condiciones a las que se ve sometido un enfermo intervenido con patología valvular. Además la duración del ensayo ha sido adecuada a las perspectivas del estudio, si bien aumentar el tiempo de estabulación o modificar su diseño, aportaría información al estudio de los fenómenos de degeneración/recelularización.
2. El análisis mediante tinción con H-E, el estudio con SEM y la caracterización bioquímica de las muestras obtenidas a los 6 meses de su implante, muestran que la combinación de cambios osmóticos y de cambios en el pH como mecanismo de descelularización ha sido eficaz al evitar el daño a la estructura fibrilar y su contenido en GAG.
3. El protocolo de obtención de matrices ha conseguido distinto grado de reelularización por segmentos, siendo este pobre o ausente en el endotelio y el velo valvular y mayor en el faldón muscular.
4. No se ha observado en ninguna muestra, fenómenos que sugieran el desarrollo de una respuesta inmune contra el tejido implantado, más allá de las zonas de sutura.

Como conclusión final podemos decir que los homoinjertos descelularizados pulmonares, obtenidos mediante un protocolo propio empleando solo medios físicos, son un sustituto valvular adecuado en un modelo experimental ovino.

VIII PERSPECTIVAS FUTURAS



1- APLICACIÓN CIRUGÍA CARDIOVASCULAR

En el área de cirugía cardíaca, nuestros resultados confirman que el modelo ovino es al menos igual que otros, hipótesis de igualdad, para el estudio de este tipo de sustitutos valvulares.

Esta vía de obtención de matrices puede tener utilidad práctica en determinadas poblaciones de enfermos con patología valvular, y la consecución de éxitos en este campo irá modificando el espectro de elección de los diferentes sustitutos valvulares.

Los homoinjertos tratados aunque no eliminan por completo, al menos atenúan los fenómenos de rechazo tisular generados por las células contenidas en los homoinjertos tradicionales, procedentes de donantes de la misma especie.

Queda por resolver una parte no menos complicada: conseguir que el material implantado genere o mantenga células dentro de su matriz. Esto será el hito que modifique a largo plazo su durabilidad.

En un futuro no muy lejano probablemente empecemos a tener formatos comerciales de válvulas o "productos valvulares", desarrollados con esta tecnología. Por el momento, una sola casa comercial ha puesto en el mercado un producto en esta línea, que además ha cambiado en función de los nefastos resultados iniciales.

Posiblemente el desarrollo de nuevos protocolos vendrá determinado por la rentabilidad clínica y económica de este producto específico.

2- APLICACIÓN EN OTRAS ÁREAS DE INTERÉS

Nuestro protocolo de tratamiento se empleó en muestras de tendón, córnea y conjuntiva, y su análisis fue realizado siguiendo los esquemas de nuestra línea de investigación.

Los resultados mostraron una efectividad similar a la observada en válvulas. Se consiguió una eliminación del componente celular y ácidos nucleicos dentro de las estructuras tisulares. Los ensayos de caracterización bioquímicos y biomecánicos mostraron la conservación en cuanto a la composición y funcionalidad. Además las células propias de cada tejido fueron capaces de adherirse a la matriz descelularizada en los ensayos de biocompatibilidad.

Los resultados de estos estudios, dieron robustez a la hipótesis basada en que la combinación de choques de pH y osmóticos presenta un potente efecto descelularizante sin generar residuos tóxicos. El protocolo descrito puede ser modulado dependiendo del grado de laxitud de los tejidos, acortando tiempos de acción para tejidos más laxos y ampliando tiempos en tejidos más densos.

IX BIBLIOGRAFÍA



1. Li S, Hu S, Zhou J, Liao Z. In-vitro endothelialization of patches of bovine jugular vein stabilized by dye-mediated photooxidation. *J Heart Valve Dis.* 2003 Sep;12(5):625–7.
2. Armstrong EJ, Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res.* 2004 Sep 3;95(5):459–70.
3. Gao JQ, Zheng JP, Jin HG, Zhang WQ, Yan PY, Chen T, et al. A new rapamycin-abluminally coated chitosan/heparin stent system accelerates early re-endothelialisation and improves anti-coagulant properties in porcine coronary artery models. *Clin Invest Med.* 2014 Jan;37(6):E395–402.
4. Wilhelmi MHM, Mertsching H, Wilhelmi MHM, Leyh R, Haverich A. Role of inflammation in allogeneic and xenogeneic heart valve degeneration: immunohistochemical evaluation of inflammatory endothelial cell activation. *J Heart Valve Dis.* 2003 Jul 1;12(4):520–6.
5. Dohmen PM, Konertz W. Seeding human endothelial cells on complex three-dimensional scaffolds. *Ann Thorac Surg.* 2006 May;81(5):1942; author reply 1942–3.
6. Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, et al. Tissue engineering of heart valves - Human endothelial cell seeding of detergent

- acellularized porcine valves. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 1998;
7. Xi-Xun Y, Chang-Xiu W, Huai-Qing C. Preparation and endothelialization of decellularised vascular scaffold for tissue-engineered blood vessel. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;
 8. Miller D V, Edwards WD, Zehr KJ. Endothelial and smooth muscle cell populations in a decellularized cryopreserved aortic homograft (SynerGraft) 2 years after implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006 Jul;132(1):175–6.
 9. Huang SD, Liu XH, Bai CG, Lu FL, Yuan Y, Gong DJ, et al. Synergistic effect of fibronectin and hepatocyte growth factor on stable cell-matrix adhesion, re-endothelialization, and reconstitution in developing tissue-engineered heart valves. *Heart Vessels.* 2007;
 10. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Ringes-Lichtenberg S, Sturz G, Hoeffler K, et al. In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions. *Biomaterials.* 2006;
 11. Stamm C, Khosravi A, Grabow N, Schmohl K, Treckmann N, Drechsel A, et al. Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering. *Ann Thorac Surg.* 2004 Dec;78(6):2084–92; discussion 2092–3.

12. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005 Apr;27(4):566–71.
13. Aikawa E, Whittaker P, Farber M, Mendelson K, Padera RF, Aikawa M, et al. Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering. *Circulation.* 2006 Mar 14;113(10):1344–52.
14. Smith S, Taylor PM, Chester AH, Allen SP, Dreger SA, Eastwood M, et al. Force generation of different human cardiac valve interstitial cells: relevance to individual valve function and tissue engineering. *J Heart Valve Dis.* 2007 Jul;16(4):440–6.
15. Rabkin-Aikawa E, Farber M, Aikawa M, Schoen FJ. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J Heart Valve Dis.* 2004;
16. Latif N, Sarathchandra P, Taylor PM, Antoniow J, Yacoub MH. Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2005 Mar;14(2):218–27.

17. Ramshaw JAM, Peng YY, Glattauer V, Werkmeister JA. Collagens as biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2009 Dec;20 Suppl 1:S3–8.
18. Merryman WD, Engelmayer GC, Liao J, Sacks MS. Defining biomechanical endpoints for tissue engineered heart valve leaflets from native leaflet properties. *Prog Pediatr Cardiol*. Elsevier; 2006 Mar 3;21(2):153–60.
19. Barron V, Lyons E, Stenson-Cox C, McHugh PE, Pandit A. Bioreactors for Cardiovascular Cell and Tissue Growth: A Review. *Ann Biomed Eng*. 2003 Oct;31(9):1017–30.
20. Ikhmetse JD, Konduri S, Warnock JN, Xing Y, Yoganathand AP. Cyclic aortic pressure affects the biological properties of porcine pulmonary valve leaflets. *J Heart Valve Dis*. 2006 Mar;15(2):295–302.
21. Leopaldi AM, Vismara R, Lemma M, Valerio L, Cervo M, Mangini A, et al. In vitro hemodynamics and valve imaging in passive beating hearts. *J Biomech*. 2012 Apr 30;45(7):1133–9.
22. Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Barón-Esquivias G, Baumgartner H, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). *Eur Heart J*. 2012;33(19):2451–96.

23. Turina MI. Future of heart valve surgery. Eur J Cardiothorac Surg. 2004 Dec;26 Suppl 1:S8–11; discussion S11–3.
24. Farè S, Brunella MF, Bruschi G, Vitali E. Ex-vivo characterization of three Björk-Shiley Delrin heart valves. J Heart Valve Dis. 2008 May;17(3):325–31.
25. Phillips SJ. Searching for the truth: a mechanical or a tissue valve? J Heart Valve Dis. 2004 May;13 Suppl 1:S95–8.
26. Livi U. The past and the future of mechanical valve prostheses. J Heart Valve Dis. 2004;
27. Ali A, Lim E, Halstead J, Ashrafian H, Ali Z, Khalpey Z, et al. Porcine or human stentless valves for aortic valve replacement? Results of a 10-year comparative study. J Heart Valve Dis. 2003 Jul 1;12(4):430–5; discussion 435.
28. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. J Biomed Mater Res. 2005 Mar 15;79(3):439–65.
29. Doss M, Risteski P, Wood JP, Wimmer-Greinecker G, Moritz A. In-vivo evaluation of the BioPhysio valve prosthesis in the aortic position. J Heart Valve Dis. 2008 Jan 1;17(1):105–9.

30. Neethling WML, Glancy R, Hodge AJ. ADAPT-treated porcine valve tissue (cusp and wall) versus Medtronic Freestyle and Prima Plus: crosslink stability and calcification behavior in the subcutaneous rat model. *J Heart Valve Dis.* 2004 Jul;13(4):689–96; discussion 696.
31. Stamou SC, Williams ML, Gunn TM, Hagberg RC, Lobdell KW, Kouchoukos NT. Aortic root surgery in the United States: A report from the Society of Thoracic Surgeons database. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Elsevier Inc.; 2014;
32. Gerosa G, Rizzoli G, Di Marco F, Bottio T, Thiene G, Casarotto D. The experience with porcine bioprostheses at Padua University. *J Heart Valve Dis.* 2004 May;13 Suppl 1:S44–8.
33. Sucu N, Tamer L, Aytacoglu B, Polat A, Dondas HA, Gul A, et al. Inhibition of calcification with citric acid in pericardial bioprosthetic heart valve material: a preliminary report. *J Heart Valve Dis.* 2004 Jul;13(4):697–700.
34. Brown JW, Ruzmetov M, Fukui T, Rodefeld MD, Mahomed Y, Turrentine MW. Fate of the Autograft and Homograft Following Ross Aortic Valve Replacement: Reoperative Frequency, Outcome, and Management. *J Heart Valve Dis.* 2006 Mar;15(2):253–9; discussion 259–60.

35. Mokhles MM, Charitos EI, Stierle U, Rajeswaran J, Blackstone EH, Bogers AJJC, et al. The fate of pulmonary conduits after the Ross procedure: longitudinal analysis of the German-Dutch Ross registry experience. *Heart*. 2013;99(24):1857–66.
36. Pepper JR. Homografts and autografts: which patients really benefit? *J Heart Valve Dis*. 2004 May;13 Suppl 1:S52–4.
37. By TMMH De, Parker R, Walter EMD, Hetzer R. Cardiovascular tissue banking in Europe. 2012;(3).
38. Heng WL, Albrecht H, Chiappini P, Lim YP, Manning L. International Heart Valve Bank Survey: A Review of Processing Practices and Activity Outcomes.
39. Lis GJ, Rokita E, Podolec P, Pfitzner R, Dziatkowiak A, Cichocki T. Mineralization and organic phase modifications as contributory factors of accelerated degeneration in homograft aortic valves. *J Heart Valve Dis*. 2003 Nov;12(6):741–51.
40. Hopkins R a. Aortic Root Replacement With Homograft Valved Conduit. *Oper Tech Card Thorac Surg*. 1997;2(4):266–80.
41. González Santos JM, Castaño Ruiz M, López Rodríguez J, Dalmau Sorlí MJ. La operación de Ross: teóricamente ideal, pero ¿ventajosa en la práctica? *Rev Española Cardiol*. Elsevier; 2004 Jan 1;57(1):7–11.

42. Da Costa FDA, Pereira EWL, Barboza LE, Haggi Filho H, Collatusso C, Gomes CHG, et al. Ten-year experience with the Ross operation. *Arq Bras Cardiol* [Editor & translator]. 2006;
43. Kalfa D, Mohammadi S, Kalavrouziotis D, Kharroubi M, Doyle D, Marzouk M, et al. Long-term outcomes of the Ross procedure in adults with severe aortic stenosis: single-centre experience with 20 years of follow-up. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014 Feb 26;1–9.
44. Andreas M, Seebacher G, Reida E, Wiedemann D, Pees C, Rosenhek R, et al. A single-center experience with the ross procedure over 20 years. *The Annals of thoracic surgery*. 2014.
45. Oury JH, Maxwell M. An Appraisal of the Ross Procedure: Goals and Technical Guidelines. *Oper Tech Card Thorac Surg*. 1997 Nov;2(4):289–301.
46. Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, Black KS, O'Brien MF. Transpecies heart valve transplant: Advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. *Ann Thorac Surg*. 2000;70(6):1962–9.
47. Oswal D, Korossis S, Mirsadraee S, Wilcox H, Watterson K, Fisher J, et al. Biomechanical characterization of decellularized and cross-linked bovine pericardium. *J Heart Valve Dis*. 2007 Mar;16(2):165–74.

48. Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, Kirsch L, Hurschler C, Hilfiker A, et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2007;
49. Mendoza-Novelo B, Avila EE, Cauich-Rodríguez J V., Jorge-Herrero E, Rojo FJ, Guinea G V., et al. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. *Acta Biomater.* 2011;7(3):1241–8.
50. Howard JH, Litovsky SH, Tallaj JA, Liu X, Holman WL. Xenograft calcification in Reiter's syndrome. *J Heart Valve Dis.* 2007 Mar;16(2):159–61.
51. Meuris B, Verbeken E, Flameng W. Prevention of porcine aortic wall calcification by acellularization: necessity for a non-glutaraldehyde-based fixation treatment. *J Heart Valve Dis.* 2005 May;14(3):358–63; discussion 363–4.
52. Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Pathology Of Explanted Cryopreserved Allograft Heart Valves: Comparison With Aortic Valves From Orthotopic Heart Transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Elsevier; 1998 Jan 1;115(1):118–27.
53. Vogt F, Böll BM, Boulesteix AL, Kilian E, Santarpino G, Reichart B, et al. Homografts in aortic position: Does blood group incompatibility have an impact on patient outcomes? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* [Editor & translator]. 2013;

54. Bechtel JFM, Müller-steinhardt M, Schmidtke C, Brunswik A. Evaluation of the Decellularized Pulmonary Valve Homograft (SynerGraft™). 2003;
55. Juthier F, Vincentelli A, Gaudric J, Corseaux D, Fouquet O, Calet C, et al. Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization: deleterious effects of granulocyte colony-stimulating factor. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006 Apr;131(4):843–52.
56. Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, et al. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials.* 2010;31(13):3590–5.
57. Matsushima R, Nam K, Shimatsu Y, Kimura T, Fujisato T, Kishida A. Decellularized dermis-polymer complex provides a platform for soft-to-hard tissue interfaces. *Mater Sci Eng C.* 2014;35(1):354–62.
58. Amano S, Shimomura N, Yokoo S, Araki-Sasaki K, Yamagami S. Decellularizing corneal stroma using N2 gas. *Mol Vis.* 2008;14:878–82.
59. Xing Q, Yates K. Decellularization of Fibroblast Cell Sheets for Natural Extracellular Matrix Scaffold Preparation. *Tissue* 2014;00(00):1–11.
60. Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel JB. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc Surg Off Publ Soc Vasc*

- Surg [and] Int Soc Cardiovasc Surgery, North Am Chapter. 1994;19(3):446–56.
61. Bertanha M, Moroz A, Jaldin RG, Silva RAM, Rinaldi JC, Golim MA, et al. Morphofunctional characterization of decellularized vena cava as tissue engineering scaffolds. *Exp Cell Res. Academic Press Inc.*; 2014;326(1):103–11.
 62. Gui L, Muto A, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE. Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(9):2665–76.
 63. Ota T, Taketani S, Iwai S, Miyagawa S, Furuta M, Hara M, et al. Novel Method of Decellularization of Porcine Valves Using Polyethylene Glycol and Gamma Irradiation. *Ann Thorac Surg*. 2007;83(4):1501–7.
 64. Meyer SR, Chiu B, Churchill TA, Zhu L, Lakey JRT, Ross DB. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2006;79(2):254–62.
 65. Sarathchandra P, Smolenski RT, Yuen AHY, Chester AH, Goldstein S, Heacox AE, et al. Impact of γ -irradiation on extracellular matrix of porcine pulmonary valves. *J Surg Res*. 2012;176(2):376–85.
 66. Choi JS, Williams JK, Greven M, Walter KA, Laber PW, Khang G, et al. Bioengineering endothelialized neo-

- corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma. *Biomaterials*. 2010;31(26):6738–45.
67. Haykal S, Zhou Y, Marcus P, Salna M, Machuca T, Hofer SOP, et al. The effect of decellularization of tracheal allografts on leukocyte infiltration and of recellularization on regulatory T cell recruitment. *Biomaterials*. 2013;34(23):5821–32.
68. Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, Hilfiker A, Mertsching H, Leyh R, et al. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation*. 2006;114(SUPPL. 1).
69. Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Repin O, Batrinac A, et al. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation*. 2002;106(12 Suppl 1):163–8.
70. Assmann A, Zwirnmann K, Heidelberg F, Schiffer F, Horstkötter K, Munakata H, et al. The degeneration of biological cardiovascular prostheses under pro-calcific metabolic conditions in a small animal model. *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2014;35(26):7416–28.
71. Assmann A, Delfs C, Munakata H, Schiffer F, Horstkötter K, Huynh K, et al. Acceleration of autologous *in vivo* recellularization of decellularized

- aortic conduits by fibronectin surface coating. *Biomaterials*. 2013;34(25):6015–26.
72. Converse GL, Armstrong M, Quinn RW, Buse EE, Cromwell ML, Moriarty SJ, et al. Effects of cryopreservation, decellularization and novel extracellular matrix conditioning on the quasi-static and time-dependent properties of the pulmonary valve leaflet. *Acta Biomater*. 2012;8(7):2722–9.
73. Faulk DM, Wildemann JD, Badylak SF. Decellularization and Cell Seeding of Whole Liver Biologic Scaffolds Composed of Extracellular Matrix. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2014;
74. Dunne LW, Huang Z, Meng W, Fan X, Zhang N, Zhang Q, et al. Human decellularized adipose tissue scaffold as a model for breast cancer cell growth and drug treatments. *Biomaterials*. Elsevier BV; 2014;35(18):4940–9.
75. Kasimir M-T, Rieder E, Seebacher G, Nigisch A, Dekan B, Wolner E, et al. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis*. 2006;15(2):278–86; discussion 286.
76. Xu X-F, Guo H-P, Gong D, Ma J-H, Xu Z-W, Wan J-Y, et al. Decellularized porcine pulmonary arteries

- cross-linked by carbodiimide. *Int J Clin Exp Med*. 2013 Jan;6(7):524–31.
77. Akhyari P, Kamiya H, Gwanmesia P, Aubin H, Tschierschke R, Hoffmann S, et al. In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010 Nov;38(5):539–46.
78. Voges I, Bräsen JH, Entenmann A, Scheid M, Scheewe J, Fischer G, et al. Adverse results of a decellularized tissue-engineered pulmonary valve in humans assessed with magnetic resonance imaging. 2013;44(August 2008):272–9.
79. Zehr KJ, Yagubyan M, Connolly HM, Nelson SM, Schaff H V. Aortic root replacement with a novel decellularized cryopreserved aortic homograft: postoperative immunoreactivity and early results. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 Oct;130(4):1010–5.
80. Bechtel JFM, Gellissen J, Erasmi AW, Petersen M, Hiob A, Stierle U, et al. Mid-term findings on echocardiography and computed tomography after RVOT-reconstruction: comparison of decellularized (SynerGraft) and conventional allografts. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005 Mar 1;27(3):410–5; discussion 415.
81. Bechtel JFM, Müller-Steinhardt M, Schmidtke C, Brunswik A, Stierle U, Sievers H-H. Evaluation of the

- decellularized pulmonary valve homograft (SynerGraft). *J Heart Valve Dis.* 2003;
82. Bechtel JFM, Stierle U, Sievers H-H. Fifty-two months' mean follow up of decellularized SynerGraft-treated pulmonary valve allografts. *The Journal of heart valve disease.* 2008. p. 98–104; discussion 104.
83. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT e in pediatric patients q. 2003;23:1002–6.
84. Sievers HH, Stierl U, Schmidtke C, Bechtel M. Decellularized pulmonary homograft (SynerGraft) for reconstruction of the right ventricular outflow tract: First clinical experience. *Z Kardiol* [Editor & translator]. 2003;
85. Tavakkol Z, Gelehrter S, Goldberg CS, Bove EL, Devaney EJ, Ohye RG. Superior durability of SynerGraft pulmonary allografts compared with standard cryopreserved allografts. *Ann Thorac Surg.* 2005 Nov;80(5):1610–4.
86. Sayk F, Bos I, Schubert U, Wedel T, Sievers H-H. Histopathologic findings in a novel decellularized pulmonary homograft: an autopsy study. *Ann Thorac Surg.* 2005 May;79(5):1755–8.

87. Ramos J. Desarrollo y análisis de un protocolo de descelularización para la obtención de válvulas cardíacas acelulares. Tesis Doctoral. UNIVERSIDAD DE LEÓN; 2014.
88. Amatruda CM, Bona Casas C, Keller BK, Tahir H, Dubini G, Hoekstra A, et al. From histology and imaging data to models for in-stent restenosis. *Int J Artif Organs*. 2014 Oct;37(10):786–800.
89. Akai T, Hoshina K, Yamamoto S, Takeuchi H, Nemoto Y, Ohshima M, et al. Biomechanical Analysis of an Aortic Aneurysm Model and Its Clinical Application to Thoracic Aortic Aneurysms for Defining “Saccular” Aneurysms. *J Am Heart Assoc*. 2015 Jan 19;4(1):e001547–e001547.
90. Alday EAP, Colman MA, Langley P, Butters TD, Higham J, Workman AJ, et al. A New Algorithm to Diagnose Atrial Ectopic Origin from Multi Lead ECG Systems - Insights from 3D Virtual Human Atria and Torso. Panfilov A V., editor. *PLOS Comput Biol*. 2015 Jan 22;11(1):e1004026.
91. Dávila-román VG, Waggoner AD, Kennard ED, Holubkov R, Jamieson WRE, Englberger L, et al. Prevalence and Severity of Paravalvular Regurgitation in the Artificial Valve Endocarditis Reduction Trial (AVERT) Echocardiography Study. (5).

92. Hein SJ, Lehmann LH, Kossack M, Juergensen L, Fuchs D, Katus HA, et al. Advanced echocardiography in adult zebrafish reveals delayed recovery of heart function after myocardial cryoinjury. *PLoS One*. 2015 Jan;10(4):e0122665.
93. Plantié E, Migocka-Patrzałek M, Daczewska M, Jagla K. Model Organisms in the Fight against Muscular Dystrophy: Lessons from *Drosophila* and Zebrafish. *Molecules*. Jan;20(4):6237–53.
94. Mendelson K, Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng*. 2006 Dec;34(12):1799–819.
95. Wride M a. Minireview: Apoptosis as seen through a lens. *Apoptosis*. 2000;5(3):203–9.
96. Zhang B, Liu Y, Zhang J-S, Zhang X-H, Chen W-J, Yin X-H, et al. Cortistatin protects myocardium from endoplasmic reticulum stress induced apoptosis during sepsis. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 May 5;406:40–8.
97. Sun Y-G, Wang X-Y, Chen X, Shen C-X, Li Y-G. Hydrogen sulfide improves cardiomyocytes electrical remodeling post ischemia/reperfusion injury in rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Jan;8(1):474–81.

98. Aboodi MS, Milewski K, Tellez A, Cheng Y, Yi G-H, Kaluza GL, et al. Long term impact of balloon post-dilatation on neointimal formation: an experimental comparative study between second-generation self-expanding versus balloon-expandable stent technologies. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2014 Feb 15;83(3):397–404.
99. Grehan JF, Hilbert SL, Ferrans VJ, Droel JS, Salerno CT, Bianco RW. Development and evaluation of a swine model to assess the preclinical safety of mechanical heart valves. *J Heart Valve Dis.* ENGLAND; 2000 Sep;9(5):710–9; discussion 719–20.
100. Borrie J, Hill GL. Aortic valve allografts in sheep. *Thorax.* 1968;23(3):230–8.
101. Puc MM, Hewitt CW, Delrossi AJ, Marra SW, Tran HS, Cilley JHJ, et al. A novel technique in a sheep model for evaluating prosthetic heart valve performance. *J Investig Surg. United States;* 2001;14(1):55–61.
102. Sillas T, ; Costa f. d. a., ; Vilani r. o., ; Souza f. p., ; Veiga s. l., ; Dohmen p. m., et al. CARDIAC VALVAR REPLACEMENT IN SHEEP – DESCRIPTION OF SURGICAL technique and outcome (Substituição valvar cardíaca em ovinos – Descrição da técnica operatória e análise dos resultados). 2008;(41):46–53.
103. Schauvliege S, Narine K, Bouchez S, Desmet D, Van Parys V, Van Nooten G, et al. Refined anaesthesia for

- implantation of engineered experimental aortic valves in the pulmonary artery using a right heart bypass in sheep. *Lab Anim.* 2006;40(4):341–52.
104. Mokráček a., Hlubocký J, Burkert J, Vojáček J, Šulda M, Vamberra M, et al. Transplantation of mitral allograft into the tricuspid position - A sheep experimental model. *Acta Vet Brno.* 2008;77(1):89–95.
 105. Lehr EJ, Rayat GR, Desai LS, Coe JY, Korbitt GS, Ross DB. Inbred or outbred? An evaluation of the functional allogenicity of farm sheep used in cardiac valve studies. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006 Nov;132(5):1156–61.
 106. Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation.* 2000 Nov 7;102(19 Suppl 3):III50–5.
 107. Schenke-Layland K, Riemann I, Opitz F, König K, Halbhuber KJ, Stock UA. Comparative study of cellular and extracellular matrix composition of native and tissue engineered heart valves. *Matrix Biol.* 2004;
 108. Cortina A. Evaluación de un protocolo anestésico para la implantación de bioprótesis valvulares en un modelo experimental ovino. Trabajo fin de Master. Universidad de León 2014.

109. Eltchaninoff H, Nusimovici-Avadis D, Babaliaros V, Spenser B, Felsen B, Cribier A. Five month study of percutaneous heart valves in the systemic circulation of sheep using a novel model of aortic insufficiency. *EuroIntervention J Eur Collab with Work Gr Interv Cardiol Eur Soc Cardiol. France*; 2006 Feb;1(4):438–44.
110. Boudjemline Y, Bonhoeffer P. Percutaneous implantation of a valve in the descending aorta in lambs. *Eur Heart J. England*; 2002 Jul;23(13):1045–9.
111. Boudjemline Y, De DB, De DS. Percutaneous implantation of a biological valve in the aorta to treat aortic valve insufficiency – a sheep study. *1909;8(4):113–7.*
112. Izutani H, Gundry SR, Vricella LA, Xu H, Bailey LL. Right ventricular outflow tract reconstruction using a Goretex membrane monocusp valve in infant animals. *ASAIO J. Jan*;46(5):553–5.
113. Jassar AS, Ford P a., Haber HL, Isidro A, Swain JD, Bavaria JE, et al. Cardiac surgery in Jehovah’s Witness patients: Ten-year experience. *Ann Thorac Surg. Elsevier Inc.*; 2012;93(1):19–25.
114. Regueiro-Purriños M, Fernández-Vázquez F, de Prado AP, Altónaga JR, Cuellas-Ramón C, Ajenjo-Silverio JM, et al. Ventricular arrhythmias and mortality associated with isoflurane and sevoflurane

- in a porcine model of myocardial infarction. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011;50(1):73–8.
115. Kronen PW, Levionnois OL, Eckstein FS, Moens YPS. Prolonged recovery and respiratory depression after fentanyl infusion in a sheep undergoing mitral valve reconstruction. *Lab Anim [Editor & translator].* 2005;39(4):428–34.
116. Kouchoukos N, Blackstone E, Hanley F, Kirklin J. *Kirklin/Barratt-Boyes Cardiac Surgery*. 24th ed. USA: saunders; 2012.
117. Ketchedjian A, Jones AL, Krueger P, Robinson E, Crouch K, Wolfenbarger L, et al. Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions. *Ann Thorac Surg.* 2005 Mar;79(3):888–96; discussion 896.
118. Dohmen PM, da Costa F, Yoshi S, Lopes S V, da Souza FP, Vilani R, et al. Histological evaluation of tissue-engineered heart valves implanted in the juvenile sheep model: is there a need for in-vitro seeding? *J Heart Valve Dis.* 2006 Nov;15(6):823–9.
119. Quinn RW, Hilbert SL, Bert AA, Drake BW, Bustamante JA, Fenton JE, et al. Performance and Morphology of Decellularized Pulmonary Valves Implanted in Juvenile Sheep. *ATS.* Elsevier Inc.; 2011;92(1):131–7.

120. Baraki H, Tudorache I, Braun M, Höffler K, Görler A, Lichtenberg A, et al. Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model. *Biomaterials*. 2009;30(31):6240–6.
121. Ruzmetov M, Shah JJ, Geiss DM, Fortuna RS. Decellularized versus standard cryopreserved valve allografts for right ventricular outflow tract reconstruction: a single-institution comparison. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012 Mar;143(3):543–9.
122. Nishimura R a., Otto CM, Bonow RO, Carabello B a., Erwin JP, Guyton R a., et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: A report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines. *Circulation*. 2014. 521-643 p.
123. Costa F, Dohmen P, Vieira E, Lopes SV, Colatusso C, Pereira EWL, et al. Ross Operation with decellularized pulmonary allografts: medium-term results. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. Jan;22(4):454–62.
124. Mathieu P, Voisine P, Pépin A, Shetty R, Savard N, Dagenais F. Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *J Heart Valve Dis*. 2005;
125. Jian B, Narula N, Li Q, Mohler ER, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF- β 1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes

- aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg. Elsevier*; 2003 Feb 2;75(2):457–65.
126. Akatov VS, Ryndina NI, Muratov RM, Santalova IM, Soloviev V V, Britikov D V, et al. The role of mitochondria in the initiation of calcinosis in transplants of heart valves and vessels. *Dokl Biol Sci.* 2006 Jan;406(1-6):112–4.
 127. Levy RJ, Vyavahare N, Ogle M, Ashworth P, Bianco R, Schoen FJ. Inhibition of cusp and aortic wall calcification in ethanol- and aluminum-treated bioprosthetic heart valves in sheep: background, mechanisms, and synergism. *J Heart Valve Dis.* 2003 Mar;12(2):209–16; discussion 216.
 128. Dignan R, O'Brien M, Hogan P, Thornton A, Fowler K, Byrne D, et al. Aortic valve allograft structural deterioration is associated with a subset of antibodies to human leukocyte antigens. *J Heart Valve Dis.* 2003;12(3):382–90; discussion 390–1.
 129. Ketchedjian A, Kreuger P, Lukoff H, Robinson E, Linthorst-Jones A, Crouch K, et al. Ovine panel reactive antibody assay of HLA responsivity to allograft bioengineered vascular scaffolds. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Jan;129(1):159–66.
 130. Bertipaglia B, Ortolani F, Petrelli L, Gerosa G, Spina M, Pauletto P, et al. Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells: the VESALIO project

- (vitalitate exornatum succedaneum aorticum labore ingenioso obtenitur). *Ann Thorac Surg.* 2003 Apr;75(4):1274–82.
131. Da Costa FDA, Dohmen PM, Duarte D, von Glenn C, Lopes SV, Filho HH, et al. Immunological and echocardiographic evaluation of decellularized versus cryopreserved allografts during the Ross operation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005 Apr 1;27(4):572–8.
 132. Elkins RC, Dawson PE, Goldstein S, Walsh SP, Black KS. Decellularized human valve allografts. *Ann Thorac Surg.* 2001 May;71(5 Suppl):S428–32.
 133. Meyer SR, Nagendran J, Desai LS, Rayat GR, Churchill TA, Anderson CC, et al. Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Aug;130(2):469–76.
 134. Dor FJMF, Oei FBS, Vaessen LMB, Marquet RL, Bogers AJJC, Weimar W. Frequencies of donor-reactive helper T lymphocytes correlate with rejection of aortic valve allografts in rats. *J Heart Valve Dis.* 2002;11(3):326–34.
 135. Hoekstra F, Knoop C, Vaessen L, Wassenaar C, Jutte N, Bos E, et al. Donor-specific cellular immune response against human cardiac valve allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112(2):281–6.

136. Wilhelmi MHM, Bara C, Kofidis T, Wilhelmi MHM, Pichlmaier M, Haverich A. Long-term cardiac allograft valves after heart transplant are functionally and structurally preserved, in contrast to homografts and bioprostheses. *J Heart Valve Dis.* 2006 Nov;15(6):777–82.
137. Fukushima S, Tesar PJ, Pearse B, Jalali H, Sparks L, Fraser JF, et al. Long-term clinical outcomes after aortic valve replacement using cryopreserved aortic allograft. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Elsevier Inc.; 1975;148(1):65–72.e2.
138. Kilian E, Oberhoffer M, Kaczmarek I, Bauerfeind D, Kreuzer E, Reichart B. Outcome after aortic valve replacement: comparison of homografts with mechanical prostheses. *J Heart Valve Dis.* 2007 Jul;16(4):404–9.
139. Dohmen PM, Lembcke A, Hotz H, Kivelitz D, Konertz WF. Ross operation with a tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg.* 2002 Nov;74(5):1438–42.
140. Sharp MA, Phillips D, Roberts I, Hands L. A cautionary case: The synergraft vascular prosthesis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004;
141. Thomas HP, Steinhagen-Thiessen E. Lipoprotein(a): Aspekte der Pathophysiologie, Epidemiologie und Behandlung. *Zeitschrift für Kardiologie.* 2003. p. 53–8.

142. Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, et al. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation*. 2000 Nov 7;102(19 Suppl 3):III44–9.
143. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Kivelitz D, Braun JP, Pruss A, et al. Mid-Term Clinical Results Using a Tissue-Engineered Pulmonary Valve to Reconstruct the Right Ventricular Outflow Tract During the Ross Procedure. *Ann Thorac Surg*. 2007 Sep;84(3):729–36.
144. Lehr EJ, Hermary S, McKay RT, Webb DNH, Abazari A, McGann LE, et al. NMR assessment of Me(2)SO in decellularized cryopreserved aortic valve conduits. *J Surg Res*. 2007 Jul;141(1):60–7.
145. Xu X-F, Wang Z-H, An G-Y, Guo H-P, Wang S, Pei J-F, et al. A novel surgical procedure: scaffold-pulmonary autograft transplantation. *Int J Clin Exp Med*. 2013 Jan;6(8):662–6.
146. Dohmen PM, Hauptmann S, Terytze A, Konertz WF. In-vivo repopularization of a tissue-engineered heart valve in a human subject. *The Journal of heart valve disease*. 2007.
147. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Pruss A, Konertz W. Ten Years of Clinical Results With a Tissue-Engineered Pulmonary Valve [Internet]. *The Annals of Thoracic Surgery*. Elsevier Inc.; 2011. p. 1308–14.

148. Hopkins R. From cadaver harvested homograft valves to tissue-engineered valve conduits. *Progress in Pediatric Cardiology*. 2006.
149. Konertz W, Dohmen PM, Liu J, Beholz S, Dushe S, Posner S, et al. Hemodynamic characteristics of the Matrix P decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation. *J Heart Valve Dis*. 2005 Jan;14(1):78–81.
150. Jana S, Tefft BJ, Spoon DB, Simari RD. Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves. *Acta Biomater*. 2014 Jul;10(7):2877–93.
151. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Apr 30;63(4-5):242–68.
152. Jana S, Tefft BJ, Spoon DB, Simari RD. Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves. *Acta Biomater* [Editor & translator]. 2014 Jul;10(7):2877–93.
153. Elkins RC. Tissue-engineered valves. *Ann Thorac Surg*. 2002 Nov;74(5):1434.
154. Uchimura E, Sawa Y, Taketani S, Yamanaka Y, Hara M, Matsuda H, et al. Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly(ethylene glycol). *J Biomed Mater Res A*. 2003 Dec 1;67(3):834–7.

155. Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue???. *J Immunol Methods*. 2001;252(1-2):131–8.
156. Wang X, Lin P, Yao Q, Chen C. Development of small-diameter vascular grafts. *World Journal of Surgery* [Editor & translator]. 2007.
157. Stock UA, Degenkolbe I, Attmann T, Schenke-Layland K, Freitag S, Lutter G. Prevention of device-related tissue damage during percutaneous deployment of tissue-engineered heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 Jun;131(6):1323–30.
158. Flameng W, De Visscher G, Mesure L, Hermans H, Jashari R, Meuris B. Coating with fibronectin and stromal cell-derived factor-1?? of decellularized homografts used for right ventricular outflow tract reconstruction eliminates immune response-related degeneration. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Elsevier Inc.; 2014;147(4):1398–404.e2.

X ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1. Vista craneal de un corte transversal cardiaco, seccionando ambas aurículas por encima del plano anular y por encima de las comisuras valvulares pulmonar y aórtica.

Figura 2. Vista craneal de la válvula mitral seccionando la aurícula izquierda a nivel de la orejuela.

Figura 3. Vista caudal de la válvula aórtica cerrada desde su aspecto ventricular.

Figura 4. Sección de la válvula aórtica en la comisura anterior entre en el velo no coronariano y el derecho.

Figura 5. Corte histológico de velo aórtico teñido con Hematoxilina-Eosina visualizado a 10X en microscopio óptico de campo claro. Se aprecian las tres capas diferenciadas: C. Capa fibrosa, B Capa esponjosa, C Capa ventricularis.

Figura 6. Diferentes tipos de Válvulas Cardiacas Mecánicas.

Figura 7. Vista lateral de distintas bioprótesis aórtica, respectivamente A Carpentier Edwards Perimount, B Medtronic Mosaic, C St. Jude Medical EPIC y D Sorin Medical Mitroflow. En los modelos B y C se aprecian los anillos de sutura festoneados.

Figura 8. Homoinjerto criopreservado aórtico de tamaño infantil tras su descongelación que incluye desde el faldón muscular y el velo anterior mitral proximalmente hasta el cayado y parte de la aorta descendente distal.

Figura 9. A Pieza cardiaca completa B Homoinjerto valvular pulmonar tras su tallado.

Figura 10. Animal estabulado en su instalación previo al procedimiento quirúrgico.

Figura 11. Animal anestesiado y preparado para iniciar la intervención.

Figura 12. Campo quirúrgico abierto por el 4º Espacio Intercostal izquierdo. El animal se encuentra ya bajo circulación extracorporea.

Figura 13. Homoinjerto tallado previo a su implante En el centro de la fotografía se aprecian los velos pulmonares cerrados.

Figura 14. Animal estabulado tras la intervención quirúrgica. Se aprecia en su costado el drenaje con el sistema rudimentario de Heimlich.

Figura 15. Imágenes correspondientes a velos pulmonares teñidos con HH vistos por microscopía convencional de campo claro 10X. **A** Velo pulmonar en fresco **B** Velo aórtico del animal de estudio **C** Velo pulmonar correspondiente a un homoinjerto Criopreservado **D** Velo pulmonar correspondiente a un homoinjerto descelularizado.

Figura 16. Imagen correspondiente a un velo pulmonar de un homoinjerto criopreservado, teñido con HH visto por

microscopía convencional de campo claro 10X. Se aprecia la ausencia de celularidad en las capas superiores, aunque se mantiene la disposición de las fibras en su interior.

Figura 17. Imagen correspondiente a un velo pulmonar de un homoinjerto descelularizado, teñido con HH vistos por microscopía convencional de campo claro 10X.

Figura 18. Imágenes correspondientes a pared arterial teñidos con HH vistos por microscopía convencional de campo claro 10X. **A** Pared pulmonar en fresco **B** Pared arterial aórtica del animal de estudio **C** Pared arterial pulmonar correspondiente a un homoinjerto Criopreservado **D** Pared arterial pulmonar correspondiente a un homoinjerto descelularizado.

Figura 19. Imágenes correspondientes al faldón muscular teñidos con HH vistos por microscopía convencional de campo claro 10X. **A** Faldón muscular en fresco **B** Faldón muscular pulmonar correspondiente a un animal del grupo control **C** Faldón muscular pulmonar de un homoinjerto descelularizado.

Figura 20. Imágenes correspondientes al faldón muscular teñidos con HH vistos por microscopía convencional de campo claro 10X. **A** Velo Aórtico de control **B** Velo pulmonar correspondiente a un Homoinjerto descelularizado **C** Faldón muscular, Pared arterial y Velo pulmonar de un homoinjerto descelularizado.

Figura 21. Faldón muscular de raíz aórtica del grupo control teñido con HH visto por microscopía convencional de campo claro 100X. Se aprecia una forma larvaria posiblemente de una filaria sin infiltrado linfocitario. En las fibras musculares adyacentes se aprecia con facilidad la estriación típica de las fibras musculares.

Figura 22. Faldón muscular de raíz pulmonar descelularizada teñido con HH visto por microscopía convencional de campo claro 10X.

Figura 23. Faldón muscular de raíz pulmonar descelularizada teñido con HH visto por microscopía convencional de campo claro. Se marca con la flecha un granuloma con infiltración periférica linfocitaria.

Figura 24. Faldón muscular de raíz pulmonar descelularizada teñido con HH visto por microscopía convencional de campo claro 10X. Marcados con flechas se aprecian focos de calcificación heterotópica.

Figura 25. Faldón muscular de raíz pulmonar descelularizada teñido con HH visto por microscopía convencional de campo claro 10X. Hemosiderófagos.

Figura 26. **A** Faldón muscular de raíz aórtica nativa. **B** Faldón muscular de raíz pulmonar descelularizada, ambas teñidas con

HH donde se aprecian estrías sólo en la imagen A y fenómenos de vacuolización en la imagen B señaladas por flechas.

Figura 27. Comparación entre las muestras de SEM obtenidas de los fragmentos de arteria y velo de las válvulas aórticas; las muestras de arteria y velo, extraídas de las válvulas pulmonares descelularizadas post-implante y las muestras de arteria y velo, procesadas a partir de válvulas pulmonares congeladas post-implante. En todas las imágenes se muestra el alto estado de conservación de la matriz extracelular aunque cabe remarcar que ni en las válvulas nativas de las ovejas ni en las válvulas implantadas se aprecian signos de presencia celular en el interior de las estructuras tridimensionales. Visualizado a 1.000 aumentos en el microscopio de barrido. A Arteria. Válvula aórtica. 1.000 X. B Arteria. Válvula Pulmonar (DC). 1.000 X. C Arteria. Válvula Pulmonar (Cong). 1.000 X. D Velo. Válvula aórtica. 1.000 X. E Velo. Válvula Pulmonar (DC). 1.000 X. F Velo. Válvula Pulmonar (Cong). 1.000 X.

Figura 28: Imágenes de SEM de la válvula pulmonar descelularizada La flecha blanca muestra las células endoteliales recubriendo la superficie del velo valvular. A Velo válvula pulmonar DC. Oveja 1.2. 1.000X. B Velo válvula pulmonar DC. Oveja 1.2. 1.000X.

Figura 29. Gráfico de box plots para la concentración de colágeno en velo. No existieron diferencias significativas entre las válvulas aórticas control (C), las válvulas pulmonares descelularizadas (DC) y las válvulas pulmonares criopreservadas (CG).

Figura 30. Gráfico de box plots para la concentración de colágeno en arteria. Se puede observar que no existieron diferencias significativas entre las válvulas aórticas control (C), las válvulas pulmonares descelularizadas (DC) y las válvulas pulmonares criopreservadas (CG).

Figura 31. Gráfico de box plots para la concentración de elastina en velo. No existieron diferencias significativas entre las válvulas aórticas control (C), las válvulas pulmonares descelularizadas (DC) y las válvulas pulmonares criopreservadas (CG).

Figura 32. Gráfico de box plots para la concentración de elastina en arteria. No existieron diferencias significativas entre las válvulas aórticas control (C), las válvulas pulmonares descelularizadas (DC) y las válvulas pulmonares criopreservadas (CG).

Figura 33: Gráfico de box plots para la concentración de glucosaminoglicanos (GAG's). No existieron diferencias significativas entre las válvulas aórticas control (C), las válvulas pulmonares descelularizadas (DC) y las válvulas pulmonares criopreservadas (CG).

Figura 34: Homoinjerto pulmonar implantado en la aorta torácica descendente de la oveja prolongado con un injerto de dacron.

Figura 35. Secuencia obtenida por RMNC de un Homoinjerto tratado en posición pulmonar. La secuencia s2 y 3 han sido obtenidas en un T1 BB, la S24 ha sido tomada tras la administración de gadolinio en una partición volumétrica 3D de un estudio angiográfico. Las longitudes marcadas en verde corresponden a en la imagen superior izquierda al diámetro de la arteria pulmonar principal (8.1 mm), en la superior derecha a nivel del anillo o zona de sutura inferior, y la inferior al diámetro a nivel de los senos de Valsalva (26 mm).



XI ÍNDICE DE TABLAS



Tabla 1: Clasificación de los agentes descelularizantes.

Tabla 2. Valores fisiológicos de la especie ovina.

Tabla 3. Valores medios de tiempo y temperaturas obtenidos.

Tabla 4. Valores medios de presiones sistólicas, diastólicas y medias así como de frecuencia cardiaca obtenidos durante el procedimiento quirúrgico.

Tabla 5. Valores medios en la gasometría arterial e ionograma obtenidos

Tabla 6. Hallazgos histológicos en cuanto al grado de celularidad observados mediante microscopía óptica convencional de campo claro con tinción de Hematoxilina Eosina

Tabla 7. Hallazgos histológicos en cuanto al estado de la matriz observados mediante microscopía óptica convencional de campo claro con tinción de Hematoxilina Eosina

Tabla 8. Hallazgos histológicos en cuanto al estado del endotelio observado mediante microscopía óptica convencional de campo claro con tinción de Hematoxilina Eosina

XII ÍNDICE DE ESQUEMAS



Esquema 1. Sección transversal de la raíz aórtica mostrando sus componentes histológicos.

Esquema 2. Técnica quirúrgica en la implantación de un homoinjerto aórtico en posición ortotópica, donde se aprecia en D la sutura al anillo receptor del faldón del homoinjerto, en E y F la preparación y sutura de los ostia coronarios y en G la sutura de la anastomosis distal.

Esquema 3. Cronograma de la línea de investigación global. Los cuadrados rojos marcan el objeto de la tesis "Desarrollo y análisis de un protocolo de descelularización para la obtención de válvulas cardíacas acelulares", defendida por la Dra. Jennifer Ramos Carro en Octubre de 2014. Los cuadros verdes corresponden a los apartados estudiados en esta tesis.

Esquema 4. Vista final de la Operación de Ross con la aorta aún clampada.

Esquema 5. Esquema explicativo del proceso de descelularización. Los frascos tachados con una cruz corresponden a las muestras microbiológicas analizadas y negativas antes del implante en una animal.

Esquema 6. Secuencia temporal y caracterización de los animales intervenidos.

Esquema 7. Esquema de la implantación de una válvula mecánica interpuesta en un injerto de dacron en la aorta torácica descendente con clampaje lateral.

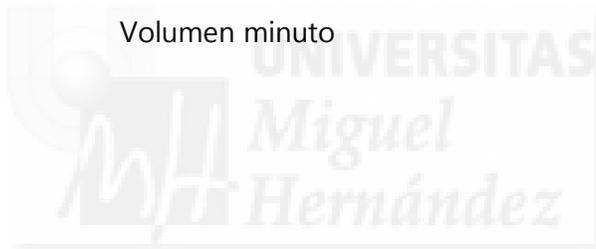
XIII ABREVIATURAS



ABO	Grupo sanguíneo
ANOVA	Análisis de varianza (ANalysis Of VAriance)
CEC	Circulación extracorporea
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAsa A	Desoxirribonucleasa I
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena (<i>double stranded Deoxyribonucleic Acid</i>)
ECMO	Extracorporeal membrane oxygenation
EEM	Error Estándar de la Media
FC	Frecuencia cardiaca
FDA	Food and Drug Administration
FiO ₂	Fración inspirada de oxígeno
FR	Frecuencia respiratoria
GAG	Glicosaminoglicanos
H crio	Homoinjerto criopreservado
H decel	Homoinjerto descelularizado
HE	Hematoxilina Eosina
HLA	Antígeno de histocompatibilidad
I/E	Relación inspiración espiración
IM	Intramuscular

ISO	Organización internacional de la normalización (<i>International standard organization</i>)
mmHg	milímetros de mercurio
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PEEP	Presión al final de la espiración (<i>Positive end-expiratory pressure</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>)
PostCEC	Posteriormente a la entrada en circulación extracorpórea
Post Cx	Postquirúrgicos
PreCEC	Previamente a la entrada en circulación extracorpórea
Protocolo A/B	protocolo de descelularización pH ácido-pH básico
Protocolo B/A	protocolo de descelularización pH básico-pH ácido
RCP	Reanimación Cardio Pulmonar
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMNC	Resonancia Magnética Nuclear Cardíaca
RNAsa A	Ribonucleasa A

SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SD	Desoxicolato de sodio
SDS	Deodecilsulfato sódico
SpO ₂	Saturación periférica de oxígeno
TAVIs	Prótesis aórticas implantables transcater (<i>transcatheter aortic valves implants</i>)
TGF	Factores de crecimiento transformadores (<i>Transformers grown factors</i>)
VD	Ventrículo derecho
VM	Volumen minuto



XIV ANEXOS



PROTOCOLOS

PROTOCOLO 1: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN HIPOTÓNICA

En primer lugar se llena un vaso de precipitados, hasta un poco menos del volumen a preparar, con agua destilada. En segundo lugar se añaden los componentes de la solución hipotónica, bajo agitación magnética continuada (10-515 Bioblock Scientific), en el siguiente orden:

- Tampón Trizma® hidrocloreuro (TRIS) 10 mM.
- Ácido etilendiaminotetraacético
(*Ethylenediaminetetraacetic Acid*, EDTA) 5 mM*.
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
(*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*, PMSF) 0,1 mM.
- Penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml
(P/E)

Una vez disueltos todos los componentes se ajusta el pH (KI 2211, Hanna Instruments) y se enrasa hasta el volumen necesario con agua destilada.

*Para que se disuelva el EDTA es necesario subir el pH a 7 y se requieren unos 20 minutos para su completa disolución.

PROTOCOLO 2: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN HIPERTÓNICA

En primer lugar, se llena un vaso de precipitados hasta un poco menos del volumen a preparar con agua destilada. En segundo lugar, se añaden los componentes de la solución hipertónica, bajo agitación magnética continuada, en el siguiente orden:

- TRIS 50 mM.
- EDTA 5 mM.*
- Cloruro sódico (NaCl) 150 mM.
- PMSF 0,1 mM.
- (100 U/ml- 100 µg/ml-P/E).

Una vez disueltos todos los componentes se ajusta el pH y se enrasa hasta el volumen necesario con agua destilada.

*Para que se disuelva el EDTA es necesario subir el pH a 7 y se necesitan unos 20 minutos para su completa disolución.

PROTOCOLO3: TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

Antes de comenzar con la tinción, se introdujeron las muestras en una estufa (1.500E, Shel Lab) a 60°C durante media hora.

En primer lugar, se van a desparafinar y rehidratar las muestras:

- Xilol, 5 minutos (min) (2 ciclos), alcohol absoluto, 5 min (2 ciclos), alcohol 90°, 5 min (2 ciclos), alcohol 70°, 5 min y lavado en agua corriente, 2 min.

Posteriormente, se procede a realizar la tinción:

- Hematoxilina de Mayer, 2 min, como mordiente inmersión en alcohol de 50° y solución de eosina Y, 4 min.*

A continuación se deshidratan las muestras antes de su montaje.

- Alcohol de 90°, 5 min (2 ciclos), alcohol absoluto, 5 min (2 ciclos) y xilol, 5 min (2 ciclos).

Finalmente, se añade una gota de medio de montaje (*Distyrene Plasticizer Xylene, DPX*) sobre las muestras teñidas y se coloca el cubreobjetos de vidrio, aplicando un poco de presión para eliminar la presencia de burbujas que puedan interferir con la visualización de las preparaciones.

Como resultado de la tinción, los núcleos se van a teñir de morado; el citoplasma y la fibrina de rosa; la musculatura y los glóbulos rojos de rosa fuerte, rojo o anaranjado.

*Preparación de eosina Y, se añade 1 gramo de eosina Y en 100 ml de agua destilada. Además se añaden 2-3 gotas de ácido acético glacial y se agita vigorosamente hasta su completa dilución.

PROTOCOLO 4: SOLUCIÓN PARA EL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

Primero se preparan las soluciones stock de DNAsa I y RNAsa A para luego preparar la solución de utilización con ambas enzimas.

Solución stock de RNAsa A:*

- TRIS 10 mM.
- NaCl 15 mM.
- Enzima ribonucleasa A (RNAsa A) 10 mg/ml.

Solución stock de DNAsa I:*

- Glicerol 50% v/v.
- TRIS 20 mM.
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 1 mM.
- Enzima desoxirribonucleasa I (DNAsa I) 10 mg/ml.

*Una vez preparadas se almacenan a 4°C.

Solución de utilización:

- TRIS 50 mM.
- $MgCl_2$ 20 mM.
- Albúmina humana 50 μ g/ml.
- Solución stock de RNAsa A 10 μ g/ml, 20 μ g/ml o 40 μ g/ml.
- Solución stock de DNAsa I 12 μ g/ml, 25 μ g/ml o 50 μ g/ml.

PROTOCOLO 6: PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SEM

En primer lugar es necesario deshidratar las muestras para proceder a desecarlas.

- Lavado con PBS, 30 min (3 ciclos), alcohol al 20%, 40 min, alcohol al 30%, 40 min, alcohol al 50%, 40 min, alcohol al 70%, 40 min, alcohol al 80%, 40 min, alcohol al 90%, 40 min, alcohol al 96%, 40 min (3 ciclos), Etanol Absoluto, 40 min (2 ciclos).

Una vez que las muestras están en etanol absoluto, se desecan por punto crítico en un desecador (CPD Balzers).

1. Para ello se inserta la cámara en el agente intermedio (alcohol absoluto) y se colocan las muestras sin tocar la zona de estudio.
2. Se cierra la cámara de presión y se refrigera, *cooling*, por debajo de 10°C (5 min).
3. Se permite la entrada de CO₂ líquido, *medium in*, abriendo la bombona. Comprobar que la válvula esté bien cerrada. En este paso se inicia la sustitución del agente intermedio por el CO₂. Se agita, *stirrer*, durante todo el proceso de sustitución.
4. Se deja que la cámara se llene completamente.

5. Se permite la salida de parte del líquido, *medium out*, pero las muestras quedan siempre cubiertas.
6. Se repiten los pasos 4 y 5 durante 6 veces, con 3 lavados de 15 min, y luego el resto de 10 min.
7. Se llena la cámara de CO₂ justo por debajo del borde superior de la ventana frontal.
8. Se apaga *stirrer, medium in, cooling* y se enciende *heating*. Una vez alcanzados los 40°C, el CO₂ habrá pasado de líquido a gas superando así el punto crítico del CO₂. Se deja hasta presión de 90 bar.
9. Se permite la salida del gas, *gas out*, muy lentamente durante 15 minutos aproximadamente asegurándose antes de que la válvula está cerrada completamente.
10. Se abre la cámara de presión, se retiran las muestras y se cierra la bombona.

Tras la completa desecación de las muestras se introducen las muestras en un recubridor (Sputter coater SCD 004, Balzers) para cubrirlas con una capa de oro coloidal que asegure la conductividad eléctrica de toda su superficie.

Se colocan las muestras con cinta doble sobre los soportes específicos para SEM, evitando tocar la zona de estudio y se abre la válvula de argón.

1. Se inserta la muestra en la campana y se enciende el equipo.
2. Se hace el vacío entre 0,05 y 0,07 (esto se consigue con varios lavados de hasta un mínimo de 0,02). En este paso se sustituye el aire que contiene el equipo por el gas argón.
3. Se ajusta el tiempo a 400 segundos y la corriente a 25-30 mA.
4. Se enciende el botón *start*.

Una vez recubierta las muestras, ya estarían listas para su visualización en el microscopio.

PROTOCOLO 7: REALIZACIÓN DEL ENSAYO BIOQUÍMICO SIRCOL

Para la realización de este protocolo se requieren dos días, en el primer día se procesan las muestras para su digestión enzimática y en el segundo día se realiza el protocolo para la detección de colágeno.

DIA 1:

1. Se prepara la solución enzimática para la digestión:

Solución stock. Pepsina 4 mg/ml en HCl 10 mM (se almacena a -20°C) Tarda en disolverse 1 h aproximadamente. Se agita en el agitador orbital

(Rocker 25, Labnet) a 4°C hasta su completa disolución.

Solución de trabajo. 0,1 mg/ml de la solución stock de pepsina en ácido acético 0,5 M.

NOTA: La solución stock se descongela a 4°C y se disuelve en ácido acético 0,5 M previamente enfriado a 4°C.

2. Se introducen las muestras desecadas en tubos de 2 ml y se añade 1,5 ml de la solución de digestión. Se mantiene la digestión enzimática durante toda la noche a 4°C.

DIA 2:

3. Se recuperan 100 µl de cada muestra, estaban a 4°C, en tubos de 2 ml y se añade un 1 ml del reactivo *Sircol Dye Reagent*.*
4. Se mezcla durante 30 min en el agitador orbital a 120 revoluciones por minuto (rpm).
5. Se centrifugan las muestras a 15.000 g durante 10 min.
6. Se retira con cuidado el sobrenadante de las muestras sin eliminar el pellet (Se puede utilizar un papel o bastoncillo).
7. Se añaden 750 µl del reactivo *Acid-Salt Wash Reagent** a las muestras (no se debe agitar y/o resuspender).

8. Se centrifuga a 15.000 g durante 10 min.
9. Se retira con cuidado el sobrenadante de las muestras sin eliminar el pellet (Se puede utilizar un papel o bastoncillo).
10. Se añaden 250 μ l del reactivo *Alkali-Reagent** a las muestras.
11. Se agita en el vórtex hasta su completa disolución, (el proceso tarda unos 2 min aproximadamente).
12. Se añaden 200 μ l en la placa de absorbancia y se mide en el espectrofotómetro (Multiskan EX, Labsystems) a 550 nm.

*Estos componentes vienen suministrados en el kit.

PROTOCOLO 8: REALIZACIÓN DEL ENSAYO BIOQUÍMICO FASTIN

1. Se prepara la extracción de la elastina insoluble:

Para ello se introducen las muestras en tubos de 1.5 ml y se añaden 750 μ l de ácido oxálico* 0,25 M.

NOTA: El ácido oxálico, suministrado con el kit, se encuentra a una concentración de 1 M, se diluye 1:4 en agua destilada para alcanzar una concentración final de 0,25 M.

2. Se introducen las muestras en el agitador térmico a 100°C durante 60 minutos. A los 30 minutos se agitan las muestras en el vórtex durante 1 minuto.
3. Se centrifugan las muestras a 12.000 g durante 10 minutos.

NOTA: Estos pasos se repetirán tantas veces sea necesario hasta que no se detecte pellet tras la centrifugación. Se ha establecido un total de dos extracciones para los tejidos a estudiar. Los datos obtenidos en la segunda extracción se suman a los de la primera para obtener el contenido total de elastina.

4. Se recoge un volumen de entre 10 y 100 μ l de sobrenadante (se recomiendan 50 μ l) y se añade a un nuevo tubo de 1,5 ml.
5. Se añade un volumen equivalente de *Elastin Precipitating Reagent** al volumen de muestra recogida.
6. Se agita en el vórtex durante unos segundos y se deja reposar a T^a A durante 15 min.
7. Se centrifuga a 12.000 g durante 10 min.
8. Se retira el sobrenadante invirtiendo los tubos, se trata de eliminar la mayor cantidad de líquido con ayuda de un papel o bastoncillo.

9. Se añade 1 ml de *Dye Reagent** (se almacena a 4°C) y se introduce en el agitador térmico a 1.400 rpm durante 90 minutos.
10. Se centrifuga a 12.000 g durante 10 min.
11. Se retira el sobrenadante invirtiendo los tubos y se trata de eliminar la mayor cantidad de líquido con ayuda de un papel o bastoncillo.
12. Se añaden 250 µl de *Dye Dissociation Reagent*.*
13. Se mezclan durante 1 min a 1.400 rpm en el agitador térmico y se deja reposar durante 10 min.
14. Se pasa por el vórtex unos minutos.
15. Se añaden 250 µl de muestra en una placa de 96 pocillos y se mide la absorbancia con el filtro de 550 nm.

*Estos componentes vienen suministrados en el kit.

PROTOCOLO 9: REALIZACIÓN DEL ENSAYO BIOQUÍMICO BLYSCAN

1. Se prepara la solución de digestión:
 - Solución stock de papaína. 80 µl de solución de papaína dan lugar a una solución de 15 a 20 mg de papaína por 100 ml de PBS.

- 0,1 M de acetato sódico (0,82 g /100 ml).
 - 0,01 M de ácido etilen-diamino-tetraacético disodio (Na₂EDTA) (0,37 g/ 100 ml).
 - 0,005M Clorhidrato de cisteína (80 mg/ 100 ml).
 - 0,2 M de PBS a pH 6,4.
2. Se introducen las muestras desecadas en tubos de 2 ml y se añaden 1,5 ml de la solución de digestión. Se mantiene la digestión durante 3 horas a 65°C en el agitador térmico.
 3. Se centrifugan los tubos de la digestión a 10.000g durante 10 min.
 4. Se recogen 50 µl del sobrenadante resultante y se añaden a un nuevo tubo de 2 ml.
 5. Se enrasa a 100 µl con agua destilada y se añade 1 ml de *Blyscan Dye Reagent*.* Se mezcla por inversión.
 6. Se mezcla durante 30 min a 120 rpm en un agitador orbital (Rocker 25, Labnet).
 7. Se centrifuga a 15.000 g durante 10 min.
 8. Se retira el sobrenadante por inversión, con cuidado de no arrastrar el pellet, ayudarse de un bastoncillo o papel para retirar la mayor cantidad de líquido.
 9. Se añaden 500 µl del *Dissociation Reagent*.*

10. Se agita en el agitador térmico durante 1-2 min hasta su completa disolución.
11. Se centrifuga a 15.000 g durante 5 min para eliminar la espuma.
12. Se añaden 200 µl de cada muestra en una placa de 96 pocillos y se mide la absorbancia a 656 nm.

*Estos componentes vienen suministrados en el kit.

PROTOCOLO 10: RAMPA DE CONGELACIÓN

En primer lugar se prepara el criomedio:

- Medio base DMEM
- 10% (v/v) Albúmina sérica
- 10% (v/v) Dimetilsulfóxido (DMSO)*

*Se añade primero la albúmina sérica y a continuación el DMSO se agita rápidamente y se conserva a 4°C hasta su utilización.

Se añade el criomedio a la muestra en bolsas especiales de congelación y se mantiene a 4°C durante 15 minutos para asegurarnos penetra el criomedio por toda la muestra. Todo este proceso se realiza bajo estrictas condiciones de asepsia.

A continuación se procede a introducir la muestra en el congelador programable, y se han considerado los siguientes parámetros:

- T^a de seeding: -5,5°C
- T^a de sobreenfriamiento: -18°C

La rampa de congelación está optimizada para el tejido cardiovascular y consta de ciclos de enfriamiento de entre -0,5°C a -2°C.

Se utiliza como control al proceso un 10% del volumen de criomedio empleado para la muestra, donde se introduce la sonda que controla la temperatura de la muestra.

La rampa finaliza a una temperatura de -80°C y rápidamente se introduce en un tanque de almacenamiento de Nitrógeno Líquido.

